



RAPPORTI ISTISAN 18|3

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Micobatteri tubercolari negli animali e implicazioni di sanità pubblica in Italia

C. Graziani, S. Bellino, L. Busani, P. Pasquali, M.L. Pacciarini,
M.B. Boniotti, M.G. Zanoni, E. Bollo, E. De Carlo, S. Vendetti,
P. Pezzotti, M. Amadori, L. Gibelli, M. D'Incau, G. Zanardi,
S. Borrello, L. Ruocco, R. Lomolino, A. Primavera



EPIDEMIOLOGIA
E SANITÀ PUBBLICA

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Micobatteri tubercolari negli animali e implicazioni di sanità pubblica in Italia

Caterina Graziani (a), Stefania Bellino (a), Luca Busani (a),
Paolo Pasquali (b), Maria Ludovica Pacciarini (c),
Maria Beatrice Boniotti (c), Maria Grazia Zanoni (c),
Enrico Bollo (d), Esterina De Carlo (e), Silvia Vendetti (a),
Patrizio Pezzotti (a), Massimo Amadori (c), Lucia Gibelli (c),
Mario D'Incau (c), Giorgio Zanardi (c), Silvio Borrello (f),
Luigi Ruocco (f), Roberto Lomolino (f), Angelica Primavera (f)

(a) Dipartimento Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità, Roma

*(b) Dipartimento Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(c) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna,
Sezione di Brescia, Brescia*

(d) Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino, Torino

(e) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Sezione di Salerno, Salerno

*(f) Direzione generale della sanità animale e dei farmaci veterinari,
Ministero della Salute, Roma*

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Rapporti ISTISAN
18/3

Istituto Superiore di Sanità

Micobatteri tubercolari negli animali e implicazioni di sanità pubblica in Italia.

Caterina Graziani, Stefania Bellino, Luca Busani, Paolo Pasquali, Maria Ludovica Pacciarini, Maria Beatrice Boniotti, Maria Grazia Zanoni, Enrico Bollo, Esterina De Carlo, Silvia Vendetti, Patrizio Pezzotti, Massimo Amadori, Lucia Gibelli, Mario D'Incau, Giorgio Zanardi, Silvio Borrello, Luigi Ruocco, Roberto Lomolino, Angelica Primavera

2018, ii, 116 p. Rapporti ISTISAN 18/3

Questo rapporto, aggiorna e raccoglie in modo organico ed esaustivo tutte le informazioni disponibili sulla circolazione negli animali e nell'uomo di *Mycobacterium bovis* e di altri micobatteri appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex dal 2001 al 2016 in Italia. In particolare, oltre agli aspetti generali della malattia, sono stati raccolti e analizzati i dati ufficiali disponibili sulla diffusione della malattia nell'uomo e negli animali, consentendo una lettura integrata del fenomeno. Viene presentata l'importanza di un approccio integrato, con attenzione ai settori di sanità animale, sicurezza alimentare e salute pubblica per individuare tempestivamente i punti critici e le possibilità di intervento per la prevenzione e il controllo della malattia in Italia. Il rapporto è uno strumento di conoscenza e di pianificazione a disposizione sia dei ricercatori sia delle autorità, e fornisce un quadro delle azioni svolte e delle informazioni disponibili sulla malattia.

Parole chiave: Micobatteri; Sistema di sorveglianza; Zoonosi

Istituto Superiore di Sanità

Mycobacterial infections in animals and implications for public health in Italy.

Caterina Graziani, Stefania Bellino, Luca Busani, Paolo Pasquali, Maria Ludovica Pacciarini, Maria Beatrice Boniotti, Maria Grazia Zanoni, Enrico Bollo, Esterina De Carlo, Silvia Vendetti, Patrizio Pezzotti, Massimo Amadori, Lucia Gibelli, Mario D'Incau, Giorgio Zanardi, Silvio Borrello, Luigi Ruocco, Roberto Lomolino, Angelica Primavera

2018, ii, 116 p. Rapporti ISTISAN 18/3 (in Italian)

This report presents a comprehensive picture of all available information on the circulation in animals and humans of *Mycobacterium bovis* and other mycobacteria belonging to *Mycobacterium tuberculosis* complex from 2001 to 2016 in Italy. The disease has been described analyzing the official data available in Italy from the surveillance in animals and in humans. This document presents the integrated approach, under the "One Health, One Medicine" concept that in Italy has been followed for the control of the disease, emphasizing the importance of such approach and the need to extensive cooperation between public health and animal health professionals. This report is intended as a tool for both scientists and authorities, providing them with the available knowledge of the disease and focussing on critical points and conditions that still affect the capacity of control of the disease.

Key words: Mycobacteria; Surveillance system; Zoonoses

Gli autori ringraziano la Sig.ra Mariagrazia Guerini per la preziosa collaborazione nell'elaborazione e redazione dei dati, l'Ing. Marco Tironi per le produzioni cartografiche relative alla tubercolosi negli animali.

Per informazioni su questo documento scrivere a: caterina.graziani@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it

Citare questo documento come segue:

Graziani C, Bellino S, Busani L, Pasquali P, Pacciarini ML, Boniotti MB, Zanoni MG, Bollo E, De Carlo E, Vendetti S, Pezzotti P, Amadori M, Gibelli L, D'Incau M, Zanardi G, Borrello S, Ruocco L, Lomolino R, Primavera A. *Micobatteri tubercolari negli animali e implicazioni di sanità pubblica in Italia*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2018. (Rapporti ISTISAN 18/3).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



INDICE

Introduzione	1
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex: filogenesi e implicazioni legislative	2
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (sensu stricto)	2
<i>Mycobacterium canettii</i>	2
<i>Mycobacterium africanum</i>	4
<i>Mycobacterium orygis</i> (Bacillus Oryx).....	4
Dassie bacillus e <i>Mycobacterium mungi</i>	4
<i>Mycobacterium pinnipedii</i>	5
<i>Mycobacterium microti</i>	6
<i>Mycobacterium caprae</i>	6
<i>Mycobacterium bovis</i>	7
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG.....	8
Marcatori filogenetici	8
Filogenesi del <i>M. tuberculosis</i> complex	9
Genetica di popolazione e diffusione di <i>M. bovis</i> e <i>M. caprae</i>	10
Implicazioni per la diagnostica	11
Implicazioni legislative.....	12
Conclusioni	13
Aspetti eziopatologici e immunologici	14
<i>M. bovis</i> (e <i>M. caprae</i>) nel bovino.....	14
Vie di infezione e patogenesi	14
Fattori di virulenza dei micobatteri	15
Resistenza dell'ospite.....	16
Risposta immunitaria dell'ospite.....	16
Tubercolosi nel bufalo.....	22
<i>M. bovis</i> (e <i>M. caprae</i>) in altri animali domestici e selvatici	24
Capra	25
Pecora.....	25
Suino	25
Cavallo	26
Cane	27
Gatto.....	27
<i>M. bovis</i> nell'uomo e negli animali: aspetti immunologici e patologici	27
Aspetti diagnostici negli animali	30
Diagnosi <i>in vivo</i> : aggiornamenti sui test in uso	30
Saggi diagnostici e piani di controllo	30
Esiti dell'infezione da micobatterio tubercolare: riflessi sulla diagnosi <i>in vivo</i>	31
Risposta immunitaria e prove diagnostiche.....	31
Prestazioni del test intradermico	32
Potenza delle tubercoline PPD	33
Test dell'interferone-gamma	34
Risposta anticorpale e saggi sierologici	35
Ruolo interferente dei micobatteri del gruppo <i>M. avium/intracellulare</i>	37
Influsso dell'infezione da micobatterio paratubercolare	38
Sviluppo di nuovi test.....	38
Proteine purificate, ricombinanti e peptidi	38

Saggio del recettore per l'interleuchina-2	39
Scenari futuri	40
Diagnosi <i>post mortem</i>: laboratorio e tecniche molecolari di tipizzazione	40
Esame anatomo-patologico	41
Prelievo e trasporto dei campioni	41
Schema diagnostico.....	41
Esame istologico	42
Esame colturale	43
Esame PCR per il rilevamento diretto di MTCB da tessuto.....	46
Identificazione dei ceppi isolati.....	47
Identificazione di <i>M. bovis</i> e differenziazione da altri micobatteri	48
Tipizzazione molecolare	49
Aspetti diagnostici nell'uomo	51
Diagnosi <i>in vivo</i> : diagnosi di laboratorio e tecniche molecolari di tipizzazione	51
Base ed evoluzione normativa delle attività di eradicazione e controllo nei confronti della tubercolosi bovina in Italia	53
Introduzione	53
Qualifica sanitaria di allevamento e territorio ufficialmente indenne da tubercolosi bovina.....	58
Animali e allevamenti sospetti o infetti	60
Provvedimenti per gli animali sospetti e infetti	61
Ripopolamento.....	62
Disposizioni particolari.....	63
Laboratori ufficiali di riferimento	63
Indennità di abbattimento	64
Sicurezza degli alimenti.....	64
Epidemiologia e sorveglianza della tubercolosi negli animali e nell'uomo	66
Fonti dei dati	66
Negli animali domestici (specie bovina e bufalina)	66
Nell'uomo	67
Tubercolosi nella specie bovina in Italia (2001-2016).....	69
Aspetti microbiologici e genotipici dei micobatteri isolati da animali in Italia	79
Considerazioni	84
Tubercolosi nell'uomo in Italia (2005-2016).....	87
Conclusioni	91
Bibliografia	92

INTRODUZIONE

I micobatteri che causano la tubercolosi nell'uomo e negli animali fanno parte del *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC). Ad oggi, nel MTBC sono inclusi: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. pinnipedii* e *M. caprae*. Inoltre il MTBC include il bacillo *Oryx* che è stato recentemente classificato come *M. orygis* e il bacillo *dassie*. La tubercolosi sostenuta da *M. tuberculosis* è una malattia che si colloca tra le prime dieci come causa di morte nell'uomo. *M. bovis* può essere trasmesso all'uomo attraverso contatto diretto con l'animale infetto o indirettamente attraverso l'ingestione di prodotti lattiero-caseari non pastorizzati o, in modo trascurabile, attraverso prodotti a base di carne non trattati.

La reale dimensione del problema sanitario collegato alle infezioni da microrganismi appartenenti al MTBC nell'uomo è di difficile valutazione, poiché è complesso distinguere dal punto di vista clinico, radiologico o patologico la tubercolosi da *M. bovis* da quella da *M. tuberculosis*.

In Italia, grazie all'adozione e all'applicazione di programmi di eradicazione della tubercolosi negli animali domestici (bovino, in particolare) si è riusciti a ridurre la diffusione della malattia negli animali e il numero di casi nell'uomo, ma a causa della complessità del problema e dell'esistenza di serbatoi animali in specie di difficile controllo (animali selvatici, animali da compagnia), la tubercolosi è ancora un aspetto di sanità pubblica di rilievo.

Questo rapporto è il risultato del lavoro congiunto dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), del Centro di Referenza Nazionale per la tubercolosi da *M. bovis* (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Sezione di Brescia), dalla Direzione Generale della Sanità Animale e dei Farmaci Veterinari del Ministero della Salute, dal Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università degli Studi di Torino e dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Sezione di Salerno.

Questo rapporto ha lo scopo di dare una panoramica generale sui micobatteri tubercolari e sulla situazione della tubercolosi, in particolare da *M. bovis*, nell'uomo e negli animali in Italia, descrivendo gli aspetti generali degli agenti patogeni e dell'infezione nell'uomo e nelle diverse specie animali, fornendo il quadro normativo specifico e le indicazioni sulle attività di sorveglianza e controllo ufficiali ed il quadro epidemiologico aggiornato nell'uomo e negli animali.

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX: FILOGENESI E IMPLICAZIONI LEGISLATIVE

I micobatteri che causano la tubercolosi (TB) nei mammiferi rientrano in quello che viene definito *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC), che comprende *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), *M. africanum* (sottotipo I e sottotipo II), *M. bovis*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. canettii*, *M. orygis*, *Dassie bacillus*, *M. mungi*, *M. pinnipedii* e *M. bovis* BCG. I membri del MTBC sono altamente correlati sia a livello nucleotidico (99,9%) sia nelle sequenze (praticamente identiche) del gene 16S rRNA (Huard *et al.*, 2006).

I batteri appartenenti al MTBC hanno una struttura altamente clonale con poche o nessuna evidenza di scambio di DNA cromosomico tra i ceppi (Hershberg *et al.*, 2008). L'analisi di 24 sequenze del genoma di *M. tuberculosis*, utilizzando quattro diversi metodi, ha evidenziato la ricombinazione di segmenti molto corti di *M. tuberculosis* (Namouchi *et al.*, 2012). Pepperell *et al* (Pepperell *et al.*, 2013) hanno effettuato l'analisi di 64 genomi di *M. tuberculosis* e non hanno trovato alcuna prova di trasferimento genico laterale, dato in accordo con numerosi altri studi (Hershberg *et al.*, 2008). Nonostante l'elevata omologia a livello nucleotidico, i membri del MTBC possono essere distinti da numerosi marcatori molecolari (Tabella 1).

***Mycobacterium tuberculosis* (sensu stricto)**

M. tuberculosis è l'agente eziologico della TB umana ed è il più importante patogeno batterico per l'uomo, con una stima di 10,4 milioni di casi nel 2015 (OMS, 2015). Tuttavia, può colpire anche gli animali da reddito e da compagnia come i bovini (*Bos taurus*) (Lesslie, 1960; Romero *et al.*, 2011), le capre (*Capra hircus*) (Hiko & Agga, 2011), i suini domestici (*Sus scrofa domestica*) (Di Marco *et al.*, 2012), i gatti (*Felis silvestris catus*) e i cani (*Canis lupus familiaris*), gli uccelli (Schmidt *et al.*, 2008) e anche specie selvatiche o gli animali dello zoo (Angkawanish *et al.*, 2010).

Mycobacterium canettii

M. canettii è la specie che più diverge all'interno del MTBC, con colonie ad aspetto liscio, lucido e crescita culturale rapida. Il microbiologo francese Georges Canetti lo descrisse per la prima volta nel 1969 e successivamente fu studiato presso l'Istituto Pasteur. Van Soolingen *et al* (Van Soolingen *et al.*, 1997) isolarono *M. canettii* da un bambino somalo e lo classificarono in un nuovo gruppo tassonomico all'interno del MTBC.

In seguito, fu isolato in un uomo di 56 anni che aveva vissuto in Kenya (Pfyffer *et al.*, 1998) e da due soldati della Legione straniera francese a Gibuti (Miltgen *et al.*, 2002). La TB causata da *M. canettii* sembra essere una malattia emergente nel Corno d'Africa, tuttavia il serbatoio naturale e lo spettro d'ospite di questo patogeno sono ancora sconosciuti. Ad oggi è considerato un outgroup del MTBC a causa della sua divergenza da tutti gli altri membri del complesso.

Nel 2013 Supply *et al* (Supply *et al.*, 2013) hanno dimostrato, tramite l'analisi del genoma di cinque ceppi, che i bacilli tubercolari lisci sono altamente ricombinogenici, presentano una dimensione maggiore del genoma, tassi di variazione genetica più elevati e in termini evolutivi si sono separati precocemente dai restanti membri del MTBC.

Tabella 1. Marker molecolari e rispettive mutazioni genomiche (RDs e SNP) per la differenziazione di specie

Organismo	Geni (mutazioni)											Rv2042 ^{cc38} (GTC/GGC)	
	oxyR ⁿ²⁸⁵ (G/A) ^a	prnA ^{c57} (CAC/GAC)	katG		mmpL6 ⁿ⁵⁵¹ (C/G)	gyrA ^{c95} (AGC/ACC)	gyrB						
			203 (ACC/ACT)	463 (CTG/CGG)			675 (C/T)	756 (G/A)	1311 (T/G)	1410 (C/T)	1450 (G/T)		
<i>M. tuberculosis</i>	G	CAC	ACC	V	C	V	C	G	T	C	C	G	T
<i>M. africanum</i>	G	CAC	ND	CTG	C	ACC	C	G	T	C	C	T	T
<i>Dassie bacillus</i>	G	CAC	ACT	CTG	C	AGC	C	G	T	C	C	T	T
<i>M. mungi</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	G	T	C	C	T	T
<i>M. orygis</i>	G	CAC	ACT	CTG	G	AGC	C	G	T	C	C	T	G
<i>M. pinnipedii</i>	G	CAC	ACT	CTG	G	ACC	C	G	T	C	C	T	T
<i>M. microti</i>	G	CAC	ACT	CTG	G	ACC	T	G	T	C	C	T	T
<i>M. caprae</i>	A	CAC	ACT	CTG	G	ACC	C	A	G	C	C	T	T
<i>M. bovis</i>	A	GAC	ACT	CTG	G	ACC	C	A	T	T	T	T	T
<i>M. bovis</i> BCG	A	GAC	ACT	CTG	G	ACC	C	A	T	T	T	T	T

V, risultati variabili; ND, nessun dato disponibile; l'apice indica la posizione della mutazione sia del nucleotide (n) o del codone (c) dei rispettivi geni.

Inoltre, risulta essere meno virulento di *M. tuberculosis*, dato che fa presupporre che *M. tuberculosis* si sia evoluto da un pool ancestrale di bacilli tubercolari lisci con virulenza più bassa.

Mycobacterium africanum

È stato isolato per la prima volta in Dakar e Senegal nel 1968 (Castets *et al.*, 1968) e presenta caratteristiche intermedie tra *M. tuberculosis* e *M. bovis*. Provoca la metà dei casi di TB umana in Africa occidentale (De Jong *et al.*, 2009) ed è stato ipotizzato un adattamento specifico tra questo patogeno e l'ospite (Intemann *et al.*, 2009). *M. africanum* era inizialmente diviso in tipo I e tipo II in base alle caratteristiche culturali, biochimiche e molecolari, ma nel 2004 il tipo II è stato riclassificato in *M. tuberculosis sensu strictu*, mentre *M. africanum* tipo I è stato suddiviso in West African I, diffuso in tutto il Golfo di Guinea, e West African II, prevalente in Africa occidentale (de Jong *et al.*, 2010). È stato sporadicamente riportato in pazienti fuori dell'Africa Occidentale, tra cui Germania (Schröder, 1982), Regno Unito (UK) (Grange & Yates, 1989), Francia (Frottier *et al.*, 1990), Stati Uniti d'America (USA) (Desmond *et al.*, 2004), Kazakistan (Demkin *et al.*, 2008) e Spagna (Pérez de Pedro *et al.*, 2008). La stretta relazione filogenetica tra *M. africanum* isolato dall'uomo e quello da animali (scimmie e bovini) può indurre a pensare che sia un agente zoonotico, ma si tratta solo di casi sporadici e ad oggi non è stato possibile confermare questa ipotesi (Rahim *et al.*, 2007; Cadmus *et al.*, 2010).

***Mycobacterium orygis* (Bacillus Oryx)**

Inizialmente i bacilli Oryx e dassie erano considerati varianti di *M. bovis*, ma in seguito vennero evidenziate caratteristiche molecolari distinte (Huard *et al.*, 2006). Il bacillo Oryx è stato descritto per la prima volta nel 1976 in Africa orientale come agente eziologico della TB in due orici (*Beisa oryx*) (Lomme *et al.*, 1976). È stato rilevato anche in alcune specie di antilopi come il waterbuck (*Kobus ellipsiprymnus*), l'Oryx Arabo (*Oryx leucoryx*) (van Soolingen *et al.*, 1994; Greth *et al.*, 1994) e il bufalo (*Syncerus caffer*) (van Helden *et al.*, 2009). Dawson *et al.* nel 2012 hanno descritto un caso di trasmissione di *M. orygis* dall'uomo al bovino. Smith e colleghi hanno dimostrato che alcuni isolati, tra cui il ceppo Oryx, presentano caratteristiche distinte e potrebbero essere considerati come gruppo distinto o ecotipo distinto all'interno del MTBC; questo nuovo gruppo è stato chiamato *M. bovis* (antilope). Ceppi di *M. bovis* (antilope) sono stati isolati in Australia da pazienti donne di origine indiana e del Bangladesh. Recentemente, una mutazione nel gene Rv2042c è stata descritta come marcatore genetico per distinguere *M. orygis* dagli altri membri del MTBC (vedi Tabella 1) (van Ingen *et al.*, 2012).

Dassie bacillus e *Mycobacterium mungi*

Il Dassie bacillus prende il nome dal suo ospite più comune, l'irace o dassie (*Procapra capensis*) presenti in Sud Africa e nel Medio Oriente. Un agente patogeno, denominato *M. mungi* e isolato in Botswana da manguste striate (*Mungos mungo*) (Alexander *et al.*, 2010), presenta caratteristiche simili al bacillus dassie. Filogeneticamente sia il bacillo dassie che *M. mungi* sono vicini al gruppo del *M. africanum* West African II (Huard *et al.*, 2006). La prima descrizione risale alla fine del 1950 (Wagner *et al.*, 1958) ma solo nel 2004 fu descritto un marcatore

molecolare specifico per il bacillo dassie (Mostowy *et al.*, 2005). Il bacillo dassie è stato isolato da un irace in cattività importato dal Sud Africa in Australia (Cousins *et al.*, 1994), da un suricato/mangusta (*Suricata suricatta*) in uno zoo svedese (Mostowy *et al.*, 2005) e da un irace selvatico del Sud Africa (van Helden *et al.*, 2009). In uno studio è stata dimostrata la sua ridotta virulenza nelle cavie e nei conigli (Smith, 1965) e, a causa della somiglianza fenotipica con *M. microti* (Smith, 1960), è stato ipotizzato che il bacillo dassie fosse una variante di questo bacillo arvicolo. Tuttavia, il bacillo dassie e *M. microti* non sono strettamente correlati filogeneticamente (Figura 1). I fattori che determinano l'attenuazione dei ceppi di bacillo dassie rimangono ad oggi meramente speculativi (Lewis *et al.*, 2003).

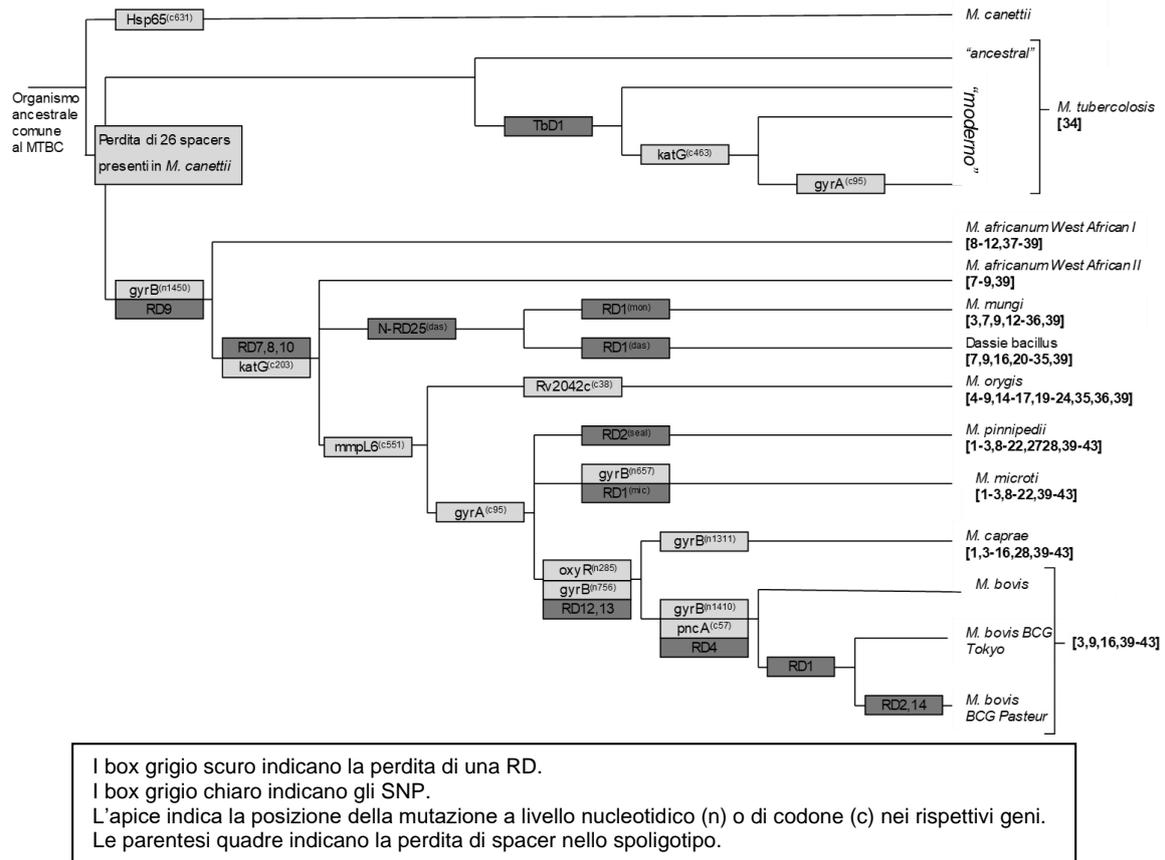


Figura 1. Rappresentazione schematica dell'evoluzione del *Mycobacterium tuberculosis* complex basato sulla presenza/assenza di delezioni genomiche (RD) e polimorfismi a singolo nucleotide (SNP)

Mycobacterium pinnipedii

M. pinnipedii, precedentemente conosciuto come "seal bacillus" (bacillo della foca) per la specie ospite da cui è stato isolato (Forshaw & Phelps, 1991), è stato classificato in base alle sue caratteristiche molecolari come una specie separata del MTBC (vedi Tabella 1) (Cousins *et al.*, 2003). I suoi ospiti naturali sono i mammiferi marini: è stato segnalato sia in leoni marini in cattività sia in animali selvatici in Australia (*Neophoca cinerea*), nell'otaria orsina del Capo

(*Arctocephalus pusillus doriferus*) (Woods *et al.*, 1995) e nelle otarie della Nuova Zelanda (*Arctocephalus forsteri*) (Hunter *et al.*, 1998). È stato anche isolato da un leone marino sudamericano in uno zoo (*Otaria flavescens*), dall'otaria orsina sudamericana (*Arctocephalus australis*) e dall'otaria orsina subantartica (*Arctocephalus tropicalis*) in Uruguay e in Argentina (Bastida *et al.*, 1999). Inoltre, è stato trovato in un tapiro brasiliano (*Tapirus terrestris*) e nell'otaria orsina sudamericana in uno zoo in Gran Bretagna (Cousins *et al.*, 2003). *M. pinnipedii* è in grado di diffondersi dai mammiferi marini ai mammiferi terrestri, come il tapiro malese (*Tapirus indicus*), il cammello della Battriana (*Camelus bactrianus bactrianus*) e l'istrice (*Hystrix cristata*) (Jurczynski *et al.*, 2011); inoltre può infettare i delfini (*Delphinidae*), i lama (*Lama sp.*), e i gorilla (*Gorilla sp.*) (Australian Wildlife Health Network, 2010). Sono stati isolati anche in addestratori di foche che avevano lavorato con colonie di foche in Australia e nei Paesi Bassi, confermando il potenziale zoonotico di questo patogeno (Kiers *et al.*, 2008). Ad eccezione dei pochi isolati trovati negli animali in cattività, i ceppi di *M. pinnipedii* sembrano essere geograficamente localizzati nei mammiferi marini dell'emisfero meridionale.

Mycobacterium microti

M. microti è stato originariamente identificato come agente patogeno di piccoli roditori in Gran Bretagna (*Microtus agrestis*, *Myodes glareolus*, *Apodemus sylvaticus*, *Sorex araneus*) (Wells, 1946), e successivamente isolato anche in altre specie di mammiferi come gatti (*Felis catus*), suini, camelidi sudamericani (Zanolari *et al.*, 2009), tassi (*Meles meles*) (Smith *et al.*, 2009) e cinghiali (*Sus scrofa*) (Boniotti *et al.*, 2014). Nel 1950, *M. microti* è stato utilizzato come vaccino vivo nell'ex Cecoslovacchia (oggi Repubblica Ceca e Slovacchia), nel Regno Unito e nell'ex Rhodesia (oggi Zimbabwe). Sia i vaccini attenuati sia i non attenuati sembravano sicuri ed efficaci, anche se non più efficaci della vaccinazione con il più comunemente usato *M. bovis* BCG. Sono state pubblicate evidenze della protezione contro *M. bovis* in animali vaccinati con *M. microti* (Wells, 1949). Più recentemente, è stato anche descritto come vaccino nei topi di laboratorio ed è stato suggerito come vaccino per i tassi nel Regno Unito (Smith *et al.*, 2009). Tuttavia, *M. microti* è stato identificato come causa d'infezione in pazienti immunocompromessi e immunocompetenti nei Paesi Bassi (van Soolingen *et al.*, 1998), Germania (Niemann *et al.*, 2000), Svizzera (Cavanagh *et al.*, 2002), Inghilterra e Scozia (Xavier Emmanuel *et al.*, 2007), come già era stato visto per il vaccino BCG. È stato anche ipotizzato che *M. microti* possa agire come vaccino naturale nei tassi nel Regno Unito (Smith *et al.*, 2009) e nei cinghiali in Nord Italia (Boniotti *et al.*, 2014). Smith e colleghi (2009) hanno osservato che in aree geografiche dove *M. microti* è presente con prevalenze alte nei gatti, i ceppi di *M. bovis* non riescono a infettare la popolazione locale di tassi e questo potrebbe spiegare la localizzazione geografica ristretta di *M. bovis* nei bovini nel Sud-est della Gran Bretagna. In uno studio condotto dal 2003 al 2011 nel Nord Italia su un totale di circa 23000 cinghiali cacciati è stata rilevata la presenza di *M. microti* con una prevalenza del 5,8% (CI_{p95%}:3,94-7,68%) (Boniotti *et al.*, 2014).

Mycobacterium caprae

M. caprae (Aranaz *et al.*, 2003), precedentemente noto come *M. tuberculosis* subsp. *caprae* (Aranaz *et al.*, 1999) e *M. bovis* subsp. *caprae* (Niemann *et al.*, 2002), forma un gruppo geneticamente distinto all'interno del MTBC. Le principali caratteristiche che differenziano questi isolati dagli altri membri sono una speciale combinazione di polimorfismi nello

pseudogene *oxyR* e nei geni pirazinamidasi PNCA, catalasi (*katG*) e girasi (*gyrA* e *gyrB*) (vedi Tabella 1). In Spagna, *M. caprae* è stato descritto come il principale agente eziologico della TB caprina (Aranaz *et al.*, 1999) ma è presente anche nei cinghiali, nei bovini e negli ovini (*Ovis aries*) (Muñoz-Mendoza *et al.*, 2016). In generale è stato riscontrato in molti Paesi dell'Europa centrale e occidentale e in diverse specie animali: bovini e bufali (Boniotti *et al.*, 2009), suini, cervi (*Cervus elaphus*) (Chiari *et al.*, 2014), cinghiale (*Sus scrofa*) (Machackova *et al.*, 2003), in una tigre siberiana di uno zoo (*Panthera tigris altaica*) (Lantos *et al.*, 2003), in cammelli (*Camelus ferus*), dromedari (*C. dromedarius*) e bisonti (*Bison bison*) (Pate *et al.*, 2006). Per quanto riguarda la trasmissione nei bovini, lo stesso genotipo è stato trovato in isolati provenienti da diversi allevamenti della stessa area indicando la trasmissione del patogeno tra aziende limitrofe. Genotipi identici sono stati trovati anche in bovini e cinghiali, bovini e suini, e in un cammello e un bisonte dello stesso zoo (Pate *et al.*, 2006), suggerendo la trasmissione di *M. caprae* tra queste specie animali.

Mycobacterium bovis

M. bovis è la causa più comune di TB nei bovini e in altri bovidi. Nel 1898, il patologo Theobald Smith ha dimostrato che i bacilli tubercolari isolati dall'uomo e quelli isolati dai bovini differivano nella loro capacità di infettare diverse specie animali (Smith, 1898); nonostante la generale accettazione che *M. bovis* fosse diverso da *M. tuberculosis*, è stato solo nel 1970 che *M. bovis* è stato ufficialmente riconosciuto come specie distinta (Karlson & Lessel, 1970).

I principali ospiti animali di *M. bovis* appartengono alle specie della famiglia dei Bovidae ma è stato isolato anche in altre specie come bisonti, bufali, antilopi, damalisco comune (*Damaliscus korrigum*), kudu (*Tragelaphus* spp.), capre, pecore e camosci (*Rupicapra rupicapra*) (Rodriguez-Campos *et al.*, 2014). In generale, il bovino domestico è la specie più colpita, anche se molti autori hanno speculato su possibili differenze di sensibilità tra le diverse sottospecie di bovini (*Bos taurus* e *Bos indicus*) (Ameni *et al.*, 2007; Smith, 2012). *M. bovis* può causare anche malattia in membri della famiglia dei Suidae, tra cui suini domestici e cinghiali (Rodriguez-Campos *et al.*, 2014). Sono stati riportati anche isolamenti nei cavalli (*Equus ferus caballus*), in cani (Ellis *et al.*, 2006) e gatti. Negli ultimi anni, l'infezione da *M. bovis* è stata rilevata nei camelidi (Camelidae), anche se sono note le difficoltà della diagnosi (Rodriguez-Campos *et al.*, 2014) con le tecniche tradizionali (Buick, 2006). Inoltre, *M. bovis* è stato trovato in varie specie di fauna selvatica, come cervi, daini (*Dama dama*), alci (*Cervus canadensis*), cinghiali, volpi (*Vulpes vulpes*), tassi, linci iberiche (*Lynx pardinus*), coyote (*Canis latrans*), procioni (*Procyon lotor*), lepri (*Lepus* spp.), conigli (leporidi), ricci (*Erinaceidae*), tricosuri volpini (*Trichosurus vulpecula*), coati (*Nasua nasua*), capibara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), leoni (*Panthera leo*) e primati (Rodriguez-Campos *et al.*, 2014). Recentemente, è stato segnalato il primo caso di infezione da *M. bovis* in un pinnipede (foca grigia, *Halichoerus grypus*) (Barnett *et al.*, 2013). Anche l'uomo è suscettibile all'infezione da *M. bovis* e per questo è ritenuto un patogeno zoonotico (Jenkins *et al.*, 2008).

Nel 2003 è stato completato il sequenziamento totale del genoma di *M. bovis* che è risultato essere più piccolo del genoma di *M. tuberculosis* (Garnier *et al.*, 2003). Questo ha portato a presupporre che *M. bovis* si è evoluto da un organismo *M. tuberculosis*-like (Smith *et al.*, 2009). La TB bovina è stata trovata negli allevamenti bovini in tutto il mondo, probabilmente introdotta e distribuita a causa della movimentazione dei bovini domestici (Smith, 2012).

***Mycobacterium bovis* BCG**

Il bacillo di Calmette e Guérin deriva da un ceppo di *M. bovis* isolato da Albert Calmette e da Camille Guérin la cui virulenza è stata attenuata mediante 230 passaggi in un terreno contenente bile per un periodo di tredici anni (dal 1908 al 1921). È dal 1921 che è l'unico vaccino autorizzato per la TB nell'uomo ed è quindi uno dei vaccini più antichi, il più comunemente usato su scala globale, così come uno dei più controversi. Il ceppo attenuato è stato mantenuto in coltura nel corso di decenni generando polimorfismi genetici e quindi una varietà di ceppi di *M. bovis* BCG nei diversi laboratori. Il BCG viene somministrato ai neonati dei Paesi in via di sviluppo e anche nei Paesi in cui la TB è considerata endemica. In linea di principio, è possibile affermare che la sua efficacia, frequentemente posta in discussione, si massimizza nei bambini nel prevenire forme extra-polmonari della malattia. Oggi, si stima che più di un miliardo di persone hanno ricevuto il vaccino BCG.

Marcatori filogenetici

I marcatori genetici sono stati inizialmente utilizzati per classificare i diversi organismi all'interno del MTBC ai fini di un'adeguata diagnosi di laboratorio. Attualmente questi marcatori vengono utilizzati anche per identificare gruppi di isolati correlati, lignaggi o complessi clonali all'interno delle principali specie per studi sia epidemiologici sia filogenetici. Per una descrizione più dettagliata delle tecniche di tipizzazione molecolare è possibile consultare alcune recenti recensioni sull'argomento (Gormley *et al.*, 2014).

La diversità genetica tra gli isolati del MTBC è in gran parte dovuta a grandi polimorfismi di sequenza, come le delezioni genomiche RD (*Regions of Differences*) (Brosch *et al.*, 1998). Poiché queste delezioni rappresentano eventi di evoluzione unidirezionali (regioni che vengono perse e che non possono più essere riacquisite), la loro distribuzione è filogeneticamente informativa (Huard *et al.*, 2003). Inoltre, i micobatteri con un numero maggiore di delezioni RD presentano, come previsto in un organismo clonale, tutte le delezioni presenti anche nei campioni con un numero minore di delezioni (Mostowy *et al.*, 2005). Pertanto, le RD sono state utili per la ricostruzione dell'evoluzione del MTBC e per definire i gruppi clonali all'interno delle specie del MTBC adattate all'ospite (Smith, 2012). Alcune RD possono essere sfruttate per la differenziazione di specie, come per esempio RD9, che differenzia tutti gli altri membri del MTBC da *M. tuberculosis* e *M. canettii*, o RD4, che è assente da tutti i ceppi di *M. bovis*. Di conseguenza, le RD sono state ampiamente utilizzate per l'identificazione rapida di specie mediante PCR (Huard *et al.*, 2003).

L'idoneità di una delezione come marcatore filogenetico dipende dalla sua stabilità e dall'importanza della regione genomica deleta; delezioni in regioni con un alto tasso di mutazione, come le regioni che contengono geni non essenziali o DNA ripetitivo, possono essere più facilmente soggette a eliminazione e quindi non costituiscono marcatori ideali. Per questo motivo, lo *Spoligotyping* e i *Variable Number Tandem Repeats* (Kamerbeek *et al.*, 1997) vengono utilizzati maggiormente in studi epidemiologici piuttosto che in studi filogenetici.

Ciononostante, gli elementi genetici quali le Regioni Ripetute (Direct Repeat) presenti nella tecnica *Spoligotyping* (Kamerbeek *et al.*, 1997) sono state sfruttate oltre che in studi di epidemiologia molecolare, anche nella genetica di popolazione grazie all'evoluzione unidirezionale di questo locus dove avvengono delezioni di singoli spacer o di spacers contigui. Infatti, caratteristici profili di *spoligotyping*, o *spoligotipo*, possono essere utilizzati come indicatori di certi lignaggi o gruppi di *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. caprae* (Smith, 2012).

In alternativa alle delezioni genomiche o alle regioni ripetute possono essere utilizzati polimorfismi nucleotidici singoli (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNP) (Smith, 2012). La tipizzazione tramite SNP si è dimostrata utile per la differenziazione di specie. Tra i polimorfismi utilizzati vi sono quelli nei geni *oxyR*, *pncA*, *katG*, *gyrA*, *gyrB* o il polimorfismo nel gene *lepA* specifico per *M. caprae* (Rodriguez-Campos *et al.*, 2014) (Tabella 1). Molti SNP sono coinvolti nella resistenza ad antibiotici o nella virulenza, come la mutazione nel gene *pncA* o *phoP* (Rodriguez-Campos *et al.*, 2014).

L'uso di SNP per gli studi di filogenesi è in aumento e diversi pannelli di SNP sono stati recentemente utilizzati per l'identificazione di diversi lignaggi di *M. tuberculosis* e di *M. bovis* (Rodriguez-Campos *et al.*, 2014).

Infine, il sequenziamento dell'intero genoma è ora più economico e facilmente applicabile ai ceppi isolati ed è quindi probabile che, in un prossimo futuro, tutte le analisi filogenetiche e di epidemiologia molecolare si basino su questa tecnologia che è in grado di fornire informazioni definitive sul genotipo, sulle relazioni filogenetiche e, forse, anche sui meccanismi di trasmissione come recentemente dimostrato per *M. bovis* (Joshi *et al.*, 2012) e *M. tuberculosis* (Pepperell *et al.*, 2013).

Filogenesi del *M. tuberculosis* complex

La teoria più universalmente accettata della filogenesi dei membri del MTBC si basa sull'analisi delle delezioni genomiche RD e di un gruppo di SNP (Brosch *et al.*, 2002). Questa teoria evolutiva suggerisce che un organismo con caratteristiche essenzialmente simili al *M. tuberculosis* sia l'antenato di tutti i membri del MTBC (Smith *et al.*, 2009). Questi studi hanno dimostrato che i ceppi adattati alle specie animali formano un lignaggio caratterizzato dall'assenza della regione RD9 (Brosch *et al.*, 2002). L'analisi della sequenza delle delezioni RD ha confermato che queste rappresentano un singolo evento nella storia filogenetica del MTBC. Gordon *et al.* (Gordon *et al.*, 2001), tramite l'analisi comparativa dei genomi, hanno rilevato la presenza di una sequenza codificante troncata nei punti di delezione nel genoma di *M. bovis*, a prova che le RD derivano da delezioni del genoma di *M. bovis* piuttosto che da inserzioni nel genoma di *M. tuberculosis* e dimostrando in questo modo che *M. bovis* si è evoluto da *M. tuberculosis* e non viceversa.

Smith e colleghi (Smith *et al.*, 2009) hanno esteso lo scenario evolutivo tracciato da Brosch *et al.* (Brosch *et al.*, 2002) e hanno dimostrato che la perdita di spacers (spoligotype) potrebbe essere utilizzata allo stesso modo delle RD per identificare gruppi evolutivi all'interno del MTBC grazie all'evoluzione unidirezionale della regione DR (Groenen *et al.*, 1993). Questo scenario è coerente con quelli precedenti (Brosch *et al.*, 2002), e include la presenza di un ipotetico progenitore di ogni lignaggio in base all'assenza o presenza di spacers all'interno dello spoligotipo (Smith, 2012). Per esempio, tutti i ceppi con la delezione RD9 non presentano gli spacer 9 e 39, i loro discendenti oltre a questi non presentano anche lo spacer 16 e a loro volta i discendenti di questi non presentano lo spacer 3 e gli spacer da 40 a 43. Inoltre, avendo acquisito elementi che determinano la preferenza d'ospite, suggeriscono la presenza di ecotipi all'interno del MTBC. Secondo Cohan (Cohan, 2002), divergenze limitate all'interno di gruppi di batteri, chiamati ecotipi, potrebbero essere causate da eventi di selezione. In base alle conoscenze attuali sembra improbabile che il primo ceppo che ha causato la TB bovina derivi direttamente da *M. tuberculosis*. È più probabile che un ceppo con la delezione RD9, simile a *M. africanum*, mantenuto nella popolazione umana, abbia dato origine ai lignaggi che si sono adattati alle specie animali. Considerando che la principale localizzazione geografica dei ceppi di *M. africanum* è il continente africano, i lignaggi animali potrebbero essersi evoluti in questo continente (Smith *et al.*, 2009).

Genetica di popolazione e diffusione di *M. bovis* e *M. caprae*

La genetica moderna e le evidenze archeologiche suggeriscono che l'addomesticamento dei bovini europei ha avuto luogo nel vicino Oriente oltre 11000 anni fa, all'inizio del Neolitico (Edwards *et al.*, 2007). Tali studi si basano sul DNA mitocondriale bovino e permettono di formulare un'ipotesi sull'espansione dell'allevamento bovino da una popolazione ancestrale nella Mezzaluna Fertile (tra cui l'Iraq di oggi, Siria, Giordania, Israele, Libano, Cisgiordania e parti di Egitto, Iran e Turchia) (Beja-Pereira *et al.*, 2006). I caprini sono stati addomesticati all'incirca nello stesso periodo nella stessa regione e sono, insieme ai bovini, uno dei primi animali domestici; evidenze di addomesticamento dei caprini sono state trovate anche nella Valle dell'Indo, Cina e Mesoamerica (Boyazoglu *et al.*, 2005).

L'introduzione di bestiame in Europa avvenne con la migrazione via terra delle popolazioni umane, ma anche tramite rotte marittime che portarono bovini di origine nordafricana nei Paesi del Mediterraneo. Probabilmente lo stesso è avvenuto anche per le mandrie caprine. Questo scenario evolutivo è congruente con la demografia del MTBC e la sua associazione con l'ospite umano (Hershberg *et al.*, 2008). Tuttavia, non si sa se la TB bovina e caprina fu introdotta insieme ai primi animali arrivati in Europa oppure se bovini e caprini naïve alla malattia furono infettati successivamente all'arrivo della TB. L'agente patogeno avrebbe poi potuto diffondersi in una nuova nicchia ecologica portando all'espansione clonale dei ceppi fondatori. Ciò è coerente con l'ipotesi che i primi bovini fossero infettati con ceppi ancestrali di *M. bovis* che presentano il massimo numero di spacers nella regione DR. Il più recente antenato comune (*Most Recent Common Ancestor*, MRCA) di tutti i ceppi *M. bovis* e *M. caprae* non aveva gli spacers 3, 9, 16 e 39-43, lo stesso spoligotipo presente nei ceppi del vaccino BCG. Questo antenato sarebbe derivato da un organismo simile a *M. tuberculosis*, che attraverso una serie di discendenti si è evoluto in ceppi con una virulenza e una preferenza d'ospite diversa (Brosch *et al.*, 2002; Mostowy *et al.*, 2005).

La struttura della popolazione attuale di *M. bovis* è il risultato di una serie di espansioni di determinati cloni che raggiungono un'alta frequenza in specifiche popolazioni a livello locale (Smith *et al.*, 2003). Attraverso l'applicazione di tecniche molecolari, è stato possibile raggruppare isolati di *M. bovis* in "complessi clonali", gruppi di isolati che condividono un "antenato" comune identificabile attraverso un marker molecolare stabile, quali specifiche delezioni cromosomiche, SNP o specifici spoligotipi. Un complesso clonale di *M. bovis* ampiamente diffuso anche in Italia è identificato dallo spoligotipo BCG-like (SB0120) (Boniotti *et al.*, 2009).

È interessante notare che *M. caprae* sembra meno diversificato rispetto a *M. bovis*, almeno utilizzando i marcatori epidemiologici attualmente disponibili. Nelle indagini sulle collezioni di isolati presenti in Francia, Portogallo, Italia (Boniotti *et al.*, 2009), e Spagna (Rodriguez *et al.*, 2010) sono stati identificati molti meno spoligotipi di *M. caprae* che di *M. bovis*; probabilmente anche per la minore quantità di isolati di *M. caprae* rispetto a *M. bovis*. Due gruppi principali di isolati di *M. caprae* sono stati identificati sulla base dello spoligotyping: il cluster iberico e il cluster degli isolati dell'Europa centrale e orientale (Prodingler, 2005; Erler *et al.*, 2003). Gli isolati iberici possono essere chiaramente differenziati da *M. bovis* sulla base di un genotipo intatto RD4 (Mostowy *et al.*, 2005). Al contrario, a causa delle differenze nella regione RD4, gli isolati di *M. caprae* provenienti dalle regioni Alpine possono essere suddivisi in tre gruppi, denominati in base all'origine come Allgäu, Lechtal e Karwendel. Queste differenze sono basate sulla presenza di due diverse delezioni associate con la regione RD4.

M. caprae ha una distribuzione geografica più limitata rispetto a *M. bovis*, che è diffuso a livello mondiale. *M. caprae* è stato identificato solo nei Paesi dell'Europa centrale e meridionale (Rodríguez-Campos *et al.*, 2014). Per quanto a nostra conoscenza, *M. caprae* non è mai stato isolato in animali o in pazienti al di fuori dell'Europa continentale, ad eccezione di un bovino in Algeria (Sahraoui *et al.*, 2009), un paziente europeo in Australia e un paziente in Marocco (Rodríguez-Campos *et al.*, 2014).

Implicazioni per la diagnostica

Esiste un esiguo numero di studi sulle potenziali differenze di patogenicità delle diverse specie del MTBC o dei diversi ceppi. Nel caso di *M. tuberculosis* alcune pubblicazioni suggeriscono che la diversità tra ceppi potrebbe essere correlata a differenze nella gravità e infettività della malattia (Caws *et al.*, 2008). Attualmente non è nemmeno noto se il meccanismo alla base della specificità d'ospite ha una base genetica o dipende solo dalla situazione epidemiologica. Negli animali, sia *M. bovis* sia *M. caprae* causano una patologia macroscopicamente simile come pure è simile la localizzazione delle lesioni (presumibilmente collegata alla via di infezione); al contrario, lesioni causate da *M. tuberculosis* nei bovini sono limitate o non visibili (Romero *et al.*, 2011). Un recente studio nel cinghiale ha suggerito che le lesioni prodotte da *M. caprae* mostrano più granulomi nella fase avanzata, cellule giganti multinucleate e conte più elevate di bacilli acido-resistenti rispetto a quelle indotte da *M. bovis*. Questo risultato implica che le infezioni causate da *M. caprae* possono risultare in un maggior numero di bacilli escreti (García-Jiménez *et al.*, 2013).

L'identificazione di tutti i membri del MTBC con i metodi batteriologici classici non presenta restrizioni, in quanto le tecniche di colorazione, i protocolli di decontaminazione del campione e i terreni di coltura selettivi sono comuni a tutti i componenti del gruppo, tranne per l'uso del piruvato, specifico per l'isolamento di *M. bovis* (Gormley *et al.*, 2014).

Per la differenziazione di specie, oltre alle caratteristiche colturali e biochimiche, vengono sempre più utilizzati diversi marcatori molecolari. Inizialmente, sono stati utilizzati bersagli diagnostici presenti in tutti i membri del MTBC, come il 16S rRNA (Böddinghaus *et al.*, 1990), la sequenza di inserzione IS6110 (Hermans *et al.*, 1991), il gene MPB70 (Wilton & Cousins, 1992) e molti altri; questi metodi molecolari non permettono però di distinguere i diversi microrganismi. Negli ultimi due decenni, gli strumenti molecolari sono migliorati e hanno consentito la completa tipizzazione del MTBC a livello di specie o di ecotipo. Ad esempio, l'applicazione di routine della tecnica *spoligotyping* nei laboratori di sanità veterinaria ha permesso di identificare infezioni da *M. tuberculosis* di origine umana nei bovini (Romero *et al.*, 2011). Inoltre, nei casi di TB umana, una corretta identificazione dell'agente causale è essenziale per un'adeguata gestione del paziente (Allix-Béguec *et al.*, 2010) considerando la resistenza intrinseca di *M. bovis* alla pirazinamide, un farmaco somministrato nel classico trattamento di prima linea nell'uomo. Da quando *M. bovis* è stato identificato come causa dell'infezione nell'uomo, invece della pirazinamide, viene utilizzato un trattamento con isoniazide, rifampicina ed etambutolo.

Le numerose tecniche molecolari disponibili per distinguere le diverse specie del MTBC, incluse quelle basate sugli SNP e sulle RD (Gormley *et al.*, 2014), sono sì efficaci ma richiedono strumentazioni e competenze che non sono disponibili in tutti i laboratori.

Implicazioni legislative

M. bovis è considerato l'agente eziologico principale della TB animale e il termine "tubercolosi bovina" è stato spesso usato per indicare un'infezione da *M. bovis* in qualsiasi specie animale. In realtà, secondo la Task Force europea sulla tubercolosi bovina (2006), la TB bovina è un'infezione nel bovino con una delle specie di micobatteri che causano malattia all'interno del MTBC. Inoltre, è una delle malattie nella lista dell'OIE (Organizzazione Mondiale della Sanità Animale) dove anche *M. caprae* è considerato agente eziologico della TB bovina (OIE, 2015; European Commission, 2013), nonostante inizialmente fosse stato definito come l'agente eziologico della TB nelle capre (Aranaz *et al.*, 1999).

M. caprae è stato identificato nei bovini e in altre specie animali sia domestiche sia selvatiche in diverse aree dell'Europa continentale. Ad esempio, in Spagna lo studio dell'andamento temporale di isolati di *M. caprae* ha rivelato che la percentuale di isolati di questo microrganismo da campioni di bovini è aumentata significativamente nel periodo 2004-2009. Inoltre, in questo studio la maggior parte dei bovini infetti da *M. caprae* è stata riscontrata in allevamenti senza alcun contatto con piccoli ruminanti indicando la circolazione del batterio all'interno e tra allevamenti bovini. Molti Paesi dell'Europa centrale, che sono praticamente indenni da TB causata da *M. bovis*, hanno riportato l'isolamento di *M. caprae* (Rodriguez-Campos *et al.*, 2014). Altri Paesi europei colpiti sono la Francia (Haddad *et al.*, 2004), la Grecia (Ikonomopoulos *et al.*, 2006), il Portogallo (Duarte *et al.*, 2010) e l'Italia (Boniotto *et al.*, 2009).

Sia *M. bovis* sia *M. caprae* possono infettare la fauna selvatica ed essere trasmessi dagli animali domestici agli animali selvatici e viceversa. L'identificazione di questi micobatteri in pazienti umani ha evidenziato il loro ruolo anche come agenti patogeni umani (Rodriguez-Campos *et al.*, 2014). L'importanza di entrambi i patogeni è confermata dalla presenza di lesioni che possono essere riscontrate anche nelle ghiandole mammarie di bovini e caprini infetti, così che il consumo di prodotti lattiero-caseari non pastorizzati rappresenta tuttora una preoccupazione e un rischio per la salute pubblica.

Considerando il ruolo di *M. caprae* nella TB animale, in molti Paesi la legislazione pertinente è stata adattata in modo da includerlo al pari di *M. bovis*. Nonostante molte specie animali possano essere infettate sia da *M. bovis* sia da *M. caprae*, l'obiettivo dei programmi di eradicazione attuali sono solo i bovini mentre altre specie domestiche non sono normalmente incluse o lo sono solo in circostanze specifiche, per esempio, quando piccoli ruminanti coesistono con bovini nella stessa azienda, oppure in programmi ad aree.

La direttiva del Consiglio Europeo 64/432/CEE relativa a problemi sanitari in materia di scambi intracomunitari di animali delle specie bovina e suina e modificata dalla Direttiva 98/46/CE e dall'articolo 1 (6) della Direttiva del Consiglio 2000/20/CE, descrive la procedura per classificare e assegnare uno status ufficiale agli allevamenti. In particolare, nell'allegato A si afferma che lo stato di un allevamento è determinato dall'assenza di animali reattivi al test intradermico e dall'assenza di segni clinici di TB. Nel caso di reazioni positive al test, lo stato dell'allevamento viene sospeso. Il punto 3B dell'allegato A della Direttiva 98/46/CE chiarisce che "la qualifica di allevamento ufficialmente indenne da TB viene ritirata se la presenza della TB è confermata dall'isolamento del *M. bovis* in laboratorio." Si pone quindi la questione se la legislazione debba essere modificata per includere *M. caprae* che è stato ampiamente dimostrato essere in grado di persistere e diffondersi tra i bovini e rimane una preoccupazione nei Paesi ufficialmente indenni da TB (*Official Tuberculosis Free*, OTF).

Gli Stati Membri hanno adottato la Direttiva 64/432/CEE e le successive modifiche tramite legislazioni nazionali, regolamenti e disposizioni amministrative. Negli anni successivi, molti Paesi hanno gradualmente modificato la loro legislazione in base alla presenza di TB nei loro territori. Tuttavia, sono ancora presenti differenze sostanziali su quali specie sono considerate

come agente causale della TB bovina e molti Paesi non includono ancora *M. caprae* nella loro legislazione nazionale. Alcuni Paesi europei (Austria, Croazia, Paesi Bassi, Portogallo, Repubblica d'Irlanda e Spagna) considerano il MTBC come agente causale della TB bovina. Altre leggi nazionali comprendono: *M. bovis* e *M. caprae* (Germania), *M. bovis* e *M. tuberculosis* (Norvegia, Svezia), *M. bovis*, *M. caprae* e *M. tuberculosis* (Francia, Portogallo e Svizzera). In alcuni Paesi (Belgio, Cipro, Repubblica Ceca, Finlandia, Italia, Lettonia, Lussemburgo, Norvegia, Slovacchia, Slovenia, Svezia e Regno Unito) *M. caprae* non è ancora incluso tra gli agenti causali della TB bovina. Tuttavia, altri Paesi, in particolare l'Italia, la Norvegia e la Slovenia, hanno adottato misure al fine di revocare lo status di allevamento ufficialmente indenne anche nel caso di isolamento di *M. caprae*. Probabilmente la necessità di modificare la legislazione non viene considerata urgente in quei Paesi dove lo status OTF è stato raggiunto molti anni fa (Lettonia, Lussemburgo, Norvegia) o dove *M. caprae* non è mai stato rilevato (Repubblica d'Irlanda e Regno Unito). Tuttavia, è stata segnalata la presenza di *M. caprae* in Paesi OTF, come ad esempio in Austria e Germania (Erler *et al.*, 2003), e il manuale dell'OIE (OIE, 2015) fornisce delle linee guida per l'esame diagnostico e per le implicazioni legali derivanti dall'infezione da *M. caprae*. In Europa centrale, *M. caprae* è stato identificato come causa della TB bovina. La malattia causata da *M. caprae* non è considerata sostanzialmente diversa da quella causata da *M. bovis* e gli stessi test possono essere utilizzati per la diagnosi.

Di recente, un gruppo di lavoro della Direzione Generale per la Salute dei Consumatori della Commissione Europea ha prodotto un documento sugli agenti causali della TB bovina (SANCO/7059/2013) che afferma che *M. caprae* è un agente eziologico della TB bovina e che “tutte le disposizioni esplicitamente riferite a *M. bovis* nella Direttiva 64/432/CEE, devono essere intese come applicabili anche a *M. caprae*”. La legislazione italiana – Decreto Ministeriale n. 196 del 22 maggio 1999 e Allegato A e B dell'Ordinanza Ministeriale del 28 maggio 2015, Misure straordinarie di polizia veterinaria in materia di TB, brucellosi bovina e bufalina, brucellosi ovi-caprina, leucosi bovina enzootica (15A04879) (*Gazzetta Ufficiale Serie Generale* n. 144 del 24 giugno 2015) – prevede l'apertura del focolaio nel caso di conferma microbiologica di *M. bovis*. Attualmente però i metodi identificativi utilizzati in Italia non distinguono *M. bovis* da *M. caprae* e quindi nei certificati/rapporti di prova viene utilizzata la dicitura omnicomprensiva *M. bovis* anziché *M. bovis/M. caprae*, assicurando in questo modo che tutti i focolai di TB bovina vengano gestiti correttamente e che tutte le misure di polizia veterinaria vengano sempre applicate.

Conclusioni

La designazione formale dei membri del MTBC è controversa in quanto sono stati considerati specie, sottospecie o ecotipi ospite-specifici a seconda dei criteri tassonomici più o meno rigorosi utilizzati per l'interpretazione. Per convenienza e tradizione il concetto di “specie” basato sulla preferenza d'ospite e su alcune caratteristiche costanti sembra prevalere, soprattutto per riflettere la principale fonte d'infezione negli studi epidemiologici. Tuttavia, considerando la relativa diversità genomica all'interno del MTBC, e in assenza di differenze epidemiologiche, patologiche o fenotipiche significative tra i membri del complesso MTBC, la distinzione di sette o più specie batteriche sembrerebbe ridondante. Al di là dei nomi assegnati il loro ruolo come agenti patogeni rappresenta in ogni caso una preoccupazione per la salute umana e animale, in particolare *M. caprae*. È da sottolineare l'importanza che l'assegnazione di nuovi membri all'interno del MTBC, potenzialmente infettanti per il bovino, potrebbe avere sul controllo della TB a livello giuridico ed economico.

ASPETTI EZIOPATOLOGICI E IMMUNOLOGICI

***M. bovis* (e *M. caprae*) nel bovino**

Vie di infezione e patogenesi

Le vie di infezione del bovino con *M. bovis* sono numerose, con modalità e incidenza diversa a seconda di numerosi fattori (età dell'animale, ambiente, clima, tipologia di allevamento, ecc.). Nelle condizioni comuni di allevamento, la localizzazione delle lesioni indica un coinvolgimento soprattutto dell'apparato respiratorio e dei relativi linfonodi, a seguito di inalazione dei micobatteri (Neill *et al.*, 1994; Whipple *et al.*, 1996), con il 90-95% dei bovini infetti che hanno contratto l'infezione per via respiratoria. Tale riscontro trova conferma nei tentativi di riproduzione sperimentale della malattia mediante modelli *in vivo* di TB bovina, in particolare a seguito di inoculazione per via nasale e intratracheale e a seguito di infezione sperimentale per contatto (Neill *et al.*, 1988). In particolare, alcuni studi (Neill *et al.*, 1988) hanno esaminato l'influenza della dose infettante sulla gravità della malattia, evidenziando che animali che ricevono dosi elevate di *M. bovis* (5×10^5 - 10^6 UFC) per via intranasale o intratracheale sviluppano lesioni multiple diffuse a carico del tratto respiratorio e, in alcuni casi, malattia clinicamente evidente, mentre a dosi inferiori (5×10^2 - 10^4 cfu) il quadro varia da lesioni diffuse ad assenza di lesioni visibili. Infine a dosi ancora inferiori (10^2 cfu) non si ha sviluppo di lesioni e la prova intradermica risulta negativa (Neill *et al.*, 1988).

Una via di infezione secondaria nel bovino è considerata la via alimentare, a seguito di ingestione diretta di *M. bovis* da animali infetti, pascoli, acque o reflui contaminati. La via congenita e quella verticale di infezione sono considerate rare nelle regioni in cui sono stati attuati programmi di eradicazione della TB, così come la via mammaria e quella genitale nel caso di infezione degli organi dell'apparato riproduttivo (Neill *et al.*, 1994). Comunque un singolo bovino infetto può eliminare con il latte una quantità di micobatteri sufficiente a rendere tutto il latte raccolto da un allevamento infettante (Kleeberg, 1994). Infine vanno ancora segnalate la via cutanea e quella iatrogena della ghiandola mammaria (segnalata in conseguenza dell'uso di infusioni contaminate).

Ai fini della trasmissione della malattia, studi sperimentali hanno esaminato l'eliminazione nasale di micobatteri da parte di animali infetti (Neill *et al.*, 1988). In particolare, infezioni con dosi sia elevate ($\sim 10^6$ UFC) che basse ($\sim 10^4$ cfu) di *M. bovis* sono caratterizzate da un periodo iniziale in cui si ha escrezione di micobatteri, seguito da una fase di escrezione intermittente; negli animali con infezione a basse dosi i picchi di escrezione si verificano più tardivamente e in forma più variabile rispetto a quelli infettati a dosi elevate. Mentre in condizioni naturali la maggior parte dei bovini infetti e positivi al test intradermico presentano scarse lesioni e l'escrezione nasale di micobatteri può essere rilevata in un numero limitato di animali (Neill *et al.*, 1988), i dati ottenuti a seguito di infezione sperimentale per via intranasale e intratracheale indicano che il picco di escrezione si verifica nelle fasi precoci dell'infezione. Si ritiene pertanto che la possibilità di trasmissione dell'infezione si possa correlare al livello di escrezione batterica, il quale a sua volta è condizionato dalla dose infettante per l'animale e dalla sua suscettibilità (Morrison *et al.*, 2000).

In caso di infezione per via aerogena, si ritiene che non solo l'inalazione di alcuni bacilli, ma anche una gocciolina di muco proveniente da un soggetto infetto ed eliminatore, che può avere un diametro inferiore ai 5 μm e può contenere da uno a tre bacilli, sia sufficiente a provocare l'infezione (Riley *et al.*, 1959; Neill *et al.*, 1991). Tale gocciolina di muco può raggiungere la

superficie dell'alveolo polmonare e l'infezione è favorita dall'assenza delle ciglia nei settori più distali dell'apparato respiratorio, e in particolare oltre i bronchioli terminali (Langmuir, 1961; Dellman, 1991).

L'adesione dei micobatteri ai macrofagi avviene a livello dei recettori di membrana di questi ultimi; in particolare sarebbero coinvolti i recettori del complemento di tipo 3 (Schlesinger, 1993; Schorey *et al.*, 1997), i recettori del mannosio, i recettori Fc (Armstrong & Hart, 1975) e i recettori tipo scavenger (Zimmerli *et al.*, 1996). Oltre che attraverso l'adesione a questi recettori, è stato dimostrato che i micobatteri interagiscono con il colesterolo della membrana citoplasmatica dei macrofagi per l'ingresso all'interno delle cellule (Gatfield & Pieters, 2000).

A seguito della fagocitosi i micobatteri penetrano all'interno dei macrofagi alveolari e grazie all'inibizione dell'acidificazione dei vacuoli di fagocitosi attraverso una serie di meccanismi, rappresentati principalmente dalla prevenzione della fusione fago-lisosomiale (Armstrong & Hart, 1971; Armstrong & Hart, 1975) danno inizio all'infezione intracellulare. Tale fenomeno è stato associato principalmente a meccanismi quali la presenza di sulfatidi rilasciati dai micobatteri (Goren *et al.*, 1976), esclusione dell'ATPasi lisosomiale (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994), produzione di ureasi (Clemens *et al.*, 1995) e fagocitosi dei micobatteri attraverso recettori del complemento o del mannosio piuttosto che recettori Fc (Schlesinger, 1993). La mancata attivazione dei macrofagi da parte delle citochine rilasciate dai linfociti T sarebbe in ultima analisi responsabile della loro incapacità di eliminare in modo efficace i micobatteri tubercolari.

Appare pertanto evidente che, i macrofagi svolgono un ruolo predominante. Infatti queste cellule rappresentano allo stesso tempo il bersaglio dei micobatteri e le cellule effettrici per il controllo e l'inattivazione dei micobatteri nelle fasi precoci di infezione. Studi *in vitro* infatti hanno dimostrato la capacità dei micobatteri di replicare attivamente in macrofagi bovini (Aldwell *et al.*, 1996; Liébana *et al.*, 2000).

Stando all'interno dei macrofagi, i micobatteri vengono successivamente veicolati attraverso i vasi linfatici ai linfonodi regionali. È importante sottolineare che, oltre all'infezione dei macrofagi alveolari a seguito di inalazione dei micobatteri e localizzazione polmonare, è stata dimostrata, sia a seguito di osservazioni di campo sia di infezione sperimentale nel bovino, l'importanza del coinvolgimento delle tonsille come via di infezione, (Guarda *et al.*, 1995; Palmer *et al.*, 1999). Già precedenti studi hanno dimostrato l'ampio coinvolgimento dei linfonodi del tratto respiratorio superiore (linfonodi retrofaringei, sottomandibolari, e parotidei) in una percentuale variabile dal 23 al 32% degli animali con infezione naturale (Neill *et al.*, 1994; Whipple *et al.*, 1996), mentre successive indagini hanno dimostrato l'importanza delle tonsille come sede primaria di infezione nel bovino (Guarda *et al.*, 1996; Palmer *et al.*, 1999). La localizzazione a tali tessuti sarebbe la conseguenza della penetrazione dei micobatteri tramite goccioline infette nell'orofaringe, a partire da essudato polmonare o da micobatteri penetrati nella cavità orale attraverso la bocca. Resta tuttavia difficile stabilire se le lesioni tonsillari possono essere considerate pre-esistenti oppure conseguenti alle lesioni dei linfonodi retrofaringei.

I successivi eventi nella patogenesi dell'infezione sono influenzati da fattori sia dipendenti dal micobatterio, sia correlati alle caratteristiche dell'ospite e dell'ambiente.

Fattori di virulenza dei micobatteri

La virulenza dei micobatteri svolge ovviamente un ruolo primario nel determinismo dell'infezione. Nonostante non si abbia ancora un quadro completo dei fattori di virulenza dei micobatteri, alcuni di questi sono stati tuttavia studiati in modo esaustivo. I principali fattori di virulenza si riscontrano a livello della parete cellulare, rappresentati in particolare da fattori cordali, solfolipidi, micosidi e lipoarabinomannani. La loro azione si svolge attraverso meccanismi quali la persistenza intracellulare e l'inibizione dell'attivazione dei macrofagi (Toossi

& Ellner, 2000). Sono numerosi gli studi in corso, volti a chiarire con maggior dettaglio i fattori di virulenza responsabili dei processi di infezione, sviluppo della malattia e persistenza nell'ospite. In tal senso sono stati fatti notevoli progressi grazie al sequenziamento del genoma di *M. tuberculosis* e degli studi sull'espressione genica di *M. tuberculosis* e *M. bovis*.

Oltre ai fattori di virulenza, strettamente correlati al micobatterio, studi sperimentali svolti sul bovino hanno altresì evidenziato l'importanza della dose infettante di *M. bovis* nel determinare l'infezione e l'evoluzione della malattia (Neill *et al.*, 1988; Pollock & Neill, 2002).

Resistenza dell'ospite

Per quanto concerne i fattori correlati all'ospite, non è mai stata identificata una resistenza naturale del bovino (*Bos taurus*), che viceversa è stata dimostrata nello zebù (*Bos indicus*). Numerosi studi sono tuttavia stati compiuti sul genotipo del topo con riferimento alla resistenza o alla suscettibilità verso i micobatteri. In questa specie la resistenza è stata correlata al gene *Bgc* (Skamene, 1994), successivamente indicato come *Nramp1* (Blackwell *et al.*, 1994), che agirebbe attraverso un meccanismo riconducibile alla regolazione della disponibilità e del trasporto del ferro (Blackwell, 1996; Govoni & Gros, 1998). Nell'uomo tale meccanismo non avrebbe significato, mentre appare determinante un meccanismo di tipo multi-genetico (Newport & Levin, 1999; North & Medina, 1999). Nonostante nel bovino sia stato identificato un omologo del gene *Nramp1* (Feng *et al.*, 1996), il suo ruolo nel controllo delle infezioni da micobatteri non è stato ancora sufficientemente approfondito.

Nel bovino è stato evidenziato un aumento dell'incidenza della TB all'aumento dell'età (Munroe *et al.*, 2000), probabilmente correlabile alla diminuzione numerica dei linfociti T a recettore $\gamma\delta$ (Mackay & Hein, 1989), il cui ruolo nell'immunità della TB è tuttavia ancora oggetto di indagine.

Risposta immunitaria dell'ospite

L'efficienza della risposta immunitaria dell'ospite, compresa la specie bovina, è anch'essa un fattore in grado di influenzare in modo significativo l'instaurarsi e la progressione dell'infezione da micobatteri. Alcune indagini hanno dimostrato in modo inequivocabile l'importanza dei deficit nutritivi sulla resistenza alla TB. In particolare è stata evidenziata una diminuzione di alcune sottopopolazioni linfocitarie in bovini carenti dal punto di vista nutritivo, così come una correlazione significativa tra pascoli scadenti e una maggiore insorgenza di episodi di TB in mandrie bovine (Griffin *et al.*, 1993), e una maggior suscettibilità all'infezione con *M. bovis* in bovini con carenze nutritive.

È ben nota inoltre l'influenza dello stress sulla risposta immunitaria degli organismi alle infezioni. Nel caso della TB bovina è stato dimostrato l'effetto immunodepressivo della gravidanza nel bovino ai fini dell'infezione con i micobatteri (Kehrli *et al.*, 1989) e l'azione dei corticosteroidi sulla risposta al test intradermico alla tubercolina (Doherty *et al.*, 1995). Non va inoltre trascurato, ai fini della resistenza immunitaria dell'ospite, il possibile effetto immunodepressivo di agenti virali quali il virus della diarrea virale del bovino (BVDV) (Potgieter, 1988; Welsh, 1995). L'infezione da BVDV, in particolare, è stata infatti recentemente associata a una rapida progressione della TB nel bovino (Monies & Head, 1999).

Infine il contatto con micobatteri opportunisti potrebbe interferire con il livello di attivazione del sistema immunitario, attraverso l'acquisizione di una sensibilizzazione verso antigeni comuni ai micobatteri (Rook & Hernandez-Pando, 1996). Le conoscenze sono tuttavia ancora imprecise, in quanto si è altresì rilevata un'assenza di immunità protettiva a seguito di vaccinazione con *M.*

bovis BCG in bovini con risposta immunitaria pregressa a micobatteri opportunisti (Buddle *et al.*, 1995).

L'elusione delle difese attuate dai macrofagi nell'ambito dell'immunità innata, inizia la moltiplicazione dei micobatteri. Le sedi maggiormente interessate da processi tubercolari primari sono i linfonodi retrofaringei mediali, i linfonodi mediastinici e i polmoni (Thoen & Himes, 1986; Whipple *et al.*, 1996) e, a seguito della morte dei macrofagi nelle varie sedi, i micobatteri possono essere disseminati attraverso il torrente circolatorio o la linfa in altri settori dell'organismo.

Se invece la risposta immunitaria è efficace, i macrofagi sono in grado di inattivare i micobatteri e di presentarne gli antigeni, inducendo l'attivazione di popolazioni linfocitarie rappresentate soprattutto da linfociti T CD4⁺. Queste cellule sono in grado di secernere interferone-gamma (IFN- γ) e altre citochine responsabili dell'attivazione "a cascata" di altri macrofagi, a loro volta in grado di inattivare in modo efficace i micobatteri presenti in sede intracellulare. In tale stadio si ha inoltre la produzione di reattivi azotati quali NO da parte dei macrofagi stessi (Nozaki *et al.*, 1997). I macrofagi, di cui la maggior parte origina dal circolo sotto forma di monociti, vengono attratti nella sede di infezione dalle citochine e dalle chemochine secrete principalmente dai linfociti T. Nei tessuti infetti i macrofagi proliferano attivamente e assumono una morfologia caratteristica, che ne ha determinato la denominazione di cellule epitelioidi, in quanto somiglianti da un punto di vista morfologico a cellule epiteliali. Sono infatti caratterizzati da grandi nuclei rotondeggianti, vescicolari, con abbondante citoplasma eosinofilo, numerosi organelli intracitoplasmatici e una membrana citoplasmatica interdigitata con quella delle cellule adiacenti. Spesso tali cellule presentano nel loro citoplasma un'abbondante quantità di micobatteri. Associate alle cellule epitelioidi spesso si riscontra la presenza di cellule giganti multinucleate tipo Langerhans, formate a loro volta dalla fusione di macrofagi attivati. Alla periferia di tali formazioni si vengono a disporre linfociti, plasmacellule e monociti. Con il procedere dell'infezione si sviluppa una fibroplasia periferica, caratterizzata dalla formazione di una capsula connettivale che tende ad arginare il processo (Palmer *et al.*, 1999). Nell'insieme questa struttura rappresenta il granuloma tubercolare.

Con il procedere dell'infezione, la morte dei macrofagi infetti non attivati provocata dai micobatteri, e la risposta immunitaria da ipersensibilità ritardata (da linfociti T CD8⁺ ad azione citolitica sui macrofagi infetti) inducono necrosi centrale di tipo caseoso del granuloma. I micobatteri non sono in grado di sopravvivere nel materiale necrotico centrale del granuloma a causa del basso contenuto di ossigeno e della sua elevata acidità. Si assiste inoltre a una mineralizzazione distrofica, apprezzabile già macroscopicamente al taglio delle lesioni con uno scricchiolio della lama del coltello.

La crescita centrifuga a partire dal granuloma originale procede sotto forma di granulomi satelliti formati dalla diffusione dei bacilli a partire dalla sede originale di replicazione. Più granulomi satelliti possono successivamente convergere a formare uno o più grossi granulomi caseo-sclero-calcifici.

Negli animali suscettibili, i micobatteri possono diffondere rapidamente, in forma libera o veicolati dai macrofagi, attraverso i vasi linfatici o ematici a seguito del coinvolgimento dei rispettivi vasi nel granuloma.

Con il procedere dell'infezione, l'azione delle proteasi e delle nucleasi presenti nella sostanza caseosa può favorire la disseminazione del materiale necrotico ai tessuti adiacenti per contiguità, nonché ai vasi sanguigni, ai linfatici e alle vie preformate (bronchi, ecc.). La diffusione può anche avvenire da un bronco a un altro a seguito di colpi di tosse, oppure all'intestino a seguito dell'ingestione di secreto bronchiale contaminato. Tale fenomeno, garantendo una maggiore disponibilità di ossigeno, consente un'accelerazione della moltiplicazione batterica (Converse *et al.*, 1996). Nella TB disseminata pertanto molti organi svilupperanno dei granulomi, e tra questi

soprattutto rene, fegato, milza, linfonodi periferici, meningi e midollo osseo, oltre a organi comunemente interessati da forme primarie, quali polmone e linfonodi mediastinici.

Nella risposta immunitaria iniziale all'infezione da micobatteri possono essere coinvolte anche altre cellule del sistema immunitario oltre ai linfociti T. In particolare le cellule natural killer (NK), che sono in grado di produrre interferone-gamma (IFN- γ) e possono svolgere un'azione di tipo citolitico (Yoneda & Ellner, 1998), e i granulociti neutrofili, associati alla risposta cellulare precoce in corso di TB sia umana sia bovina.

Allorché i micobatteri, fagocitati dai macrofagi, presentano i propri antigeni alle cellule T, si ha l'inizio della risposta immunitaria acquisita (Figura 2), con conseguente proliferazione clonale e differenziazione delle cellule T. In tal senso il ventaglio della risposta immunitaria che si osserva nella TB bovina è sovrapponibile a quello documentato per la TB umana (Neill *et al.*, 1994), con una netta prevalenza della risposta cellulo-mediata rispetto a quella umorale. La risposta cellulo-mediata è altresì la prima a comparire, mentre quella umorale è evidente negli stadi più avanzati della malattia.

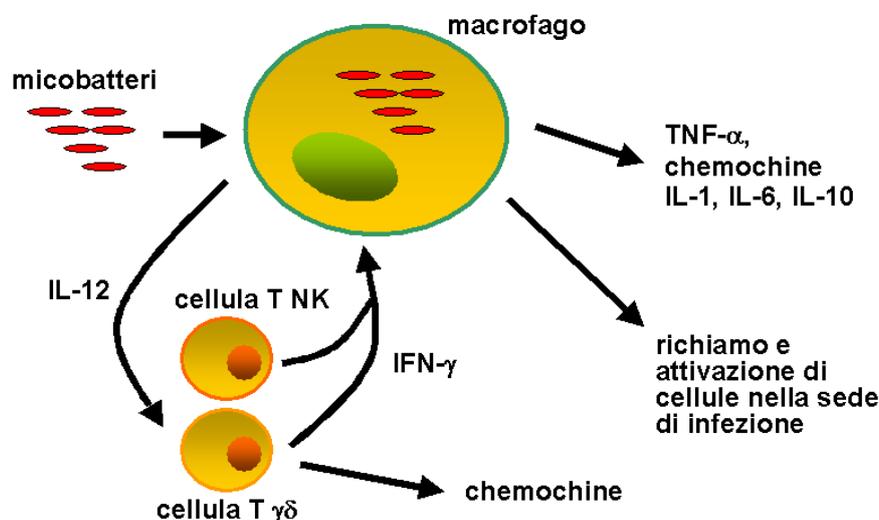


Figura 2. Modello di eventi precoci a livello del polmone, a seguito dell'infezione con micobatteri per via aerogena

I micobatteri vengono fagocitati dai macrofagi alveolari. L'interazione tra micobatteri, cellule T NK e macrofagi può determinare la secrezione di IL-12 che stimola una produzione precoce di IFN- γ da parte delle cellule T NK e delle cellule T $\gamma\delta$. La secrezione precoce di IFN- γ stimola un'ulteriore attivazione di macrofagi, che porta alla morte di alcuni micobatteri e all'ulteriore produzione di IL-12 e di altre. La produzione di TNF- α e di altre citochine e chemochine porta al richiamo e all'attivazione di macrofagi, linfociti e neutrofili nel sito di infezione (Skinner *et al.*, 2001).

La risposta immunitaria cellulo-mediata in corso di infezione tubercolare nel bovino è caratterizzata da un iniziale coinvolgimento delle cellule T $\gamma\delta$. Tale popolazione cellulare, che nel vitello costituisce fino al 70% della popolazione dei linfociti circolanti (mentre nel bovino adulto scende fino a valori del 10-15%), esprime una molecola di superficie del peso molecolare di 215 kDa indicata come WC1, che sembrerebbe coinvolta nel richiamo di quelle popolazioni cellulari responsabili dello sviluppo del granuloma tubercolare, come indicato dalla loro localizzazione preferenziale nelle sedi di infezione iniziale con *M. bovis*, associata a una loro diminuzione dal

pool linfocitario circolante. Successivamente si assiste a un loro nuovo incremento nel torrente circolatorio, parallelamente a un aumento nella percentuale di cellule T attivate esprimenti il recettore per interleuchina-2 (IL-2R o CD25).

Col proseguire del processo infettivo (Figura 3), si assiste in genere a una risposta immunitaria di tipo Th1, con attivazione di linfociti CD4+ (T helper) e CD8+ (Waters *et al.*, 2000). Il coinvolgimento delle sottopopolazioni CD4+ e CD8+ è testimoniato dalla proliferazione di tali cellule prelevate da soggetti infetti e poste in contatto con antigeni di *M. bovis* in presenza di cellule presentanti l'antigene (APC) (Liébana *et al.*, 1999). Inoltre nelle fasi precoci di infezione, il rapporto CD4:CD8 dei linfociti circolanti nel bovino risulta aumentato, indicando un aumento iniziale dei linfociti CD4+, mentre in un secondo tempo tale valore tende a diminuire, indicando pertanto un aumento dei linfociti CD8+.

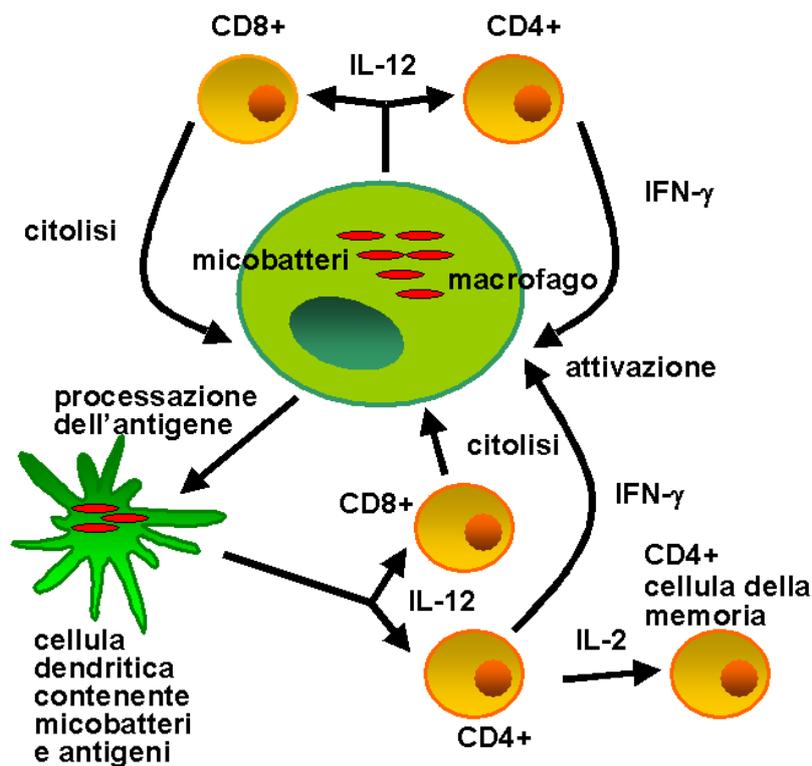


Figura 3. Sviluppo della risposta immunitaria acquisita contro i micobatteri

Gli antigeni dei micobatteri vengono presentati dalle cellule dendritiche ai linfociti CD4+ e CD8+. Sotto la stimolazione dell'IL-12, i linfociti CD4+ mediano una risposta di tipo Th1 e producono IFN-γ, necessario per l'attivazione dei meccanismi intracellulari che portano alla distruzione dei micobatteri. I linfociti CD4+ producono anche IL-2, che contribuisce alla moltiplicazione dei linfociti T e alla generazione di cellule della memoria. I linfociti CD8+ si trasformano in cellule citotossiche e possono distruggere i macrofagi infetti, oltre che distruggere direttamente i micobatteri (Skinner *et al.*, 2001).

I linfociti CD4+ sono in grado di riconoscere gli antigeni dei micobatteri nel contesto del complesso maggiore di istocompatibilità di tipo II (MHC-II) e di attivarsi. Sotto lo stimolo dell'interleuchina-12 (IL-12) e dell'interleuchina-18 (IL-18) secrete dalle cellule presentanti

l'antigene, tali cellule vengono stimulate a produrre una risposta di tipo Th1. Infine un'ulteriore importante funzione delle cellule T CD4+ consiste nel mediare la memoria immunologica (Orme, 1988).

La funzione delle cellule CD8+ è invece non ancora completamente chiarita. Intervendo in fasi più tardive dell'infezione, sono in grado di riconoscere gli antigeni dei micobatteri nell'ambito del complesso maggiore di istocompatibilità di tipo I (MHC I), di liberare IFN- γ in risposta alla presenza di antigeni dei micobatteri, e di svolgere attività citolitica nei confronti di cellule che esprimono gli antigeni dei micobatteri (Serbina *et al.*, 2000). È stato inoltre dimostrato il rilascio di sostanze ad azione anti-batterica da parte di linfociti T CD8+ citotossici (Andreu *et al.*, 1999).

Un ruolo fondamentale dell'intervento di queste popolazioni cellulari è inoltre la produzione di citochine, e in particolare di interleuchina-2 (IL-2), interleuchina-1 (IL-1), interleuchina-6 (IL-6), interleuchina-10 (IL-10), interleuchina-4 (IL-4), IFN- γ e tumor necrosis factor-alfa (TNF- α). Le citochine infiammatorie TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-10 sono coinvolte soprattutto nel richiamo di cellule specifiche del processo infiammatorio nella sede di infezione. Il TNF- α inoltre svolge un ruolo importante nell'organizzazione locale del granuloma, è correlato a una risposta di ipersensibilità ritardata e richiama specificamente monociti circolanti nella sede della lesione. Analogamente anche l'IFN- γ svolge un ruolo importante, consistente soprattutto nel richiamo e attivazione dei macrofagi. Infine l'IL-4, la cui attività è stata dimostrata sia sperimentalmente che in condizioni naturali nel bovino (Rhodes *et al.*, 2000), è stata rilevata circa 2 settimane dopo l'insorgenza di una risposta positiva all'IFN- γ , raggiunge il massimo dopo 8 settimane dall'infezione e quindi declina rapidamente mantenendosi successivamente su valori bassi.

Le cellule del sistema immunitario, che svolgono un ruolo chiave nella risposta all'infezione da micobatteri a seguito della stimolazione operata dalle citochine, intervengono nella produzione di specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) e ossido nitrico (NO) (Carpenter *et al.*, 1998). La produzione di quest'ultimo è stata rilevata anche da parte dei macrofagi alveolari. È noto che tali sostanze svolgono un ruolo importante nell'induzione dell'apoptosi delle cellule infette, meccanismo ben noto per molte specie batteriche tra cui anche *M. bovis* (Bollo *et al.*, 1997; Galietti *et al.*, 1999; Bollo *et al.*, 1999; Bollo *et al.*, 2000; Gutiérrez-Pabello *et al.*, 2002)

Le cellule T svolgono un ruolo fondamentale nella lisi dei macrofagi infetti, operata in particolare sia dalle cellule CD4+ che CD8+, come dimostrato da recenti esperimenti *in vitro* su un modello cellulare di origine bovina (Liébana *et al.*, 2000). L'insorgenza della risposta cellulomediata è inoltre responsabile della formazione del tipico granuloma tubercolare, in cui i monociti, i macrofagi e le cellule T intervengono attorno alla sede di replicazione dei micobatteri al fine di inibirne lo sviluppo. Qualora l'eliminazione dei micobatteri non sia efficace, la progressione del granuloma porta alla formazione di un centro necrotico (in conseguenza dell'ischemia tissutale da danno capillare) con il caratteristico aspetto caseoso. Tale reazione viene indicata come una tipica reazione da ipersensibilità ritardata (Dannenbergh, 1991), il cui significato consisterebbe nel tentativo di controllo della proliferazione dei micobatteri presenti nella lesione, se questi non sono contenuti dai macrofagi locali adeguatamente attivati.

Per quanto riguarda la risposta umorale in corso di TB bovina (tradizionalmente considerata di scarsa importanza ai fini protettivi), le ultime acquisizioni hanno evidenziato la produzione di anticorpi negli stadi avanzati della malattia, in associazione con la progressione dell'infezione (Pollock *et al.*, 2001). Tale situazione raggiungerebbe livelli elevati in particolare negli ultimi stadi della malattia, allorché si instaura una situazione di anergia in presenza di TB disseminata: in tale condizione, parallelamente a un crollo della risposta cellulomediata, si registrano spesso elevati livelli di anticorpi circolanti (Plackett *et al.*, 1989; Neill *et al.*, 1994). Il meccanismo dell'anergia associata agli stadi finali dell'infezione tubercolare non è ancora stato completamente chiarito; nella TB bovina, a fronte di una negativizzazione al test intradermico, si rileva altresì, in

alcuni soggetti in avanzato stato evolutivo dell'infezione, una risposta positiva al test dell'IFN- γ . Tale situazione è stata segnalata altresì in soggetti in fase precoce di infezione, nello stadio di pre-sensibilizzazione al test intradermico (Neill *et al.*, 1994).

Una volta stabilitasi, l'infezione tubercolare può, divenire latente, persistendo per molti anni (Parrish *et al.*, 1998). Il meccanismo responsabile per la comparsa del fenomeno della latenza non è stato ancora pienamente elucidato, sebbene si ritenga che sia un carattere peculiare dei micobatteri che sarebbero in grado di entrare in uno stato di quiescenza per lunghi periodi di tempo (Colston & Cox, 1999). In parte anche la risposta immunitaria dell'ospite sarebbe responsabile dell'induzione e del mantenimento della latenza, in particolare la risposta di tipo Th1 (Howard & Zwillig, 1998), mentre la risposta di tipo Th2 sarebbe associata al fenomeno della riattivazione dei micobatteri (Howard & Zwillig, 1999), così come dimostrato in un modello murino. Il fenomeno della latenza può essere seguito da una riattivazione dei micobatteri, a seguito di condizioni stressanti (spostamenti, deficit nutrizionali, gravidanza, lattazione) o dell'età dell'animale.

Nei soggetti che non riescono a controllare efficacemente l'infezione tubercolare, i processi dell'ipersensibilità ritardata, in concomitanza con l'azione patogena svolta dai micobatteri, si traducono in una progressiva liquefazione del nucleo caseoso solido del tubercolo. Nel materiale caseoso liquefatto, i micobatteri ritrovano un ambiente a loro favorevole nel quale riescono a moltiplicarsi in sede extracellulare. Si verifica pertanto, in sede polmonare, un esteso danno tissutale, con erosione delle pareti dei bronchi contigui, seguita dalla formazione di cavità; queste ultime sono favorite nel loro sviluppo dagli enzimi idrolitici e dai fenomeni dell'ipersensibilità ritardata, in grado di digerire il materiale caseoso solido. Il passaggio di liquidi in queste cavità crea un terreno di coltura ancor più favorevole allo sviluppo dei micobatteri. Le formazioni cavitare presentano tipicamente un nucleo interno di materiale caseoso liquefatto, uno strato intermedio di capillari neoformati, macrofagi, linfociti, granulociti e fibroblasti e una capsula fibrosa esterna. In questa fase, i micobatteri per via bronchiale raggiungono l'ambiente esterno tramite i secreti e i colpi di tosse, costituendo un'importante fonte di contaminazione.

Riassumendo, in Figura 4 è illustrato lo spettro delle risposte immunitarie nel bovino a seguito dell'infezione con *M. bovis* (Pollock & Neill, 2002).

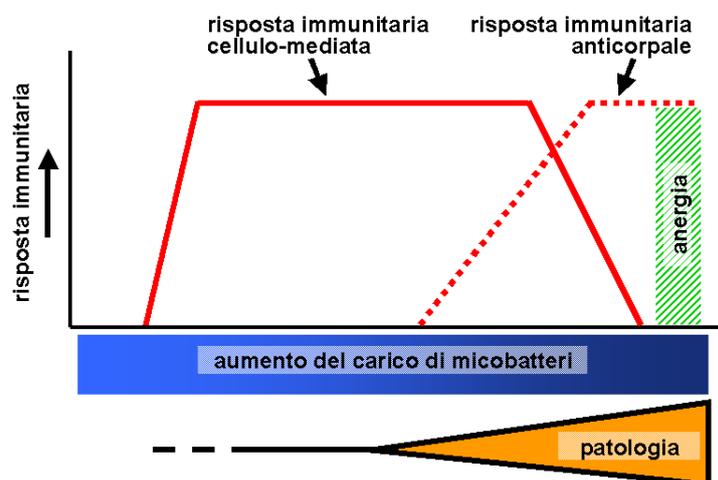


Figura 4. Rappresentazione diagrammatica dello spettro delle risposte immunitarie nel bovino a seguito dell'infezione da *M. bovis*

La risposta immunitaria cellulo-mediata compare per prima, seguita da un aumento della risposta umorale parallela all'aumento del carico di micobatteri. Negli stadi avanzati della

malattia insorge uno stato di anergia, in cui la risposta cellulo-mediata non viene rilevata. Le alterazioni patologiche sono inizialmente associate alla comparsa della risposta immunitaria cellulo-mediata ed evolvono con il progredire della malattia.

Tubercolosi nel bufalo

L'allevamento del bufalo (*Bubalus bubalis*) rappresenta una realtà zootecnica importante in alcune regioni d'Italia come la Campania (75% dell'intero patrimonio nazionale) e il Lazio (17%), ma è presente su tutto il territorio italiano. Di recente si registra una tendenza ad allevare la specie anche in territori in cui fino a qualche decennio addietro non era presente (Lombardia, Veneto). Gli studi epidemiologici indicano che la TB nel bufalo ha una distribuzione globale, essendo stata segnalata in tutti i continenti, sia nello Swamp sia nel River Buffalo (Awad & Mohamoud, 1957; Hein & Tomasovic, 1981; Small & Thomson, 1986; Akhtar *et al.*, 1992; Amin *et al.*, 1992; Kanameda & Ekgat, 1995; Guanzioli *et al.*, 2010; Jha *et al.*, 2007; Javed *et al.*, 2010; Zarden & Marassi, 2013). La prevalenza della malattia nella popolazione dei diversi Paesi del mondo è strettamente correlata all'applicazione o meno di misure di profilassi nazionali e dipende molto dalle differenti pratiche di allevamento (intensivo o brado), nonché dalla promiscuità di allevamento con la specie bovina (Javed *et al.*, 2010), pratica attualmente decrescente sul territorio italiano. Le pratiche di allevamento intensivo a stabulazione libera, piuttosto che estensivo, utilizzate per il bufalo nei diversi Paesi, così come l'età degli animali tenuti in produzione (5-6 parti di media), il numero di animali allevati, le condizioni di biosicurezza spesso insufficienti, il contatto con animali selvatici, dato l'utilizzo di zone di pascolo, le dimensioni dell'allevamento, possono influenzare la diffusione dell'infezione e la prevalenza intraziendale (Javed *et al.*, 2010; Javed *et al.*, 2012; Albernaz *et al.*, 2015; Barbosa *et al.*, 2014; Khattak *et al.*, 2016). Nonostante alcuni studi abbiano indicato il bufalo di età avanzata più sensibile alla TB (Akhtar *et al.*, 1992; Amin *et al.*, 1992; Waqas *et al.*, 2005), risultano ugualmente sensibili alla malattia anche i soggetti giovani (Small & Thomson, 1986; Kanameda *et al.*, 1999), ma percentuali maggiori di positività si riscontrano in soggetti in lattazione (in particolare i più produttivi e nel picco di lattazione), in gravidanza e in asciutta in ordine decrescente (Javed *et al.*, 2010; Barbosa *et al.*, 2014). Di fatto la vita produttiva del bufalo negli allevamenti, che può arrivare anche a 20 anni, offre alla specie maggiori possibilità di infettarsi e sviluppare malattia, spesso in forma cronica (Guanzioli *et al.*, 2010; Khattak *et al.*, 2016), nonché di trasmetterla all'interno dell'allevamento se non prontamente individuata. Come per le altre specie, la dose infettante influenza la precocità e la presenza e la gravità delle lesioni, nonché la percentuale di sensibilità alle prove diagnostiche di campo e di laboratorio.

La specie risulta sensibile a *M. bovis* e *M. caprae*; nello specifico, la genotipizzazione in spoligotyping, effettuata su 365 ceppi di *M. bovis* e 6 ceppi di *M. caprae* provenienti da circa 200 focolai italiani, ha caratterizzato 37 differenti profili, dimostrando che, come per il bovino, lo spoligotipo di *M. bovis* più diffuso nella popolazione bufalina è SB0120, seguito da SB0920, mentre gli spoligotipi rilevati di *M. caprae* sono stati SB0866, SB0415 e SB0418. È rilevante sottolineare che sono stati frequentemente osservati nello stesso allevamento differenti genotipi, suggerendo la presenza di diverse fonti di infezione e la reiterata introduzione del patogeno in allevamento, situazione strettamente correlata alle deficitarie condizioni di biosicurezza degli allevamenti (Ascione *et al.*, 2010; Boniotti *et al.*, 2014). Oltre a *M. bovis* e *caprae*, sono stati di frequente isolati, da organi prelevati al macello da animali infetti, e con lesioni macroscopiche, anche *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. flavescens*, *M. thermoresistibile*, *M. gordonae* e una specie non identificata ma correlata strettamente a *M. moriokaense* (Hein & Tomasovic, 1981; Freitas *et al.*, 2001). Frequenti sono stati anche gli isolamenti di micobatteri ambientali da campioni di latte

provenienti da bufali positivi all'intradermoreazione, quali *M. gordonae* e *M. kansasii* (Jordao Junior *et al.*, 2009) e *M. thermoresistibile*, *M. xenopi*, *fortuitum*, *M. chelonae* e *M. ulcerans* (Jha *et al.*, 2007). *M. bovis* è stato inoltre isolato da tamponi nasali, confermando pertanto anche in questa specie l'escrezione attraverso le prime vie respiratorie e il latte (Akhtar *et al.*, 2015).

Tranne che in rari casi di patologia cronica, nelle fasi acute di malattia non sono registrati segni clinici particolari, e questo costituisce un ulteriore pericolo per la diffusione del patogeno (Guanziroli *et al.*, 2010). Anche gli animali con patologia cronica, generalmente di età superiore ai 5 anni, non presentano spesso segni clinici, al di là di un progressivo dimagrimento (Wakas *et al.*, 2015).

I bufali infetti presentano al macello lesioni pressoché simili a quelle del bovino, con percentuali di rilevamento, rispetto alla positività al test intradermico, del 60,3-72% e lesioni generalizzate, ivi inclusi quadri di TB miliare, nel 27,9%. La localizzazione prevalente è risultata a livello toracico (55-90%), coinvolgendo sia il parenchima sia i linfonodi mediastinici e tracheo-bronchiali, a livello addominale (6,3-20%), con lesioni nei linfonodi mesenterici, periportal e iliaci, nel distretto della testa (20-25%), con lesioni soprattutto alle tonsille e nei linfonodi retrofaringei, ma anche a livello di linfonodi accessori, tra cui gli inguinali profondi e sovramammari (4-9%); sono state segnalate anche lesioni endometriali (Hein & Tomasovic, 1981; Freitas *et al.*, 2001; Ascione *et al.*, 2010; Guanzirol *et al.*, 2010). Alcuni autori hanno descritto lesioni caseose più pallide e meno calcificate che nel bovino e spesso di consistenza lardacea (Hein & Tomasovic, 1981). All'esame istologico, linfonodi successivamente risultati positivi all'esame colturale, non presentavano lesioni tipiche compatibili con TB, in quanto si osservava iperplasia follicolare paracorticale, microascessi e abbondanti colonie basofile, ridondante tessuto fibroso, capsula ingrossata e necrosi follicolare (Guanziroli & Cicuta, 2006).

Il test intradermico è il test utilizzato per la diagnosi di sospetto e in Italia viene eseguito seguendo le modalità di esecuzione e lettura standardizzate per la specie bovina, ma i protocolli, nei diversi Paesi in cui il bufalo è sottoposto a profilassi, sono differenti, sia per i criteri interpretativi alla lettura sia in merito alla zona di inoculo. La valutazione della zona più o meno idonea all'intradermoreazione è oggetto di pareri contrastanti, se si prendono in considerazione, come punti di inoculo, la regione cervicale piuttosto che la piega caudale (Awad & Mohamoud, 1957; Melo *et al.*, 1965; Small & Thomson 1986; Akhtar *et al.*, 1992; Roxo & Amaral, 1998; Kanameda *et al.*, 1999; Guanziroli *et al.*, 2010; Lau, 2013; Barbosa *et al.*, 2014). La reazione cutanea è più o meno evidente in base allo spessore della cute, che varia molto in rapporto all'età dell'animale, che impone un attento utilizzo del cutimetro, e la reazione risulta in genere più evidente rispetto al bovino, probabilmente per il maggiore contenuto di tessuto lasso e fibre elastiche (Guanziroli & Cicuta, 2006). In Regione Campania, in considerazione del metodo di allevamento, la presenza delle corna, la modalità di cattura e contenimento dei soggetti da sottoporre a prova, la zona più utilizzata, nonché imposta dalla normativa regionale, è quella laterale alla spina acromiana della scapola (Decreto Dirigenziale 59/2017). Numerosi sono gli studi effettuati sulla sensibilità e specificità del test intradermico singolo o comparativo nella specie (ossia somministrazione contestuale di PPD bovina e aviaria). Tali studi si basano sulla valutazione della prova intradermica in correlazione al riscontro di lesioni al macello, all'esame istopatologico e all'isolamento di *M. bovis*. Purtroppo l'elaborazione di questi elementi diagnostici produce un dato molto variabile circa la frequenza di false negatività e false positività (Akhtar *et al.*, 1992; Kanameda *et al.*, 1999; Benson, 2000; Pun *et al.*, 2004; Albernaz *et al.*, 2015). È d'altro canto riportato da più studi che nel bufalo è molto alto il numero di risultati dubbi e falsi positivi rispetto al bovino poiché, come per altre specie, i micobatteri ambientali possono transitoriamente stimolare in maniera non specifica l'immunità dell'ospite. Infatti il bufalo ha scarse capacità di termoregolazione, ma è una specie tropicale, più idonea a zone molto calde, dove d'altronde è maggiormente allevato, e la necessità di termoregolazione induce questi animali

a bagnarsi frequentemente e rotolarsi nel fango; è pertanto deducibile che la specie è più esposta a micobatteri opportunisti e ambientali, che potrebbero interferire nella diagnosi di TB. Un fattore influente di poca specificità potrebbe essere l'età (Kanameda *et al.*, 1999), probabilmente per il prolungato contatto con i micobatteri ambientali durante l'intera vita. Per tale motivo, nella maggior parte dei Paesi in cui il bufalo è allevato, la diagnosi è effettuata utilizzando la prova comparativa, rapportandola ai risultati batteriologici e istopatologici. Questa pratica riduce notevolmente il numero di falsi positivi, ma è ignota la percentuale di falsi negativi, poiché risulta anche per questa specie una riduzione della sensibilità della prova comparativa a favore della specificità, come dimostrato dai frequenti riscontri di lesioni tubercolari al macello, in soggetti non reattivi al test in vita (Kanameda *et al.*, 1999; Javed *et al.*, 2010; Albernaz *et al.*, 2015). Per tale motivo, la prova comparativa può essere eseguita in affiancamento alla prova intradermica singola per elevare lo standard prestazionale della prova in vita nei soli allevamenti ufficialmente indenni e mai in aziende focolaio, dove, a causa della diminuzione di sensibilità in prova comparativa, si abbasserebbe la possibilità di individuare tutti i soggetti infetti, pregiudicando di conseguenza l'eradicazione della malattia.

Per la diagnosi della TB nella bufala è stato applicato anche il test dell'interferone-gamma quale prova ancillare alla diagnosi con intradermico. Le performance ottenute indicano buone prospettive applicative, soprattutto utilizzando, tra le altre, anche le PPD sintetiche quali ESAT-6 e CFP10 (Schiavo *et al.*, 2013). Il test ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), standard o anamnastico (sieri collezionati dopo 15 giorni dall'esecuzione del test intradermico) è stato valutato nella diagnosi di TB nel bufalo, ma tale tecnica è tutt'oggi da standardizzare in specificità e sensibilità (Zarden & Marassi, 2013). Il controllo e l'eradicazione della TB nella specie bufalina nelle zone in cui questa specie viene allevata in maniera intensiva sono pertanto strettamente legati alla scrupolosa esecuzione del test intradermico. A questo deve seguire l'immediato allontanamento dei soggetti positivi dall'azienda, la disinfezione delle aree di allevamento con specifici disinfettanti, la scrupolosa applicazione delle procedure di biosicurezza aziendali e l'idoneo campionamento degli organi affetti o meno da lesioni in sede di ispezione anatomopatologica, secondo protocolli molto rigidi. Risulta infatti attualmente più frequente l'isolamento di *M. bovis* da organi NVL. La sistematica ricerca da tutti gli organi campionabili dell'agente eziologico al fine di individuare il ceppo di micobatterio coinvolto, risulta di fondamentale importanza per le valutazioni epidemiologiche territoriali e l'adozione di mirate strategie di lotta alla malattia nelle aree in cui la malattia è presente.

***M. bovis* (e *M. caprae*) in altri animali domestici e selvatici**

I bovini sono considerati i principali ospiti di *M. bovis*, anche se l'infezione è stata riportata in molte specie di animali domestici e selvatici. Da un punto di vista epidemiologico le specie animali suscettibili a *M. bovis* o *M. caprae* possono essere divise in reservoir e spill over. Tra le prime si ritrovano quelle specie che svolgono un ruolo epidemiologicamente attivo; tra le seconde si ritrovano invece quelle specie che, nonostante siano suscettibili all'infezione, hanno scarsa o nessuna capacità di favorire la diffusione ad altri animali (Pesciaroli *et al.*, 2014).

Capra

La TB nelle capre è principalmente causata da *M. caprae* e in misura minore da *M. bovis* (Sharpe *et al.*, 2010). Nonostante ciò le capre possono però essere infettate anche da *M.*

tuberculosis o *M. avium* subspecies *paratuberculosis*. La TB nelle capre è stata riportata in numerosi continenti e si stima che abbia una diffusione cosmopolita alla stregua della TB bovina.

La malattia nelle capre è caratterizzata da tosse secca, emaciazione progressiva e morte (Bezous *et al.*, 2012). L'esame autoptico rileva frequentemente lesioni caseose o caseoso-calcifiche di diversa grandezza e frequentemente incapsulate, localizzate al parenchima polmonare, ai linfonodi mediastinici e mesenterici. Le lesioni indotte da *M. bovis* sono del tutto simili a quelle riscontrate in corso di infezione da *M. caprae* (Bezous *et al.*, 2010). La capra funge da reservoir per la TB bovina e nelle aree endemiche particolare attenzione dovrebbe esser posta nei confronti di questi animali per garantire il successo dei piani di eradicazione della TB bovina (EFSA, 2009; Bezous *et al.*, 2012; Napp *et al.*, 2013; Zanardi *et al.*, 2013).

La diagnosi intra-vitam può essere basata sulla prova dell'intradermoreazione o dell'IFN- γ , ma a differenza di quanto si verifica nel bovino l'approccio diagnostico è ancora scarsamente standardizzato e pertanto ne possono derivare numerosi problemi di interpretazione dei risultati (Bezous *et al.*, 2012)

Pecora

La pecora è suscettibile all'infezione sostenuta da *M. bovis* e *M. caprae* (Munoz Mendoza *et al.*, 2016). Tuttavia, si osserva generalmente una bassa prevalenza nelle aree endemiche (Boukary *et al.*, 2012; Marianelli *et al.*, 2010). Tale bassa prevalenza rispetto ai bovini e alle capre potrebbe essere ascrivibile a diversi fattori. Tra questi, l'allevamento estensivo e il pascolo diurno, unitamente a un comportamento schivo che riduce il contatto tra gli animali, sono fattori che riducono il rischio di contrarre l'infezione.

L'infezione è stata descritta in Spagna (Munoz Mendoza *et al.*, 2012), Italia (Marianelli *et al.*, 2010), Regno Unito (Houlihan *et al.*, 2008; van der Burgt *et al.*, 2013), Nuova Zelanda ed Etiopia (Kassa *et al.*, 2012). Nei casi osservati, le lesioni erano prevalentemente confinate all'apparato respiratorio senza interessamento di quello digerente, anche se sono stati segnalati recentemente casi di TB generalizzata (Marianelli *et al.*, 2010). Le lesioni anatomo-patologiche nella pecora sono assimilabili a quelle del bovino e della capra e ciò potrebbe suggerire che la pecora si infetta per via respiratoria e che possa trasmettere l'infezione ad altri animali, svolgendo quindi un ruolo di reservoir dell'infezione (van der Burgt *et al.*, 2013).

La diagnosi intra-vitam può esser eseguita mediante la prova dell'intradermoreazione, che ha dimostrato avere una sensibilità pari all'81,6% e una specificità del 99,6% (van der Burgt *et al.*, 2013). Il test dell'IFN- γ , nonostante applicabile, non risulta pratica comune.

Suino

Il suino è suscettibile all'infezione da *M. bovis*, che più frequentemente contrae per via digerente. Prima dell'avvento dei piani sanitari di eradicazione della TB, la prevalenza nel suino era strettamente correlata a quella osservata nei bovini. L'associazione epidemiologica sembra esser dovuta al frequente uso di siero di latte proveniente da bovini infetti e usato nell'alimentazione del suino. I piani di eradicazione per la TB nei bovini hanno avuto come effetto secondario la riduzione della prevalenza di TB nel suino. Negli Stati Uniti, infatti, è stato osservato che la prevalenza di lesioni ascrivibili alla TB nei suini macellati è passata dal 15,2% nel 1924 all'1,09% nel 1970 (Acha & Szyfres, 1987). Analogamente in Australia si è passati dal 17% nel 1913 allo 0,84% nel 1928 (Cousins *et al.*, 1998).

Al momento, nei territori dove si effettuano correttamente i piani di eradicazione, la TB nel suino domestico è un evento raro. Ciononostante, il rinnovato interesse verso un allevamento del

suino allo stato brado e semi-brado, quando praticato in zone endemiche, ha notevolmente aumentato i fattori di rischio e la TB in queste realtà risulta riemergente (Bailey *et al.*, 2013).

Le informazioni al momento disponibili circa la TB nel suino sono in larga misura riferite al cinghiale. Appare evidente che la TB non sembra particolarmente contagiosa tra i suidi. In Australia e Nuova Zelanda, in particolare, la bassa prevalenza di forme generalizzate, unitamente a considerazioni eco-epidemiologiche fanno presupporre che il suino svolga un ruolo di spill-over piuttosto che di reservoir (Nugent *et al.*, 2015). Per le stesse considerazioni, in Italia, si presuppone che il cinghiale non possa fungere da reservoir (Serraino *et al.*, 1999). Al contrario, alcune informazioni recentemente acquisite suggeriscono la possibilità che il suino domestico o selvatico possa avere un ruolo maggiormente attivo nella diffusione di *M. bovis* e quindi fungere da reservoir in particolari contesti epidemiologici, caratterizzati da alta endemicità e da alta promiscuità tra suini e ruminanti (Martin-Hernando *et al.*, 2007; Naranjo *et al.*, 2008; Di Marco *et al.*, 2012).

In aree endemiche, la percentuale di suini che presentano all'esame anatomo-patologico lesioni ascrivibili a infezione da *M. bovis* è correlata all'età (Vicente *et al.*, 2006). Le lesioni sono frequentemente localizzate ai linfonodi mandibolari e retrofaringei, anche se casi di generalizzazione non sono infrequenti (Di Marco *et al.*, 2012; Martin-Hernando *et al.*, 2007). Il coinvolgimento di linfonodi che drenano la cavità nasale, la faringe e i polmoni è un elemento che potrebbe suggerire come il suino possa acquisire l'infezione anche attraverso la via respiratoria e che quindi possa anche trasmettere l'infezione attraverso questa stessa via ad altri animali.

Le lesioni sono caratterizzate dal classico granuloma di tipo caseoso-calcifico e generalmente sono circoscritte da una capsula (Bollo *et al.*, 2000; Gortazar *et al.*, 2011; Di Marco *et al.*, 2012). Più raramente si osservano forme miliari.

L'analisi molecolare dei ceppi di *M. bovis* ha evidenziato che, in Spagna e Portogallo, il suino è infetto con gli stessi spoligotipi presenti nei ruminanti. È da sottolineare tuttavia che in Italia è stato osservato che il suino è infetto anche con alcuni spoligotipi non isolati nei ruminanti (Di Marco *et al.*, 2012).

La diagnosi di TB nel suino è effettuata comunemente in fase di ispezione post-mortem e confermata dall'isolamento o dall'identificazione di *M. bovis* in laboratorio. È necessario confermare la presenza di *M. bovis* poiché nel suino tali lesioni possono essere frequentemente causate da *M. avium* (Thorel *et al.*, 2001). La diagnosi intra-vitam può essere effettuata utilizzando il test intradermico (Jaroso *et al.*, 2010), il test dell'IFN- γ (Pesciaroli *et al.*, 2012) o un test ELISA (Boadella *et al.*, 2011). Tali approcci sono al momento poco affidabili perché non completamente standardizzati e perché la presenza sul campo di micobatteri ambientali ne riduce sensibilmente la specificità.

Cavallo

Il cavallo è storicamente considerato molto resistente alla TB (Pavlik *et al.*, 2004). Analogamente a quanto si è osservato nel suino, i piani di eradicazione della TB nel bovino hanno significativamente ridotto i casi anche negli equini e al momento la TB nel cavallo rappresenta un problema modesto e solamente in aree a particolare rischio. Il cavallo acquisisce l'infezione attraverso la via digerente. Le lesioni sono frequentemente circoscritte ai linfonodi mesenterici, sebbene sia stato segnalato il coinvolgimento anche del parenchima polmonare, della milza, del fegato e del tegumento (Pavlik *et al.*, 2004). Le lesioni granulomatose, a differenza di quanto si osserva nei ruminanti, in genere hanno un aspetto lardaceo e istologicamente non si osserva l'estesa necrosi delle cellule che costituiscono il granuloma.

Dal punto di vista diagnostico la prova intradermica non offre un grado accettabile di sensibilità e specificità (Pavlik *et al.*, 2004) e pertanto l'esame post-mortem rimane la strategia più affidabile per verificare lo stato sanitario dell'animale.

Cane

La TB nel cane era un evento piuttosto comune prima dell'applicazione dei piani di profilassi per la TB nei bovini e dell'avvento della pratica di pastorizzazione del latte. Al momento, la TB nel cane è segnalata soprattutto in aree endemiche per la TB bovina (Ellis *et al.*, 2006; van der Burgt *et al.*, 2009). Il cane può contrarre l'infezione attraverso sia la via alimentare sia quella respiratoria e poiché è un efficiente eliminatore attraverso la saliva, le secrezioni nasali, l'urina e le feci, può trasmettere l'infezione ad altri animali suscettibili e all'uomo. Le lesioni nel cane sono simili sia dal punto di vista anatomo-patologico sia da quello istologico a quelle osservabili nel bovino.

La diagnosi intra-vitam non può essere basata sul test intradermico perché non affidabile ma può essere eseguita attraverso il test dell'IFN- γ o mediante PCR (Parsons *et al.*, 2002; Bonovska *et al.*, 2005).

Gatto

Gli agenti causali di forme tubercolari nel gatto, oltre a *M. bovis*, sono *M. microti* e *M. avium*.

L'infezione è più frequentemente acquisita attraverso la via alimentare, anche se le vie inalatoria e cutanea sono comunque possibili.

I segni clinici più frequenti sono la perdita di peso e la linfadenopatia e possono essere esacerbati dai segni di una polmonite. Frequentemente si osserva una generalizzazione precoce che porta a morte l'animale.

Le lesioni sono quelle tipiche della TB con granulomi caseosi nei linfonodi, nel parenchima polmonare e nel fegato. Al pari di quanto si osserva nel cane, anche nel gatto l'intradermoreazione non è affidabile, mentre il test dell'IFN- γ offre maggiori garanzie per un affidabile approccio diagnostico (Rhodes *et al.*, 2008; Rhodes *et al.*, 2011).

***M. bovis* nell'uomo e negli animali: aspetti immunologici e patologici**

M. bovis è l'agente causale della TB bovina ma è in grado di infettare un ampio spettro di ospiti che includono animali selvatici, diversi tipi di animali domestici, primati non umani e l'uomo (Pesciaroli *et al.*, 2014). La TB ha un profondo impatto socio-economico e sulla salute pubblica. La capacità dei batteri di adattarsi a diversi ospiti e di essere trasmessi all'interno o tra diverse specie è una caratteristica che distingue le diverse specie del complesso tubercolare. Ad esempio la trasmissione di *M. bovis* tra uomo e uomo è rara, almeno che non sia in atto una forte compromissione delle risposte immuni associata ad esempio a infezione da HIV, mentre la trasmissione di *M. tuberculosis* tra uomo e uomo è molto diffusa. L'infezione dell'uomo con *M. bovis* può avvenire per inalazione in soggetti che sono a stretto contatto con animali infetti oppure principalmente attraverso il consumo di latte o derivati contaminati. Infatti, prima che il processo di pastorizzazione del latte fosse applicato su larga scala, si stima che il 20-40% dei casi di TB nell'uomo e specialmente nei bambini fosse causato da *M. bovis* (Grange & Collins, 1987).

L'infezione attraverso il consumo di cibo infetto può interessare il tratto respiratorio superiore, l'area faringea e il tratto gastrointestinale. I pazienti adulti contraggono l'infezione da animali infetti attraverso le vie respiratorie e sviluppano la tipica TB polmonare. Inoltre, l'infezione con *M. bovis* negli uomini può determinare una linfadenite cervicale o scrofula, ovvero una lesione extrapolmonare raramente associata all'infezione da *M. tuberculosis* nell'uomo. A tal proposito è stato osservato, mediante uno studio retrospettivo, che tra il 1901 e il 1932, il 91% dei casi di TB con lesioni localizzate nei linfonodi cervicali nei bambini con un'età inferiore a 5 anni era ascrivibile alla presenza di *M. bovis* (Grange & Yates, 1994).

Le ragioni che sostengono questo differente effetto di *M. bovis* da *M. tuberculosis* non sono pienamente note ma è considerazione comune associare il diverso comportamento di *M. bovis* alla sua via di penetrazione. Infatti, poiché la principale via di trasmissione negli uomini esposti a *M. bovis* è mediante il consumo di latte crudo da animali infetti, il patogeno si localizza nei linfonodi regionali e non accede ai linfonodi profondi come invece si verifica nei casi di infezione da *M. tuberculosis*. Tale ipotesi trova conforto nel fatto che l'introduzione del trattamento termico del latte effettuato su scala industriale ha di fatto ridotto sensibilmente il numero dei casi di infezione orale da *M. bovis* e di forme cliniche localizzate ai linfonodi cervicali (Thoen *et al.*, 2006). Nei Paesi industrializzati, negli ultimi 30 anni, *M. bovis* ha rappresentato l'agente causale della TB nell'uomo in una minoranza dei casi rispetto a *M. tuberculosis*. Al contempo però esistono numerose evidenze che suggeriscono come *M. bovis* rappresenti ancora nei Paesi di transizione e in quelli in via di sviluppo un importante rischio per la salute pubblica (De Kantor *et al.*, 2010)

In generale, la TB polmonare nell'uomo causata da *M. tuberculosis* o *M. bovis* è molto simile e non distinguibile dal punto di vista clinico, radiologico o patologico. La TB si manifesta come una malattia cronica, caratterizzata dallo sviluppo di un granuloma principalmente nei polmoni e nei linfonodi polmonari con lo sviluppo di lesioni di tipo caseoso. All'interno del polmone la distribuzione delle lesioni non è uniforme, e nell'uomo le lesioni granulomatose si sviluppano principalmente nella parte apicale dei lobi polmonari. Le lesioni di tipo caseoso, grazie all'azione di diverse proteasi e nucleasi, colliquano con la formazione di ampie zone necrotiche che si frammentano e si trasformano in cavità. All'interno di tali masse necrotiche è presente un elevato numero di batteri che possono essere rilasciati attraverso gli espettorati e la tosse. A questo stadio la malattia è altamente contagiosa (Hunter, 2011). Il granuloma tubercolare si sviluppa grazie all'accumulo di cellule epitelioidei macrofagiche, cellule giganti multinucleate e pochi neutrofili e progredisce verso lesioni costituite da macrofagi, cellule giganti multinucleate e infiltrati di neutrofili con una necrosi centrale. Diversi granulomi possono convergere formando un granuloma più grande con centri di necrosi multipli.

L'interazione tra batteri del genere *Mycobacterium* e gli ospiti vertebrati è estremamente complessa. Il controllo dell'infezione tubercolare avviene attraverso risposte immunitarie di tipo cellulo-mediate. I macrofagi riconoscono e fagocitano i batteri, tuttavia i micobatteri si oppongono alla degradazione operata dai macrofagi, attraverso una strategia che impedisce la formazione dei fagolisosomi, permettendo loro, quindi, di sopravvivere e moltiplicarsi all'interno dei fagosomi. Tale strategia di evasione operata dai micobatteri è ulteriormente potenziata dalla presenza di enzimi batterici in grado di detossificare i radicali liberi dell'ossigeno come l'anione superossido O_2^- , il perossido d'idrogeno H_2O_2 e il radicale ossidrilico $\bullet OH$ o dell'azoto come l'ossido nitrico (NO) e il perossinitrito ($ONOO^-$), prodotti dai macrofagi (Bryk *et al.*, 2002). Nelle prime fasi dell'infezione quindi i micobatteri possono facilmente contrastare le difese orchestrate dai macrofagi, ma l'attività antibatterica dei vertebrati può essere potenziata da un'efficace stimolazione indotta dal comparto cellulo-mediato. All'interno dei macrofagi infatti gli antigeni dei micobatteri sono processati e presentati attraverso le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC di classe I e II) ai linfociti T antigene-specifici che vengono quindi

sensibilizzati e vanno incontro a una espansione clonale che porta alla formazione di una popolazione di linfociti T in grado di opporsi all'infezione. In particolare, i linfociti T CD4⁺ producono INF- γ che è in grado di riattivare il processo di fusione dei fagosomi con i lisosomi e quindi promuovere un efficace controllo dei micobatteri. Inoltre, i linfociti T CD8⁺ sono in grado di riconoscere, attraverso l'MHC di classe I, i macrofagi infetti e di esprimere attività citolitica diretta.

Nonostante l'efficacia teorica della risposta immunitaria antigene-specifica, i micobatteri hanno selezionato nel corso della loro evoluzione una serie di strategie volte a opporsi alla risposta immunitaria e a massimizzare la loro capacità di resistere all'interno dei macrofagi. I micobatteri infatti possono interferire con il riconoscimento da parte dei linfociti T di macrofagi infetti. L'espressione di molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di tipo II (MHC II) è infatti ridotta nelle cellule infette che inoltre secernono citochine immunoregatorie come IL-6, IL-10 e TGF- β . Questa complessa interazione, in cui i sistemi utilizzati dall'organismo vertebrato si oppongono a quelli indotti dai micobatteri, porta a un delicato equilibrio in cui il batterio è sostanzialmente controllato dal sistema immunitario senza essere però eliminato completamente. Ciò si traduce nella possibilità dei micobatteri di sopravvivere e determina un continuo stato di infiammazione che esita nella lesione granulomatosa tipica della TB. Un ruolo particolare nella formazione del granuloma e della lesione granulomatosa è svolto dal TNF- α . La continua produzione di questa citochina ad opera dei macrofagi rappresenta infatti un potente stimolo chemiotattico per i macrofagi che ingolfano progressivamente il sito di infezione primaria e che successivamente subiscono la trasformazione in cellule epitelioidee e in cellule giganti, tipiche del quadro granulomatoso.

Nell'uomo si può instaurare un'infezione latente quando la risposta immunitaria dell'ospite induce il patogeno in uno stato di persistenza in una fase dormiente. In questa condizione, osservata prevalentemente in infezioni da *M. tuberculosis*, i soggetti infetti non presentano sintomi clinici o lesioni osservabili mediante indagini radiologiche. A distanza di anni, però, l'infezione può riattivarsi ed esitare in una forma clinicamente rilevabile. Non è ancora chiaro se questa particolare condizione sia osservabile anche nelle infezioni da *M. bovis* nel bovino, tuttavia è stato ipotizzato, sulla base delle lesioni osservabili in animali con diversa risposta ai test di intradermoreazione, che possa verificarsi un'esacerbazione della condizione clinica (Cassidy, 2006). Più recentemente, la presenza di animali in grado di reagire positivamente al test di intradermoreazione o al test dell' IFN- γ ma senza lesioni o, al contrario, animali senza lesioni ma da cui è possibile isolare *M. bovis*, potrebbe suggerire una condizione di latenza molto simile a quella riscontrabile nell'uomo.

ASPETTI DIAGNOSTICI NEGLI ANIMALI

Diagnosi *in vivo*: aggiornamenti sui test in uso

La diagnosi *in vivo* di TB bovina, causata principalmente da *M. bovis*, è tuttora problematica poiché gli strumenti diagnostici disponibili manifestano limitazioni di sensibilità (Se) e specificità (Sp), il che ovviamente può incidere negativamente sul riconoscimento degli animali infetti e, in generale, sul progresso dei piani di controllo ed eradicazione della TB verso il loro obiettivo finale. Questi sono basati su attività di screening e di macellazione dei capi risultati positivi, usando prevalentemente l'intradermoreazione con tubercolina PPD (*Purified Protein Derivative*). In particolare, l'intradermotubercolizzazione è riconosciuta dall'OIE e dalla Commissione europea quale test primario di screening per la diagnosi della TB dei bovini (Karolemeas *et al.*, 2012; Schiller *et al.*, 2010). Tra gli altri possibili saggi, il test di secrezione di interferone-gamma (IFN- γ) su sangue intero addizionato di eparina è approvato per l'uso nell'Unione europea dal 2002 (Direttiva 64/432/CEE, modificata dal Regolamento CE 1226/2002), ha ricevuto l'approvazione del Dipartimento dell'Agricoltura degli Stati Uniti nel 2003 (APHIS, 2004), ed è stato accreditato dal Comitato Permanente per l'Agricoltura come test diagnostico ufficiale per TB bovina in Australia nel 1991. La *European Food Safety Authority* (EFSA) ha pubblicato un parere scientifico in cui riconosce che le prestazioni del test IFN- γ con tubercoline PPD sono paragonabili a quelle del test intradermico. Pertanto, il test IFN- γ dovrebbe essere considerato dopo adeguata armonizzazione per l'inclusione nelle prove ufficiali ai fini della concessione e del mantenimento dello stato ufficiale di allevamento indenne da TB e per la certificazione del commercio intra-europeo di bestiame (EFSA, 2012). Per quanto concerne i test anticorpali, questi possono avere un certo ruolo in fasi avanzate dell'infezione, nell'ambito di una caduta della reattività ai saggi di immunità cellulo-mediata e di aumento del carico bacillare (Pollock & Neill, 2002). Tale risposta anticorpale è diretta verso antigeni immunodominanti quali MPB70 e MPB83 rilasciati da *M. bovis* man mano che l'infezione prosegue verso quadri evolutivi. Questi saggi ELISA sono in genere semplici, rapidi e poco costosi, anche se la sensibilità è in genere inferiore a quella dei saggi di immunità cellulo-mediata.

Saggi diagnostici e piani di controllo

La prevalenza residua della malattia in alcuni Paesi non è intaccata sostanzialmente dai piani di controllo basati su attività di screening e di macellazione dei capi risultati positivi. Ciò può dipendere in taluni casi dalla presenza di ospiti naturali di *M. bovis* nella fauna selvatica, da una sensibilità non ottimale dei test diagnostici e da un'obiettivo riduzione del loro valore di predizione positiva man mano che si riduce la prevalenza di infezione nella popolazione bovina. È questo il caso di molte Regioni italiane, in cui la prevalenza di infezione si è da tempo assestata a valori <1%.

Lo stato attuale della bonifica sanitaria nei confronti della TB bovina ci deve indurre pertanto a una riflessione globale, in cui sia possibile individuare i limiti della strategia attuale e i presupposti scientifici per un'azione rinnovata e potenzialmente più efficace di miglioramento zoo-sanitario. Il fatto che una parte significativa dei focolai di TB viene rilevata al macello suggerisce che il test intradermico ha alcune limitazioni, oppure che non viene eseguito sempre nel modo più adeguato. In questo senso, un'adeguata formazione dei veterinari addetti è essenziale per garantire l'affidabilità dei risultati.

Esiti dell'infezione da micobatterio tubercolare: riflessi sulla diagnosi *in vivo*

Gli esiti dell'esposizione a *M. bovis* possono essere diversi (Pollock & Neill, 2002); ciò significa che i capi bovini sottoposti a diagnosi possono trovarsi in condizioni radicalmente differenti dopo l'infezione. Tali condizioni possono essere così riassunte:

- se i macrofagi eliminano i micobatteri tubercolari dopo l'interazione primaria nell'albero respiratorio, non si sviluppa infezione e la reattività alla tubercolina PPD è scarsa o nulla;
- se i micobatteri tubercolari rimangono vitali, si può comunque instaurare una condizione di controllo efficace dell'infezione nel sito primario ad opera del sistema immunitario, che può esitare nell'eliminazione dell'infezione (vedi sopra), o nel suo passaggio alla fase di latenza, ovvero a una fase quiescente, non replicativa, in cui i micobatteri tubercolari riducono drasticamente le proprie sintesi macro-molecolari. Anche in tale scenario, la reattività alla tubercolina PPD può essere scarsa (Gideon & Flynn, 2011);
- se i micobatteri rimangono vitali, si può instaurare una condizione di progressione dell'infezione senza un adeguato controllo. In tali condizioni il test tubercolinico è solitamente positivo;
- l'infezione attiva può ripartire da una riattivazione di un'infezione latente, con conseguente positivizzazione tardiva del test intradermico.

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, il 30% circa dell'umanità è infetto in forma latente da micobatterio tubercolare (*M. tuberculosis*). Lo sviluppo della malattia è da riferire essenzialmente a un indebolimento della sorveglianza immunitaria sulla lesione granulomatosa conseguente a stress, malnutrizione, invecchiamento, ecc. Un profilo di risposta immunitaria cellulo-mediata caratterizzato da secrezione preferenziale di interferone-gamma e interleuchina-2 (risposta Th1) mantiene la latenza; uno spostamento verso un profilo Th2 (secrezione preferenziale di IL-4 e IL-10) favorisce la riattivazione. Non sono disponibili prove dirette di infezione latente nel bovino. Vi sono solo prove indirette, di natura circostanziale. In particolare, sono noti casi di comparsa dell'infezione a distanza di anni da un episodio precedente in allevamenti che non avevano introdotto nuovi animali, né avevano avuto altri contatti definibili a rischio.

Risposta immunitaria e prove diagnostiche

La mancata risposta ai test diagnostici d'immunità cellulo-mediata per TB non è ascrivibile a un'unica causa: varie sono le interpretazioni riportate nella letteratura scientifica. Sono stati invocati innanzitutto motivi di compartimentazione del "pool" di linfociti T reattivi, che potrebbero migrare alle lesioni d'organo e non essere così disponibili per la reazione tubercolinica. A tale causa potrebbe affiancarsi anche una secrezione localizzata di citochine ad azione soppressiva come *Transforming Growth Factor* (TGF)- β e IL-10. Nella specie bovina, potrebbe giocare un ruolo importante il fenomeno di soppressione definito "bystander": la presenza di un circuito regolatore a carattere soppressivo verso un singolo antigene può comportare la areattività verso miscele complesse di antigeni come la tubercolina PPD, se queste contengono in effetti l'antigene in questione (Tameni, 1998). L'anergia può corrispondere al "collasso delle resistenze" descritto nei libri di testo o anche all'espressione di fenomeni transitori di regolazione a carattere soppressivo della risposta immunitaria. Tali fenomeni possono aver luogo anche in fasi precoci dell'infezione.

Prestazioni del test intradermico

Tale test costituisce il fondamento dell'attuale strategia di riconoscimento dell'infezione assieme al processo di sorveglianza attiva sui capi macellati. Si basa sull'inoculazione in sede intradermica di un preparato solubile denominato *Purified Protein Derivative* (PPD) derivante dalla coltura *in vitro* di *M. bovis*. I criteri di esecuzione e interpretazione della prova diagnostica sono descritti nel Regolamento (CE) 1226/2002. La reazione alla prova dipende dall'interazione critica delle componenti della tubercolina PPD con cellule dendritiche contenute nel derma, in particolare con le cellule del Langerhans. Queste sono attivate in forma aspecifica da talune componenti della tubercolina come l'arabino-galattano, il peptido-glicano e i lipidi di parete; tali cellule sono in grado di presentare gli antigeni batterici e di secernere fattori chemiotattici per i linfociti T presenti nel circolo ematico. I linfociti T così attirati riconoscono gli antigeni presentati e danno luogo alla reazione di ipersensibilità ritardata (DTH) alla tubercolina PPD. Essa determina un edema localizzato e/o necrosi del derma al punto d'inoculo, da valutare a distanza di 72 ore dall'inoculazione.

Vi sono due fondamentali varianti del test, diversamente applicate nel mondo (Bezoz *et al.*, 2014):

- test SIT (*Single Intradermal Tuberculin*) misura la risposta DTH a tubercolina PPD di *M. bovis* (PPD bovina) nelle regioni medio-cervicali del collo o nella plica caudale (USA, Canada, Nuova Zelanda);
- test SCIT (*Single Intradermal Comparative Tuberculin*) misura la risposta DTH verso PPD bovina e PPD da *M. avium* (PPD aviare) in 2 siti distinti della regione cervicale con l'obiettivo di aumentare la specificità del saggio. L'interpretazione standard del test è descritta nell'Allegato B della Direttiva 64/432/CEE. Il test può essere applicato con differenti criteri interpretativi (standard o più severi) in funzione dello status zoo-sanitario del territorio. Le interpretazioni più rigide sono normalmente applicate per la gestione di focolai in corso di malattia.

Per quanto concerne i problemi di specificità, la co-infezione o la progressiva esposizione a micobatteri non-tubercolari è la principale causa di risultati falsamente positivi (Humblett *et al.*, 2011).

In riferimento invece alla sensibilità del test, oltre a errori soggettivi di esecuzione e a criteri interpretativi erronei, la reazione al test è sicuramente scarsa o nulla in soggetti che eliminano l'infezione tubercolare o che albergano un'infezione latente (mancata induzione di risposta DTH); tale condizione si verifica inoltre nelle prime 3 settimane post-infezione e nelle fasi di anergia e/o di transitoria regolazione a carattere soppressivo della risposta (vedi sopra).

In tale contesto sono stati eseguiti approfonditi studi per determinare i reali livelli di sensibilità e specificità del test intradermico. In generale, i livelli di sensibilità del SIT sono più elevati, mentre quelli di specificità sono in genere inferiori rispetto al SCIT (Bezoz *et al.*, 2014). In studi non recenti, la sensibilità del SIT variava tra l'80 e il 100% (Rua-Domenech *et al.*, 2006). In studi più recenti, tale sensibilità si collocava invece tra il 53% e il 69% in funzione dei criteri interpretativi (Alvarez *et al.*, 2012). Bisogna ovviamente considerare la progressiva selezione nel tempo di bovine da latte ad alta produzione, dotate probabilmente di una minore funzionalità del sistema immunitario anche nel modello TB.

Test intradermico e gestione dei focolai di tubercolosi bovina

I limiti di sensibilità sopra descritti possono comportare problemi operativi di una certa importanza. La risposta al test può essere tardiva e una "coda" di soggetti infetti (in forma probabilmente latente) può sfuggire agli accertamenti, dando così vita a nuovi casi di malattia a

distanza di 1-2 anni. Tale situazione è potenzialmente assai pericolosa in relazione ai requisiti molto stringenti stabiliti dall'Unione Europea per il riconoscimento delle aree indenni. In questo contesto, la letteratura scientifica e l'esperienza di campo dimostrano che l'impiego abbinato all'intradermoreazione di una ulteriore prova di immunità cellulo-mediata quale il test dell'interferone-gamma consente una notevole accelerazione dei tempi della bonifica sanitaria in focolai di TB bovina e di riacquisizione della qualifica sanitaria (EFSA, 2012; Bezos *et al.*, 2014).

Potenza delle tubercoline PPD

La tubercolina PPD impiegata per le reazioni diagnostiche è il prodotto della coltura statica *in vitro* di *M. bovis* per 8-10 settimane in terreno privo di proteina. Nella tubercolina si realizza così un accumulo incontrollato di proteine secrete e di prodotti di autolisi batterica. Il reagente diagnostico può pertanto presentare elevata variabilità in funzione del ceppo di *M. bovis*, del tempo trascorso in coltura e del tipo di terreno di coltura. Per ovviare a questi inconvenienti, il Centro di Referenza Nazionale per la Tuberculosis da *M. bovis* e l'Istituto Superiore di Sanità hanno da tempo promosso l'allestimento di un protocollo unico di produzione, concordato tra gli Istituti Zooprofilattici produttori, in accordo con i requisiti della Farmacopea Europea e dell'OIE (OIE, 2015; Good & Duignan, 2011).

Al di là dei problemi di produzione, la potenza della tubercolina è critica per l'esito dell'intradermoreazione, in quanto il numero di reattori positivi al test è fortemente influenzato dall'attività biologica (potenza) del reagente (Good *et al.*, 2011), che non è correlata con il contenuto di proteina.

L'indicazione di controllare la potenza delle tubercoline nel bovino era contenuta nella formulazione originale della Direttiva 64/432/CEE e fu poi rimossa nel 2002 per i costi elevati e l'impegno logistico e organizzativo molto elevato (Good & Duignan, 2011). Pertanto, il controllo del reagente è basato sul test di potenza su cavie sottoposte a infezione sperimentale 5-7 settimane prima del saggio. Considerazioni fondamentali di benessere animale hanno determinato in molti laboratori l'impiego del ceppo attenuato BCG o del ceppo AN5 inattivato al calore per la sensibilizzazione degli animali. La standardizzazione è basata su 8 o 6 punti di inoculo e 4 o 3 differenti diluizioni della tubercolina in esame, usando come riferimento lo standard internazionale di tubercolina bovina (*National Institute for Biological Standards and Control – NIBSC*, Regno Unito) da 32500 Unità Internazionali (UI)/mg. La tubercolina viene considerata accettabile con una potenza di almeno 2000 UI/dose, compresa tra il 66% e il 150% della potenza dichiarata dal produttore.

Alcune osservazioni di campo suggeriscono che la potenza delle tubercoline valutata nel sistema cavia potrebbe fornire indicazioni imprecise sul livello effettivo di efficacia nel bovino; tale condizione è stata pure osservata sperimentalmente. In particolare, le differenze osservate di potenza delle stesse tubercoline in cavie e bovini sono abbastanza consistenti e suscitano dubbi sulla validità del saggio su cavia (Dobbelaer, 1983). Il ripristino della procedura di controllo nella specie bersaglio potrebbe avere pertanto un fondamento. Si tenga pure presente che il possibile utilizzo degli stessi bovini in saggi successivi distanziati di almeno 60 giorni dovrebbe essere rigidamente limitato a 3-4 prove, in quanto la risposta all'intradermoreazione diminuisce con il passare del tempo dall'infezione; a distanza di 9-12 mesi tubercoline di diversa potenza non sarebbero più riconosciute con precisione; la sensibilizzazione dei bovini con *M. bovis* vivo o inattivato al calore può comportare notevoli differenze tra i risultati (Haagsma, 1986). Sono allo studio anche saggi *in vitro* per rimpiazzare il saggio biologico su cavia (Ho *et al.*, 2006).

Test dell'interferone-gamma

Tale saggio *in vitro* di immunità cellulo-mediata venne sviluppato negli anni novanta del secolo scorso da ricercatori australiani (Wood & Rothel, 1994) e validato nelle condizioni di campo (Wood, 1991; Dondo *et al.*, 1992; Archetti, 1996). I lavori sopra citati chiariscono i fondamenti concettuali del saggio e le sue modalità di applicazione per la diagnosi *ante-mortem* di TB bovina.

Nell'applicazione in campo i vantaggi più evidenti nell'impiego del test IFN- γ nella diagnosi di TB bovina sono legati al fatto che, trattandosi di un saggio eseguito *in vitro*, esso può essere ripetuto senza vincoli temporali, poiché a differenza dell'intradermoreazione non interferisce sul profilo immunitario dell'animale. Va poi sottolineato che la stessa intradermoreazione non costituisce un impedimento all'esecuzione del test IFN- γ , che potrebbe così costituire un utile strumento di verifica di reazioni intradermiche di esito dubbio, non facilmente inquadrabili. Inoltre il test IFN- γ , in contesti e prove di campo differenti, ha dimostrato sensibilità superiore alla prova tubercolinica, come nel caso del Piano Regionale Straordinario per eradicare la TB nelle Province di Torino e Cuneo sopra citato. Infine, poiché è necessario soltanto un prelievo di sangue venoso, è sufficiente un unico intervento in allevamento da parte del Veterinario, il che potrebbe prestarsi a utili armonizzazioni con le profilassi di brucellosi e leucosi. Per quanto attiene ai vantaggi più propriamente pertinenti al laboratorio, è da sottolineare il fatto che rispetto alla prova tubercolinica, su cui è forte l'incidenza della soggettività nella valutazione del risultato, il test IFN- γ si basa su parametri interpretativi oggettivi e di conseguenza è soggetto a controlli di qualità, a procedure standard e si presta a essere adattato alle caratteristiche epidemiologiche del territorio. Infine è in grado di fornire l'esito in tempi rapidi (24 ore). Nelle condizioni dell'allevamento bovino da latte nella pianura padana, la specificità del test si aggira intorno al 95% (Lauzi, 2000).

L'elevato grado di accuratezza che richiedono le varie fasi in cui si articola la metodica può essere considerato un limite. Un'attenzione particolare deve essere osservata sin dal momento del prelievo: è assolutamente importante che il sangue sia prelevato in condizioni di asepsi, in quantità sufficiente (almeno 10 ml) e che sia utilizzata litio-eparina come anticoagulante.

Successivamente, dovendosi preservare la funzionalità cellulare, sono altresì importanti le condizioni e le modalità di trasporto dei campioni: essi devono essere consegnati al laboratorio entro 8 ore dal momento del prelievo senza essere refrigerati, né tantomeno congelati. Un altro vantaggio sostanziale del test IFN- γ è il fatto che i criteri di interpretazione possono essere adattati in base alle condizioni locali, specie alla situazione epidemiologica, alla prevalenza della malattia e alla fase di controllo della TB bovina. Oltre al suo uso approvato dall'UE come test parallelo dell'IDT, in alcuni Paesi si sono adottati protocolli per l'uso di IFN- γ test in fase successiva al test cutaneo per aumentarne la Sp in presenza di sospetti reattori positivi non specifici in regioni con una prevalenza molto bassa di TB bovina.

Una panoramica dei diversi criteri di cut-off per il test IFN- γ nell'Unione europea è stata recentemente pubblicata dall'EFSA (EFSA, 2012). Numerosi studi di settore, condotti in tutto il mondo a partire dal 1991 per confrontare le prestazioni diagnostiche del test cutaneo e del test IFN- γ hanno dimostrato che il test IFN- γ ha una più elevata Se, mentre la Sp è simile o leggermente inferiore a quella del SIT e inferiore a quella del SCIT. Sulla base di una meta-analisi di 15 studi condotti tra il 1991 e il 2006, sono stati segnalati per il saggio BOVIGAM® IFN- γ una media stimata dell'87,6% di Se con un intervallo compreso tra il 73% e il 100% e una Sp del 96,6% con un range tra l'85% e il 99,6% (Rua-Domenech *et al.*, 2006). La maggiore Se del test IFN- γ rispetto al test cutaneo è probabilmente dovuta al fatto che il test IFN- γ rileva animali infetti già 14 giorni dopo l'infezione (Buddle *et al.*, 1995), 60-120 giorni prima del test SCIT (Lilenbaum *et al.*, 1999). Ma ancora più importante, diversi studi nel Regno Unito (Coad *et al.*, 2008) e in Irlanda (Gormley *et al.*, 2006) hanno dimostrato che bovini negativi al test intradermico ma IFN- γ positivi hanno

maggiori probabilità di essere infetti da *M. bovis* rispetto a capi bovini positivi al test intradermico e IFN- γ negativi. La rimozione di tutti gli animali che reagiscono positivamente anche a uno solo dei due test è fondamentale per controllare i focolai di TB bovina.

Infine, la diluizione dei campioni di sangue intero bovino in terreno colturale addizionato di citochine (IL-7 e IL-12) è in grado di estendere fino a 6 giorni il periodo in cui è possibile eseguire il test IFN- γ (Gerace *et al.*, 2016). Tale indicazione lascia prevedere sviluppi molto interessanti, in grado di determinare un impiego assai più diffuso del test IFN- γ in aree remote, in cui risulta obiettivamente difficile consegnare i campioni al laboratorio diagnostico entro 8 ore dal prelievo come previsto dagli attuali protocolli.

Risposta anticorpale e saggi sierologici

La reazione dell'ospite alla TB è prevalentemente rappresentata dall'immunità cellulo-mediata, affiancata, con il progredire della malattia, dalla risposta anticorpale (Pollock & Neill, 2002; McNair *et al.*, 2007; Schiller *et al.*, 2010) (Figura 5).

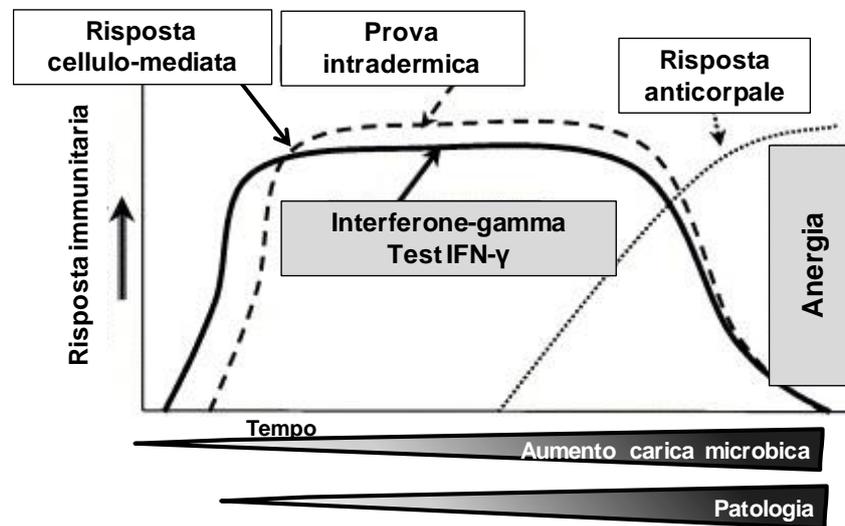


Figura 5. Rappresentazione schematica dello spettro di risposta del sistema immunitario bovino ai vari test per tubercolosi

La produzione di anticorpi, oltre che tardiva, è spesso debole e transitoria probabilmente a causa di un insufficiente consolidamento della risposta anticorpale mediante espressione di immunoglobuline di tipo IgG; la risposta IgM è invece di breve durata in funzione del ridotto periodo di emivita plasmatica di tali immunoglobuline. La Figura 5 rappresenta schematicamente l'evoluzione della risposta immunitaria e la finestra in cui i diversi test *in vivo* possono essere utilizzati con successo. Nel caso d'infezione avanzata e generalizzata può avvenire che gli animali non rispondano alla tubercolina a causa di una risposta cellulo-mediata debole e poco efficiente. Si è ipotizzato che questi animali "anergici", probabilmente malati e altamente infettanti, potrebbero essere la causa di gravi e persistenti focolai. Una certa proporzione di bovini "anergici" può essere rilevata con metodi sierologici (tipo ELISA). Con tale finalità, negli anni novanta del secolo scorso furono sviluppati i primi test sierologici per il rilevamento della TB bovina e umana (Lightbody *et al.*, 1998, Amadori *et al.*, 1998). Generalmente questi test presentavano una sensibilità bassa e

variabile (18-73%) e un'alta specificità, quando paragonati allo skin test e al IFN- γ , e soprattutto quando applicati ad animali ai primi stadi d'infezione (Plackett *et al.*, 1989; Harboe *et al.*, 1990). Recentemente l'interesse nei test sierologici come test diagnostici (Lyashchenko *et al.*, 2000; Koo *et al.*, 2005; Whelan *et al.*, 2010) per rilevare animali infetti non identificati dai test intradermici e test IFN- γ si è rinnovato. L'inclusione di antigeni di *M. bovis* più specifici descritti come potenziali bersagli (p.es. MPB70, MPB83, ESAT-6, CFP10 e altri) ha aperto nuove possibilità. MPB70 è una proteina secreta solubile espressa da *M. bovis* (Harboe *et al.*, 1990; Lightbody *et al.*, 2000) mentre MPB83, identificato come antigene sierodominante (Waters *et al.*, 2006; Lyashchenko *et al.*, 2008) è una lipoproteina glicosilata presente sulla superficie della membrana dei micobatteri. Nel corso di infezioni sperimentali sono state osservate risposte precoci contro MPB83, con un aumento della risposta anticorpale a 3-4 settimane dopo l'infezione (Waters *et al.*, 2006; Waters *et al.*, 2010). Anticorpi contro ESAT-6 e MPB70 sono stati invece rilevati a 12 settimane (Lyashchenko *et al.*, 1998) e 20 mesi (Fifis *et al.*, 1992) dal momento dell'infezione. Alcuni test commercializzati, come il FPA (*Fluorescence Polarization Assay*) (Jolley *et al.*, 2007) o l'ELII (*Enzyme-Linked Immunosorbent Immunochromatographic*) (Koo *et al.*, 2005), utilizzano la proteina MPB70 o parte di essa come antigene immunogenico. In commercio sono presenti diversi test ELISA che utilizzano sia PPDB che proteine singole come MPB83 o MPB70. Nel tentativo di aumentare la sensibilità, recentemente sono stati sviluppati test sierologici che utilizzano un numero più elevato di antigeni. La tecnica MAPIA (*Multi-Antigen Print Immunoassay*) si basa sull'adsorbimento di diversi antigeni specifici (fino a 10) su una membrana che viene poi messa a contatto con i sieri da analizzare (Lyashchenko *et al.*, 2000). Analogamente, il sistema Enferplex TB è in grado di analizzare fino a 20 antigeni depositati su una griglia di polistirene situata all'interno di ogni pozzetto di una piastra da 96 pozzetti (Whelan *et al.*, 2008).

Questi sistemi hanno messo in evidenza che la risposta anticorpale non è uniforme (de la Rua-Domenech, 2006) e che la risposta ai singoli antigeni varia su base individuale, a seconda dello stadio di infezione e della specie animale. Alcuni studi indicano infatti che la risposta anticorpale è più efficiente in specie animali diverse dal bovino, quali il tasso, cervo, elefante, ecc.

Il Centro di Referenza Nazionale per la TB bovina ha a sua volta sviluppato un saggio ELISA che utilizza 4 antigeni ricombinanti e le tubercoline bovina e aviare. La comparazione dei risultati ottenuti con questo test rispetto ai kit commerciali ha mostrato prestazioni comparabili o nettamente superiori.

In Tabella 2 sono riassunte le prestazioni ottenute da alcuni dei diversi saggi sierologici presenti in letteratura (Bezoz *et al.*, 2014).

Va inoltre ricordato che l'inoculazione della tubercolina PPD provoca un effetto "booster" sulla produzione di anticorpi nei soggetti infetti da *M. bovis* (Lightbody *et al.*, 2000). Infatti, il titolo anticorpale di un animale infetto può passare da livelli non rilevabili, prima dell'IDT, a livelli rilevabili dopo una settimana dall'IDT per scendere nuovamente dopo circa 4 settimane. Questo incremento è direttamente proporzionale alla gravità della malattia e alla sua generalizzazione. Questa limitazione ha portato a teorizzare e successivamente a sperimentare, l'utilizzo del test sierologico come test ancillare da utilizzare a focolaio aperto successivamente all'applicazione dello skin test e in parallelo al test IFN- γ per ottenere l'eliminazione del maggior numero possibile di animali infetti. Uno studio recente riporta che di 60 animali con reazione intradermica comparativa negativa o dubbia ma con conferma positiva tramite esame istologico o isolamento culturale, 53 (88,3%) sono risultati positivi al saggio sierologico Enferplex TB (Whelan *et al.*, 2010).

Tabella 2. Sensibilità e specificità dei diversi saggi sierologici utilizzati per la diagnosi della tubercolosi bovina

Saggio	Antigeni	N. di animali sottoposti a test (infetti/non infetti)	Sensibilità* (%)	Specificità* (%)
LBAA ELISA	ESAT-6	59/10	95,7 97,1	100 94,2
LBAA ELISA	ESAT-6, MPB70	320/155	94,8 98,6	92,6 98,5
ELISA	CMP70	62/3	84	100
Enfer multiplex assay	N/A	522/1489	93,1	100
Antigen lateral flow assay	MPB70	522/1489	83,6	83
Antigen printing	MPB83	522/1489	78,5	99,1
	ESAT-6		40,6	86,6
	CFP-10		82,6	69,7
SeraLyte-Mbv	MPB83	90/895	89	98
Enfer multiplex assay	N/A	96/93	77-86,5	77,6-100
Recombinant protein-ELISA	ESAT-6, MPB70, MPB83	107/362	67,3-83,2	86,5-95
ChemBio Lateral flow assay	ESAT-6, CFP-10, MPB83	107/161	45	52,5

*In diversi studi lo stato di infezione si è basato solo sui risultati di altri test diagnostici ante-mortem (non è stato confermato dall'isolamento colturale) e quindi possono essere considerate come sensibilità e specificità apparente. N/A: non disponibile. LBAA: *Latex Bead Agglutination Assay*.

In sintesi, i test sierologici che rilevano gli anticorpi, oltre a essere relativamente economici e semplici da eseguire, possono essere considerati come test ancillari rispetto allo skin test e al test IFN- γ test in bovini negativi appartenenti ad allevamenti sede di infezione cronica confermata o in caso di focolaio.

Ruolo interferente dei micobatteri del gruppo *M. avium/intracellulare*

I dati epidemiologici raccolti indicano un'elevata prevalenza di sensibilizzazione a micobatteri del gruppo *M. avium/intracellulare* nella popolazione suina (Guadagnini *et al.*, 1997) e nella popolazione bovina di allevamenti indenni da TB (Lauzi, 2000). L'esperienza di campo indica che tale sensibilizzazione comporta seri problemi di inquadramento diagnostico della TB bovina. Tali indicazioni sono state pienamente confermate in una prova di infezione sperimentale con *M. bovis* di bovini previamente sensibilizzati da micobatteri del gruppo *M. avium/intracellulare* (Amadori *et al.*, 2002). L'infezione per via endotracheale e per contatto con *M. bovis* ha provocato l'insorgenza di tipiche lesioni tubercolari e *M. bovis* è stato re-isolato dal muco nasale dei bovini infetti per via endotracheale; solo *M. avium* è stato re-isolato invece dai bovini infettati per contatto. Nei bovini infettati per via endotracheale la risposta a 2 tubercoline PPD bovine è stata positiva, mentre una terza ha fallito nella prova comparativa con la PPD aviare. A 4 mesi circa dalla infezione per contatto, la prova tubercolinica comparativa ha dato invece esito negativo. Anche nella prova dell'interferone-gamma il segnale fornito dalla PPD aviare è rimasto molto forte e ha mascherato il segnale fornito dalla PPD bovina soprattutto nei soggetti infettati per contatto. Si può pertanto concludere che la co-infezione da micobatteri del gruppo *M. avium/intracellulare* può comportare un serio ritardo nell'identificazione di bovini infetti da *M. bovis*. In particolare, la risposta

anamnestica verso antigeni cross-reattivi espressi da *M. avium* può prevalere sino allo sviluppo di lesioni granulomatose nei soggetti infetti.

Influsso dell'infezione da micobatterio paratubercolare

Il problema della infezione da micobatterio paratubercolare (MAP) è di cruciale importanza per la prevalenza assai elevata nei nostri allevamenti e il conseguente rischio di reazioni falsamente positive o negative nei saggi diagnostici per TB bovina. In uno studio eseguito in Spagna su un allevamento di tori con infezione mista (*M. bovis* e MAP) (Alvarez *et al.*, 2009), la sensibilità del saggio interferone-gamma venne studiata su 218 animali macellati e sottoposti ai consueti rilievi batteriologici. In questo modello, una sensibilità inferiore venne dimostrata nei soggetti con infezione mista (50%), rispetto ai soggetti infetti solo da *M. bovis* (78,3%). Tale dato è piuttosto allarmante rispetto ai possibili scenari di campo, anche se i dati generati su tori non possono essere automaticamente trasferiti a bovine da latte in lattazione o in asciutta.

Sviluppo di nuovi test

La bassa prevalenza residua dell'infezione in molte aree, l'esposizione a micobatteri del gruppo *M. avium/intracellulare* e ad altri micobatteri ambientali, il difficile accesso ad aree di montagna, le più rigide prescrizioni dell'Unione Europea per il riconoscimento delle aree indenni da TB bovina e la rarefazione degli interventi in tali aree comportano un quadro di obiettiva difficoltà per i piani di controllo ed eradicazione della TB bovina. È pertanto necessario che l'azione di profilassi e di sorveglianza epidemiologica sul territorio sia supportata da ulteriori strumenti di approfondimento diagnostico che consentano interventi tempestivi e mirati, commisurati alla realtà epidemiologica.

Proteine purificate, ricombinanti e peptidi

Proteine del filtrato di coltura di micobatteri tubercolari possono essere recuperate in forma purificata dopo separazione mediante SDS-PAGE ed elettroeluzione delle proteine d'interesse. Le proteine recuperate sono attive nel saggio di intradermoreazione e nel test IFN- γ (Weldingh *et al.*, 2000).

Una singola proteina purificata di *M. bovis* non è in grado di garantire adeguata sensibilità in alcun test diagnostico. Migliori risultati possono essere ottenuti con più proteine e/o peptidi purificati di *M. bovis*, da usare singolarmente o in miscela. Gli antigeni maggiormente utilizzati nel test IFN- γ sono ESAT-6 e CFP-10 (Pollock & Andersen, 1997; Van Pinxteren *et al.*, 2000) espressi dal *M. bovis*, ma assenti nei micobatteri ambientali o nel ceppo BCG e per questo proposti come candidati per i test DIVA (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*) (Vordermeier *et al.*, 2011). Nessuno degli antigeni sottoposti a test sino ad ora singolarmente (Tabella 3) è in grado di fornire la stessa sensibilità del saggio BOVIGAM basato su PPDB (Bezoz *et al.*, 2014). Quando ESAT-6 viene utilizzato come singolo antigene nel test IFN- γ presenta una Se tra il 69% e il 88% (Buddle *et al.*, 2001; Sidders *et al.*, 2008; Schiller *et al.*, 2009) (Tabella 3).

Tabella 3. Sensibilità e specificità del test IFN- γ (BOVIGAM®) in diversi studi nei bovini utilizzando diverse proteine ricombinanti o peptidi o una loro combinazione

Antigene	Proteina ricombinante	Peptide	Sensibilità		Specificità		Referenza
			%	n	%	n	
ESAT-6	x		76	131	99	128	Pollock, 2000
MPB70	x		39	131	95	128	
PPDB-PPDA	x		89	131	92	128	
ESAT-6	x		88	51	99	85	Buddle, 2001
PPDB-PPDA			98	51	85	85	
ESAT-6/CFP10		x	78	68	100	25	Vordermeier, 2001
PPDB-PPDA		x	88	68	92	25	
ESAT-6	x		77	74	93	72	Buddle, 2003
CFP10	x		78	74	93	72	
MPB70	x		49	74	94	72	
ESAT-6		x	80	74	93	72	
CFP-10		x	80	74	92	72	
ESAT-6/CFP-10		x	89	74	93	72	
PPDB-PPDA			95	74	74	72	
ESAT-6	x		69	56	91	56	Aagaard, 2006
CFP10	x		68	56	94	56	
MPB70	x		36	56	89	56	
ESAT-6/CFP-10	x		85	56	97	56	
ESAT-6/CFP-10		x	91	58	93	55	Cockle, 2006
ESAT-6/CFP-10/RV3019c/Rv0288/Rv3879c/Rv3873		x	97	58	93	55	
PPDB-PPDA			85	58	93	55	
Rv3615c		x	37	30	100	10	Sidders, 2008
ESAT-6/CFP-10		x	77	30	100	10	
ESAT-6/CFP-10/Rv3615c		x	91	30	100	10	
RV0899			85	26	100	7	Schiller, 2009
RV0899	x	x	50	18	100	20	
ESAT-6/CFP-10		x	77	26	100	7	
ESAT-6/CFP-10/Rv0899	x	x	96	26	100	7	
PPDB-PPDA			100	26	70	7	

Per aumentare la Se del test IFN- γ mantenendo una Sp elevata, alcuni antigeni sono stati combinati e formulati sia come miscela di proteine ricombinanti che come cocktail di peptidi. In questi studi si dimostra che una combinazione di epitopi di antigeni diversi aumenta la Sensibilità diagnostica senza compromettere la Sp (Buddle *et al.*, 2001). Questi risultati incoraggiano la ricerca di nuovi marcatori per migliorare sempre più gli strumenti diagnostici per il controllo della TB bovina.

Saggio del recettore per l'interleuchina-2

Oltre all'interferone-gamma, altri prodotti di attivazione dei linfociti T possono essere saggiati in test diagnostici per TB bovina. Tra questi va ricordato il recettore per l'interleuchina-2, che può essere analizzato in forma solubile (O'Nuallain, 1997) o associato ai linfociti T in un saggio di citometria a flusso (Ritelli, 2004). Il saggio del recettore per l'interleuchina-2 fornisce risultati analoghi a quelli del saggio interferone-gamma e può contribuire a incrementare la specificità dei referti diagnostici per campioni provenienti da allevamenti di dubbio stato zoo-sanitario.

Scenari futuri

Nel loro complesso i saggi diagnostici ante-mortem *in vitro* hanno contribuito a incrementare la rilevazione delle infezioni da *M. bovis* e hanno ridotto il numero di animali macellati come falsi positivi (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006).

Un possibile sviluppo, potenzialmente assai interessante, sarebbe l'esecuzione di test diagnostici correlati allo stadio d'infezione al fine di realizzare possibili interventi differenziati sui capi infetti e definire su base razionale le priorità per la loro eliminazione dagli allevamenti. È opportuno ricordare a tale proposito l'identificazione mediante NGS da parte di McLoughlin (McLoughlin *et al.*, 2014) di trascritti biomarkers che distinguono i capi bovini con infezione tubercolare attiva o latente, o capi sani non infetti. Approcci analoghi possono essere impiegati per valutazioni di virulenza, mediante prove d'infezione di colture di macrofagi *in vitro*. In queste, *M. bovis* induce un profilo di trascrizione distinto rispetto a *M. bovis* BCG e MAP (Rue-Albrecht *et al.*, 2014). In particolare, l'espressione dei geni codificanti interferoni di tipo I è tipica dei ceppi virulenti di *M. bovis*, con un possibile ruolo pertanto nello sviluppo di TB attiva nel bovino.

Un'altra componente molto importante nell'infezione tubercolare è rappresentata dalle proteine *Suppressor of Cytokine Signaling* (SOCS) 1 e 3, coinvolte nell'inibizione della produzione di IL-12 in cellule dendritiche e della produzione di IFN- γ dopo infezione con micobatteri tubercolari (Delgado-Ortega *et al.*, 2013).

Tali acquisizioni possono essere funzionali allo sviluppo di strategie diversificate e articolate nei piani di controllo ed eradicazione, con un ampliamento tendenziale delle prove diagnostiche impiegate.

Diagnosi *post mortem*: laboratorio e tecniche molecolari di tipizzazione

Gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali presenti sul territorio sono coinvolti principalmente nell'esecuzione e interpretazione degli esami di laboratorio per la conferma diagnostica di TB da animali sospetti. Per animali sospetti si intende:

- animali macellati positivi o dubbi alla prova intradermica;
- animali in cui siano state riscontrate lesioni dubbie compatibili con TB.

Il percorso diagnostico utilizzato presso il Centro di Referenza Nazionale della Tubercolosi da *M. bovis* (CRN-TB) e dagli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS) si basa sui metodi indicati nell'allegato tecnico della normativa nazionale (DM 592/1995) concernente il piano nazionale per l'eradicazione della TB negli allevamenti bovini e bufalini integrato nel corso degli anni con gli aggiornamenti tecnici dell'esame colturale con sistemi liquidi e dei metodi molecolari per il rilevamento diretto di *M. tuberculosis* complex (MTBC) da campioni di tessuto e tipizzazione dei ceppi isolati. Purtroppo gli ultimi aggiornamenti normativi (Ordinanza Ministeriale 28 maggio 2015) non hanno considerato gli aspetti tecnici di laboratorio che sono supportati dalle recenti pubblicazioni, dal capitolo 2.4.6 del *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (OIE, 2015) e dal Regolamento (CE) 1226/2002.

In questo capitolo viene descritto il percorso diagnostico che i Veterinari ispettori seguono per identificare gli animali con TB e gli esami eseguiti presso il CRN-TB e presso gli Istituti Zooprofilattici per isolare e identificare i ceppi micobatterici. Vengono descritti in particolare l'esame macroscopico, il prelievo degli organi, le modalità di trasporto dei campioni e le procedure specifiche applicate in medicina veterinaria per allestire e interpretare gli esami di

laboratorio (istologico, colturale, identificazione, tipizzazione) finalizzati alla diagnosi di TB tenendo conto degli aggiornamenti tecnologici e delle criticità di tutti i passaggi del percorso che portano all'isolamento di *M. bovis*/*M. caprae* considerato il test di riferimento per la conferma diagnostica di TB.

Esame anatomo-patologico

Gli approfondimenti diagnostici per rilevare animali con TB iniziano al macello con la visita ispettiva *post mortem* da parte del Veterinario ispettore. Gli animali sospetti comprendono:

- bovini con reazione positiva o dubbia alla prova tubercolinica;
- bovini provenienti da un focolaio di TB bovina;
- bovini regolarmente macellati in cui sono state riscontrate lesioni sospette al macello;
- animali specificamente segnalati.

Vengono effettuati l'esame ispettivo e il prelievo dei campioni, la cui accuratezza rappresenta uno degli aspetti determinanti per il successo dell'esame batteriologico. Per la messa in evidenza di eventuali lesioni (*Visible Lesions*, VL) si procede all'ispezione degli organi più frequentemente esposti all'infezione tubercolare, in particolare:

- polmoni (organi bersaglio dell'infezione per via aerogena);
- intestino e fegato (organi bersaglio dell'infezione per via digerente);
- tutti i relativi linfonodi regionali.

In assenza di lesioni macroscopiche visibili (*Non Visible Lesions*, NVL) in animali positivi o dubbi alla prova intradermica, una maggiore sensibilità diagnostica si ottiene prelevando alcuni linfonodi da ciascuno dei pacchetti rappresentativi degli apparati digerente, respiratorio e mammario: linfonodi mandibolari, retrofaringei, mediastinici, peribronchiali, periepatici, mesenterici, sopramammari, amigdale e fegato (Gormley *et al.*, 2014; OIE, 2015).

Prelievo e trasporto dei campioni

Un altro dei punti chiave per ottimizzare il recupero di *M. bovis* riguarda le modalità di trasporto e conservazione dei campioni che sono molto importanti per il mantenimento della vitalità dei micobatteri e per limitare la crescita di microorganismi contaminanti. Per questo motivo i campioni devono essere prelevati il più asetticamente possibile, riposti in contenitori sterili e consegnati rapidamente al laboratorio di competenza. La conservazione a $5^{\circ}\pm 3^{\circ}\text{C}$ durante il trasporto non incide negativamente sull'isolamento di *M. bovis* (Gormley *et al.*, 2014; OIE, 2015). In ogni caso i campioni devono essere consegnati entro 48 ore, altrimenti è preferibile congelarli in attesa di sottoporre i campioni all'isolamento.

Schema diagnostico

Il percorso diagnostico presso i laboratori del CRN-TB (Figura 6) prevede l'allestimento dell'esame colturale e l'esame istologico.

Il campione sottoposto a omogenizzazione e decontaminazione, viene suddiviso in due aliquote: una per l'isolamento colturale e uno per la PCR.

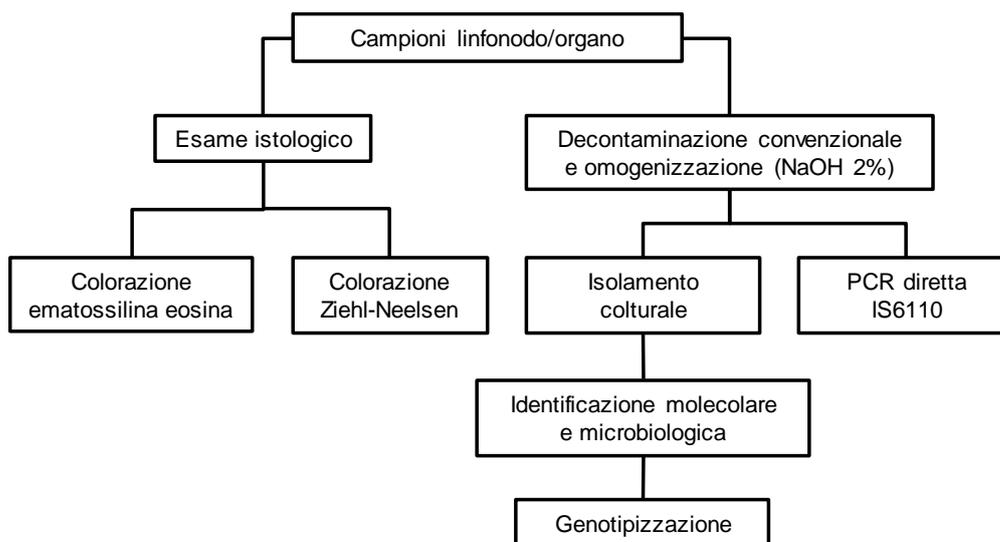


Figura 6. Percorso diagnostico per tubercolosi presso i laboratori del CRN-TB

Esame istologico

L'esame istologico si esegue sui campioni di linfonodi e organi eseguendo dapprima un esame macroscopico e quindi una serie di tagli trasversali a distanza di pochi millimetri uno dall'altro, al fine di evidenziare eventuali lesioni miliari. Viene successivamente campionata una sezione per ciascun linfonodo e organo comprendente le lesioni macroscopiche osservate.

In assenza di lesioni riconoscibili, si campiona almeno una sezione di linfonodo e di organo inviato.

Secondo le normali tecniche istologiche si procede all'inclusione in paraffina e si eseguono delle sezioni seriate di 3µm (almeno 4); una sezione viene colorata con Ematossilina-Eosina e le rimanenti con colorazione di Ziehl-Neelsen.

L'osservazione al microscopio del preparato colorato con Ematossilina-Eosina permette di valutare il tipo di lesione. Le lesioni tubercolari appaiono prevalentemente come processi produttivi, caratterizzate da lesioni nodulari di tipo granulomatoso, conosciute come "tubercoli", di dimensioni variabili, spesso hanno un centro necrotico caseoso o caseo-calcifico e sono circondate da una reazione connettivale diffusa (Guarda *et al.*, 2013).

Se l'osservazione al microscopio della sezione colorata con Ematossilina-Eosina rivela la presenza di lesioni granulomatose compatibili con micobatteriosi, si procede all'osservazione delle sezioni istologiche colorate secondo Ziehl-Neelsen per identificare la presenza/assenza di batteri acido-resistenti.

La colorazione di Ziehl-Neelsen sfrutta le caratteristiche della parete costituita da una struttura stratificata (Brennan, 2003) che determina l'alcool-acido-resistenza rilevata nella colorazione istochimica (Bancroft & Gamble, 2008).

In alcuni casi al fine di valutare la datazione delle lesioni viene applicata la classificazione di Palmer (2007) che identifica 4 stadi di sviluppo così definiti:

- stadio 1 (iniziale), nel quale si osservano granulomi multipli recenti, costituiti da aggregati di cellule epitelioidi e da un limitato numero di linfociti e neutrofili; possono esser presenti

cellule giganti multinucleate e la necrosi è assente. Quando presenti, i bacilli, si trovano nel citoplasma delle cellule epitelioidi o in quello delle cellule giganti. I tempi di sviluppo variano da 7 a 15 giorni.

- stadio 2 (stadio dei granulomi solidi), nel quale si osservano granulomi solidi caratterizzati dall'accumulo di cellule epitelioidi circondate da una sottile capsula connettivale. Possono essere presenti infiltrati di neutrofili, linfociti e cellule giganti multinucleate. La necrosi se presente è minima. Quando presenti, i bacilli, si trovano nel citoplasma delle cellule epitelioidi, delle cellule giganti e nel materiale necrotico. I tempi di sviluppo variano da 15 giorni a un mese.
- stadio 3 (necrotico), nel quale si osservano granulomi a centro necrotico circondato da una zona di cellule epitelioidi frammiste a cellule giganti multinucleate e linfociti e più esternamente completamente circondati da una capsula fibrosa. Quando presenti, i bacilli si trovano nel citoplasma delle cellule epitelioidi, delle cellule giganti e nel materiale necrotico. I tempi di sviluppo sono superiori ai 21 gg.
- stadio 4 (necrotico e mineralizzato), nel quale si osservano granulomi multipli, spesso confluenti, a centro necrotico contenente foci di mineralizzazione distrofica, circondati da una spessa capsula fibrosa. Cellule epitelioidi e cellule giganti multinucleate e spesso infiltrati linfocitari sono osservabili alla periferia delle aree necrotiche. I bacilli acido-resistenti sono più facilmente osservabili nelle aree di necrosi. I tempi di sviluppo sono superiori ai 35 gg.

Esame colturale

Preparazione del campione

Per l'isolamento colturale il materiale prelevato deve essere sottoposto a opportune procedure di omogenizzazione e decontaminazione.

La preparazione dell'omogenato prevede l'eliminazione delle parti grasse, lo sminuzzamento del campione, e l'utilizzo di pestello e mortaio o omogenizzatore a lama o peristaltico.

Un altro fattore chiave che ha un forte impatto sul successo della coltura primaria sono le procedure di decontaminazione che includono la scelta e la concentrazione del decontaminante (Corner & Trajstman, 1988). I trattamenti di decontaminazione utilizzano sostanze chimiche alle quali i micobatteri sono generalmente resistenti rispetto ai microorganismi contaminanti potenzialmente presenti nel campione. Benché la tossicità di questi composti chimici, nei confronti dei batteri alcol-acido-resistenti, sia variabile da prodotto a prodotto, generalmente tutti inducono una riduzione della vitalità delle cellule dei micobatteri (Corner & Trajstman, 1988). Alcuni dei decontaminanti utilizzati a questo scopo, previsti nell'allegato tecnico del DM 592/1995, sono: l'esadecilpiridiniocloruro (HPC, cetilpiridiniocloruro) (Corner *et al.*, 1995), l'acido ossalico (Claxton *et al.*, 1979), l'acido solforico (de Lisle & Havill, 1985) e l'idrossido di sodio (NaOH) (Corner & Trajstman, 1988).

Il decontaminante in uso presso il CRN-TB (NaOH 2-4%) viene lasciato agire per 30 min a 37°C, quindi si centrifuga, il sovrantante viene scartato e il sedimento viene neutralizzato con acido solforico, e dopo controllo del pH, il pellet, risospeso in tampone fosfato viene utilizzato per la semina nei terreni colturali.

Isolamento su terreni solidi

M. bovis e *M. caprae* si presentano sotto forma di corti bastoncini immobili con dimensioni da 1-4 µm, caratterizzati da una parete ricca di acidi micolici che li protegge dalla degradazione

all'interno dei fagociti ed è responsabile dell'acido-resistenza. Sono batteri aerobi, microaerofili, crescono a 37°C e mostrano l'effetto cordale quando crescono in terreni liquidi.

Per la crescita dei micobatteri viene utilizzata un'ampia varietà di terreni basata principalmente su terreni a base d'uovo rappresentati dallo Stonebrink, Colestos e Löwenstein-Jensen, a cui possono essere aggiunti il piruvato e/o il glicerolo. Un altro tipo sono i terreni sintetici agarizzati (qualche volta arricchiti da siero e/o sangue come il Middlebrook 7H10 e 7H11 e il terreno agar sangue per TB B83 (Gormley *et al.*, 2014). Di solito sono richieste diverse settimane d'incubazione per la comparsa delle colonie di *M. bovis* sui terreni solidi. La velocità di crescita dipende dal terreno e dalla concentrazione dei micobatteri presenti nell'inoculo. Il manuale OIE suggerisce un'incubazione a 37°C per almeno 8 settimane prima di chiudere gli esiti come negativi. Il lavoro di Corner (Corner *et al.*, 2012) suggerisce un periodo d'incubazione superiore alle 12 settimane. Lo stesso studio prende in considerazione diverse tipologie di terreni e diversi sistemi di decontaminazione per l'efficienza d'isolamento di *M. bovis*, suggerendo l'utilizzo del doppio inoculo e di una combinazione di terreni solidi e liquidi di diversa tipologia.

Isolamento su terreni liquidi

L'utilizzo di terreni solidi ha mostrato molti limiti e l'introduzione di sistemi automatizzati con terreni liquidi come il BACTEC 460, *Mycobacterium* growth Indicator Tube (BACTEC MGIT 960) e il sistema Versatrek (Thermo Fisher Scientific) ha portato notevoli miglioramenti nell'isolamento di *M. bovis*/*M. caprae*.

Nel sistema BACTEC 460 i micobatteri sono rilevati radiometricamente utilizzando un terreno modificato Middlebrook 7H9 (Bactec12b) contenente acido palmitico C¹⁴ e un complesso di antibiotici (PANTA). La crescita dei micobatteri è misurata attraverso l'emissione di ¹⁴CO₂ e rilevata dallo strumento BACTEC 460.

Il MGIT 960 è uno strumento non radiometrico basato sull'utilizzo di terreno modificato Middlebrook 7H9 in presenza di fluorocromo (sale metallico di rutenio) adeso al fondo della provetta in un film di silicone. La crescita dei micobatteri viene rilevata attraverso lo sviluppo di fluorescenza dopo il consumo di O₂ operato dai microorganismi durante la crescita.

Il Versatrek è un sistema automatico a rilevamento pressometrico al cui interno sono presenti spugne di cellulosa che fungono da supporto meccanico per la crescita. La tecnologia si basa sul rilevamento dei cambiamenti di pressione che avvengono nello spazio sovrastante il terreno di coltura presente all'interno del flacone. Tali cambiamenti sono dovuti al consumo di O₂ e alla produzione di gas che accompagnano l'eventuale crescita batterica.

Con la dismissione del sistema BACTEC 460, sono stati condotti alcuni studi di confronto tra le performance dei due sistemi liquidi (BACTEC 460 e MGIT 960) in parallelo con i terreni solidi di riferimento, su alcune centinaia di campioni di linfonodo bovino (Hines *et al.*, 2006) e su più di 3000 campioni provenienti da bovino e fauna selvatica (Robbe-Austerman *et al.*, 2013).

In generale, l'utilizzo di questi sistemi, migliora la sensibilità con una riduzione dei tempi medi d'isolamento per *M. bovis* rispetto al solo utilizzo dei terreni solidi ma ha un maggior rischio di contaminazione in particolare per il MGIT 960. La presenza di contaminazioni potrebbe essere ridotta introducendo alcuni accorgimenti durante le fasi di prelievo (utilizzo di strumentazione sterile) e di conservazione e trasporto dei campioni al laboratorio (Bobadilla-del-Valle *et al.*, 2003; Jenkins *et al.*, 2008).

La ridotta sensibilità d'isolamento dei terreni solidi rispetto ai liquidi potrebbe essere dovuta alla presenza limitata dei nutrienti disponibili nelle immediate vicinanze della colonia. Anche la diversa composizione dei due sistemi colturali potrebbe influire sulla resa dell'isolamento di *M. bovis* (Gormley *et al.*, 2014).

Isolamento colturale

Presso il CRN-TB l'isolamento di *M. bovis*/*M. caprae* viene eseguito utilizzando una combinazione di terreni solidi a base d'uovo, quali Löwestein-Jensen, Stonebrink e con il sistema automatizzato liquido MGIT 960.

Tale combinazione nasce dalla ricerca di nuove strategie da parte del CRN-TB per ridurre i tempi e migliorare la sensibilità di conferma diagnostica considerando l'isolamento di *M. bovis*/*M. caprae* come metodo di riferimento.

Nel periodo 2003-2016, il laboratorio del Centro di riferimento ha sottoposto a isolamento 9.822 campioni di cui 2564 conferimenti di bovini, 91 bufalini, 1095 ruminanti selvatici, 2071 cinghiali, 101 volpi, 482 suini, 155 animali da compagnia.

I campioni dopo essere stati trattati con i protocolli precedentemente descritti, sono stati seminati in parallelo sia nelle provette del MGIT 960 sia nei terreni solidi a base d'uovo in uso presso il CRN-TB. Il confronto della sensibilità d'isolamento nei diversi terreni è indicato in Tabella 4. Su un totale di 834 ceppi di *M. bovis* tutti provenienti da campioni di linfonodo di bovini, il 99,8% è stato isolato con il sistema colturale MGIT 960 e solo l'81,3% con i terreni solidi tradizionali. Il sistema colturale liquido mostra migliori prestazioni anche per l'isolamento di *M. avium* ma non per il recupero di alcuni *Mycobacteria Other Than Tuberculosis* (MOTT) come *M. nonchromogenicum* e *M. terrae* complex.

Tabella 4. Ceppi isolati (%) rispetto a quelli testati con il sistema MGIT 960 e i terreni solidi LJ-ST

Specie	2003-2016	% con MGIT	% con LJ-ST
<i>M. bovis</i>	834	99,8	81,3
<i>M. avium</i>	101	96,0	73,3
<i>M. fortuitum</i>	56	89,3	94,6
<i>M. marinum</i>	33	60,6	100,0
<i>M. nonchromogenicum</i>	49	83,7	85,7
<i>M. chelonae</i>	30	96,7	93,3
<i>M. terrae</i> complex	18	77,8	77,8
<i>M. kansasii</i>	7	100,0	85,7
<i>M. microti</i>	14	57,1	64,3
<i>M. gordonae</i>	4	100,0	100,0
Colture miste <i>M. bovis</i> e altro micobatterio (<i>M. nonchromogenicum</i> - <i>M. avium</i> - <i>M. kansasii</i>)	4	100,0	100,0
<i>M. tuberculosis</i>	1	100,0	100,0
Totale	1151	96,2	82,2

Il confronto è servito inoltre a definire i tempi medi di isolamento di *M. bovis* dei due sistemi colturali che sono: 16 giorni per il MGIT 960 con variazioni da un minimo di 3 a un massimo di 43 giorni e 25 giorni per i terreni solidi (Figura 7), e a valutare la percentuale di contaminazione in relazione al tipo di campione e alla specie di provenienza (Tabella 5).

I nostri dati sono in accordo a quanto riportato da altri autori in particolare per quanto riguarda i vantaggi del sistema colturale MGIT 960 in termini di sensibilità e velocità di isolamento dei micobatteri appartenenti al gruppo MTBC (Tortoli *et al.*, 1999; Leitritz *et al.*, 2001; Scarparo *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003). La nostra esperienza ha mostrato che similmente a quanto raccomandato per la diagnosi di infezioni micobatteriche in campioni clinici umani (Salfinger *et al.*, 1998), la combinazione dei terreni solidi (LJ-ST) con terreni liquidi rappresenta attualmente il sistema più efficiente per l'isolamento di micobatteri da linfonodi e/o organi provenienti da diverse specie animali.

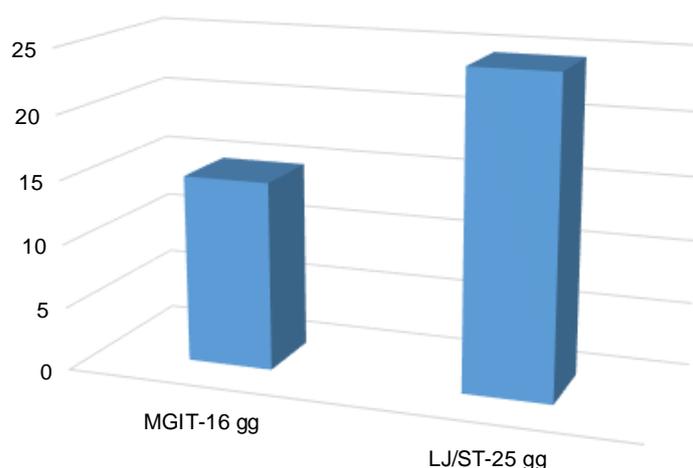


Figura 7. Confronto dei tempi medi di isolamento di *M. bovis* nei terreni MGIT e LJ-ST (Fonte ed elaborazione dati CRN-TB)

Tabella 5. Contaminazione (%) ottenuta con MGIT 960 e con terreni solidi

Specie animale	N. di campioni	% contaminazione	
		MGIT 960	LJ-ST
Bovino	463	8,0	1,5
Cinghiale	50	4,2	0,5
Suino	48	1,2	0,5
Pesce	35	2,4	0

Fonte ed elaborazione dati CRN-TB

Esame PCR per il rilevamento diretto di MTBC da tessuto

A partire dagli anni novanta del secolo scorso sono stati sviluppati numerosi kit commerciali e metodi “in house” basati sul rilevamento degli acidi nucleici per l’evidenziazione del gruppo *M. tuberculosis* complex (MTBC) in campioni biologici. I target utilizzati per l’amplificazione sono principalmente sequenze multicopia come gli elementi di inserzione IS6110 e IS1081, (Taylor *et al.*, 2007; Sankar *et al.*, 2011), o geni codificanti per proteine specifiche del gruppo MTBC (MPB70) (Bahrmand *et al.*, 1996).

Malgrado i metodi molecolari siano stati descritti come rapidi e poco indaginosi (Scarparo *et al.*, 2000) non sono riusciti a sostituire con la stessa affidabilità e sensibilità l’isolamento di *M. bovis* da campioni di linfonodo e/o organi (Wards *et al.*, 1995; Roring *et al.*, 2000; OIE, 2015; Valente *et al.*, 2002). Questo perché la procedura di estrazione del DNA, passaggio essenziale per l’applicazione di PCR, è complicata dalle difficoltà di lisi della parete dei micobatteri, dalla difficoltà fisica di ottenere un estratto omogeneo dai campioni di linfonodo e dalla difficoltà di eliminare la presenza di inibitori. Inoltre, in passato, alcuni studi avevano evidenziato i rischi di contaminazione da prodotto amplificato e la variabilità dei risultati specialmente in campioni con scarso numero di micobatteri (Noredhoek *et al.*, 1996; OIE, 2015).

Tuttavia l'introduzione della PCR-Real Time (Thacker *et al.*, 2011) e di metodi di lisi maggiormente efficienti per i micobatteri (lisi meccanica) (Herthnek *et al.*, 2006; Amaro *et al.*, 2008), l'utilizzo di controlli interni e la possibilità di concentrare i micobatteri con tecniche immunomagnetiche (Garbaccio & Cataldi, 2010), hanno migliorato la sensibilità e specificità dei metodi molecolari applicati al rilevamento diretto di MTBC e riaperto la possibilità di un utilizzo combinato di queste metodiche con l'esame colturale.

Attualmente presso il CRN-TB un'aliquota dell'omogenato preparato per l'esame colturale (prima del trattamento di decontaminazione con NaOH 2-4%) viene sottoposta a PCR Real Time basata sull'amplificazione di una porzione specifica dell'elemento d'inserzione IS6110.

Il campione viene inattivato al calore (95°C per 20 min) e l'acido nucleico viene estratto tramite una lisi meccanica con Tissue Lyser in presenza di biglie di vetro, un trattamento enzimatico con Proteinasi K e un passaggio in colonnina di affinità con le procedure indicate dalla ditta produttrice.

La PCR Real Time viene eseguita con i primers EXT-1 e INT-1 e la sonda TaqMan (FAM-AACTCAAGGAGCACATCAGCCG-BHQ1) dell'IS6110 descritti da Boniotti (Boniotti *et al.*, 2014) in presenza di un controllo interno che permette di individuare la presenza di eventuali inibitori.

Poichè la normativa considera l'isolamento di *M. bovis/M. caprae* il metodo di riferimento per la conferma diagnostica di TB, il risultato ottenuto in PCR viene utilizzato come verifica dell'efficienza dell'esame colturale. Nel caso di esiti non corrispondenti (PCR positiva, isolamento negativo), si ripete l'isolamento colturale a partire dalla preparazione dell'omogenato, con un eventuale prolungamento dei tempi d'isolamento e l'utilizzo di altri sistemi di decontaminazione. Lo scopo finale è quello di ottenere un percorso di laboratorio che porti all'isolamento di *M. bovis/M. caprae* con la massima efficienza e accuratezza.

Identificazione dei ceppi isolati

Tradizionalmente i micobatteri vengono identificati mediante una combinazione di test fenotipici che permette di distinguere i microorganismi appartenenti al genere *Mycobacterium* e di identificare i micobatteri appartenenti al gruppo MTBC, *M. avium* o altri micobatteri. I test fenotipici comprendono:

- l'esame microscopico per il rilevamento di morfologia, alcol-acido-resistenza, presenza del "fattore cordale";
- la temperatura di crescita: a 37°C e a 42°C;
- la velocità di crescita: rapida (dopo incubazione non superiore a 7 giorni) oppure lenta (dopo incubazione per un tempo superiore a 7 giorni);
- la morfologia (macro-microscopica) delle colonie cresciute su terreno Middlebrook 7H10 distribuito in piastre.

Ai test fenotipici vengono affiancati quelli biochimici per la differenziazione dei micobatteri di interesse veterinario (*M. bovis/M. caprae*, *M. microti*, *M. avium* complex, *M. tuberculosis*): ureasi, riduzione del tellurito, riduzione dei nitrati, e, facoltativamente, quale ulteriore conferma, la prova di crescita in presenza di TCH (idrazide dell'acido 2-tiofen-carbossilico) e il test della niacina.

Poiché i test microbiologici sono lunghi, indaginosi e occasionalmente possono dare risultati non conclusivi, la maggior parte dei laboratori si è orientata sull'utilizzo di test molecolari (Gormley *et al.*, 2014).

Numerosi markers molecolari sono in grado di identificare e/o differenziare le specie micobatteriche a partire dal ceppo isolato: i polimorfismi del gene *hsp65* descritti da Talenti (Talent *et al.*, 1993), le PCR specifiche per genere, *M. avium* e MTBC descritte da Kulski (Kulski *et al.*, 1995) e le mutazioni del gene *RNAr 16S*. L'elevata omologia genomica esistente all'interno

di MTBC, comprendente le specie *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti* (van Soolingen *et al.*, 1997), *M. bovis*, *M. microti*, *M. caprae* (Aranaz *et al.*, 2003) e *M. pinnipedii* (Cousins *et al.*, 2003), ha reso più difficile la selezione di markers genetici informativi e lo sviluppo di test molecolari affidabili per la differenziazione dei vari componenti del gruppo.

Studi sull'intero genoma di *M. tuberculosis* e *M. bovis* (Garnier *et al.*, 2003) e di genomica comparativa (Brosch *et al.*, 1998; Gordon *et al.*, 2001) hanno messo in evidenza:

- la perdita di materiale genetico tra *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* attraverso delezioni successive di regioni cromosomiche denominate loci RD; tali loci hanno una diversa distribuzione nelle specie di MTBC e hanno permesso di definire un albero filogenetico evolutivo del gruppo e di sviluppare sistemi di identificazione costituiti da un insieme di PCR (Huard *et al.*, 2003; Parsons *et al.*, 2002; Warren *et al.*, 2006);
- la presenza di *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) o mutazioni puntiformi in alcuni geni presenti nel gruppo MTBC: *oxyR*, *gyra*, *gyrB*, *katG*, *rpoB*, *pncA* (Baker *et al.*, 2004).

Alcuni di questi polimorfismi sono stati sfruttati per lo sviluppo di test per l'identificazione di specie: ad esempio il test PCR/RFLP del gene *gyrB* (Abass *et al.*, 2010), la PCR/RFLP del gene *oxyR* e la sequenziazione del gene *pncA* (Barouni *et al.*, 2004).

Identificazione di *M. bovis* e differenziazione da altri micobatteri

Presso il CRN-TB viene applicata, in parallelo alle prove biochimiche e colturali, un insieme di tecniche molecolari, schematizzate in Figura 8. La procedura prevede che sul ceppo isolato vengano eseguite inizialmente tre PCR (Kulski *et al.*, 1995): una specifica per il genere *Mycobacterium*, una specifica per micobatteri appartenenti al gruppo MTBC e una specifica per *M. avium*.

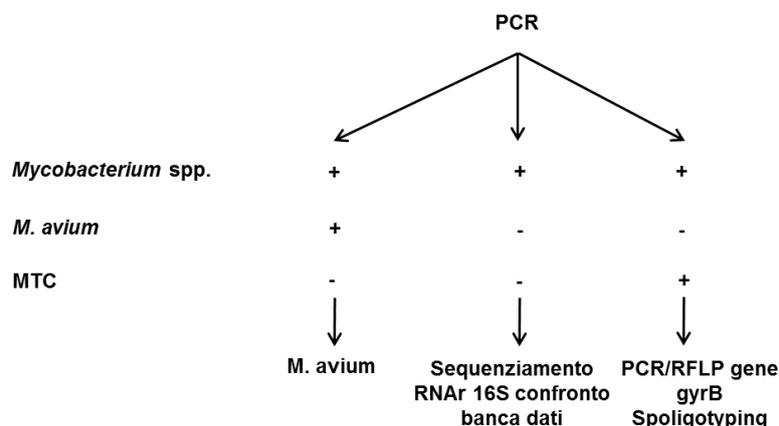


Figura 8. Schema d'identificazione dei ceppi di *Mycobacterium* spp. in uso presso il CNR-TB

A seconda della combinazione dei risultati ottenuti, si procede con diverse strategie. In caso di PCR positiva per il genere *Mycobacterium* e *M. avium* e negativa per MTBC, si arriva all'identificazione immediata di *M. avium*; se si ottiene positività solo per il genere *Mycobacterium*, si applica la sequenziazione dell'RNAr 16S mediante il kit Microseq (Applied Biosystem) (Patel *et al.*, 2000; Therese *et al.*, 2009), se invece il ceppo viene identificato come appartenente al MTBC, si utilizza un test molecolare basato sull'identificazione di polimorfismi nel gene *gyrB*, in grado di identificare *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti* e il gruppo *M. tuberculosis/M. africanum/M. canetti*. Nello specifico viene utilizzato il test schematizzato in Figura 9.

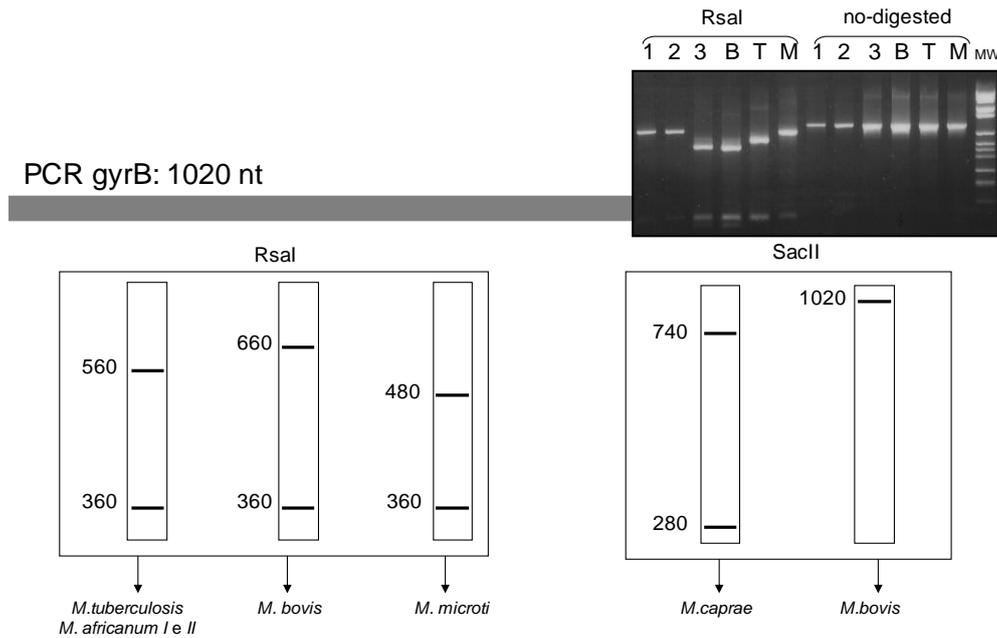


Figura 9. Saggio PCR/RFLP del gene *gyrB*

Tipizzazione molecolare

La tipizzazione molecolare di MTBC si basa sull'utilizzo di marcatori genetici che permettono di differenziare i ceppi appartenenti al gruppo MTBC (Gormley *et al.*, 2014). La distribuzione geografica e temporale dei genotipi identifica cluster epidemiologici, fornisce informazioni sulle fonti d'infezione e sulle modalità di trasmissione della malattia.

La maggior parte dei metodi di genotipizzazione è stata sviluppata a partire dal 1990 dopo l'identificazione di regioni polimorfiche nel genoma di MTBC. L'identificazione dell'elemento d'inserzione IS6110, presente, quasi sempre, in un alto numero di copie (maggiore di 10), (Eisenach *et al.*, 1988; Hermans *et al.*, 1990; Hermans *et al.*, 1992) nel genoma di *M. tuberculosis*, e la standardizzazione dell'analisi RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (van Embden *et al.*, 1993; van Embden *et al.*, 1995) hanno rappresentato per molto tempo il sistema di riferimento degli studi di epidemiologia molecolare della TB umana. La possibilità di utilizzare l'analisi RFLP con l'IS6110 è stata valutata anche per *M. bovis*, ma la presenza di solo una o due copie dell'IS6110 nella maggior parte dei ceppi isolati da bovino non consente una buona discriminazione. In alternativa sono state utilizzate: la tecnica *spoligotyping* (*spacer oligonucleotide typing*) descritta da Kamerbeek (Kamerbeek *et al.*, 1997) e l'analisi *Multilocus Variable Number of Tandem Repeat Analysis* (MLVA) con marcatori VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) (Gormley *et al.*, 2014).

Lo *spoligotyping* si basa sull'analisi del locus DR una regione presente nel genoma di MTBC (Groenen *et al.*, 1993), caratterizzata dalla presenza di elementi ripetuti conservati (DR) di 36 bp, interspersi da altre sequenze uniche chiamate "spacers" della dimensione variabile da 34 a 41 bp. Il DR e il suo adiacente spacer è chiamato DVR. I pattern polimorfici o spoligotipi sono il risultato della combinazione della presenza/assenza di 43 DVR rilevati mediante ibridazione (con tecnica

Reverse Line Blot Hybridization) di una miscela di prodotti PCR ottenuta con primers disegnati all'interno delle sequenze DR, con 43 sonde corrispondenti ai 43 spacers. I risultati sono espressi con codice binario (0: assenza dello spacer; 1: presenza dello spacer); ad ogni pattern è assegnato un codice unico attraverso il sito internazionale: www.mbovis.org.

Malgrado la scarsa capacità informativa dimostrata in numerosi studi di popolazione di *M. bovis* (Roring *et al.*, 2002), lo *spoligotyping* rappresenta la prima tecnica universalmente accettata per la tipizzazione di *M. bovis* (Smith *et al.*, 2003; Haddad *et al.*, 2004; Milian-Suazo *et al.*, 2008).

La differenziazione degli isolati di *M. bovis* ottenuta con *spoligotyping* è molto variabile nei diversi Paesi europei e perfino tra diverse aree geografiche. Mentre le pubblicazioni mostrano una scarsa differenziazione nelle popolazioni di *M. bovis* presenti in Australia (Cousin *et al.*, 1998), Repubblica di Irlanda (Costello *et al.*, 1999), Nord Irlanda (Skuce *et al.*, 2005) e Gran Bretagna (Hewinson *et al.*, 2006), la tecnica si è rivelata maggiormente informativa in Francia (Haddad *et al.*, 2004), Portogallo (Duarte *et al.*, 2010), Italia (Boniotti *et al.*, 2009), Spagna (Rodriguez-Campos *et al.*, 2013) e Sud Africa (Michel *et al.*, 2008).

Lo *spoligotyping* viene quindi utilizzato per una valutazione preliminare dei ceppi associata ad altre tecniche maggiormente differenziative come ad esempio la tipizzazione MLVA che si basa sull'analisi di loci sparsi nel genoma contenenti un numero variabile di unità ripetitive. L'analisi viene fatta mediante amplificazione dei loci genomici, calcolo della dimensione dei frammenti amplificati e del numero di unità ripetitive presenti in ciascun locus.

Tra i primi loci utilizzati per la tipizzazione di *M. bovis* vi sono gli *Exact Tandem Repeats* (ETR) da A a F (ETRA, ETRB, ETRC, ETRD, ETRE) descritti da Frothingham e Meeker-O'Connell (Frothingham & Meeker-O'Connell, 1998) contenenti unità ripetitive da 53 a 79 bp. In seguito sono stati identificati numerosi altri marcatori noti collettivamente come MIRU/VNTR che oltre agli ETR includono: le *Micobacterial Interspersed Repetitive Units* (MIRU) (Supply *et al.*, 2006), i marcatori QUB (Queen's University Belfast) descritti da Skuce (Skuce *et al.*, 2002) e i loci VNTR (Lefleche *et al.*, 2002; Roring *et al.*, 2002; Skuce *et al.*, 2002). Dal 2002 sono stati condotti numerosi studi nel tentativo di selezionare un pannello di marcatori VNTR con elevata capacità discriminativa da utilizzare per studi di epidemiologia molecolare (Roring *et al.*, 2002; Hilty *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2008; Boniotti *et al.*, 2009; Rodriguez-Campos *et al.*, 2013). Nel 2008 un network di laboratori europei (VENoMYC) ha concordato un pannello "consensus" di 6 marcatori VNTR, descritti da diversi autori come maggiormente differenziativi (Boniotti *et al.*, 2009; Hilty *et al.*, 2005; Rodriguez-Campos *et al.*, 2013; Romero *et al.*, 2008; Roring *et al.*, 2002), da utilizzare per la genotipizzazione di *M. bovis*. Il pannello include: QUB3232, ETRA, ETRB, QUB11a, QUB11b e QUB26. Tuttavia il pannello non è poi stato utilizzato da tutti i Paesi europei in modo uniforme, rendendo difficile la possibilità di confronto dei profili genetici tra diversi laboratori/Paesi.

In ogni caso la tipizzazione MLVA ha mostrato una maggiore capacità differenziativa rispetto allo *spoligotyping* e si è mostrata utile per studi di epidemiologia molecolare fornendo uno strumento di supporto all'epidemiologia tradizionale e diventando, in certi casi, parte integrante dei programmi di controllo della TB bovina (Smith *et al.*, 2003; Boniotti *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2010).

ASPETTI DIAGNOSTICI NELL'UOMO

Diagnosi *in vivo*: diagnosi di laboratorio e tecniche molecolari di tipizzazione

Il primo e più conosciuto test per la diagnosi della TB è il test cutaneo della tubercolina, che utilizza lo stesso principio sia nell'uomo sia negli animali. Il test è eseguito inoculando nel derma del paziente, con metodologie diverse, una quantità standard di PPD (*Purified Protein Derivative*) che corrisponde a una miscela di costituenti proteici a basso peso molecolare e di costituenti lipidici e polisaccaridici, estratta da un filtrato di brodocoltura di *Micobacterium tuberculosis*. Le metodologie di inoculo sono varie e comprendono il test multipunture di Heaf, il Tine Test e l'Intradermoreazione di Mantoux (Koneman *et al.*, 1995). L'inoculo tubercolinico, una volta giunto nel derma, determina lo stesso tipo di risposta provocata nell'organismo sensibile dalla infezione naturale e cioè l'attivazione dei linfociti T con produzione di linfocine, l'attivazione macrofagica e la formazione di un infiltrato flogistico locale la cui evoluzione, nel giro di 48-72 ore, è legata alle condizioni immunitarie e infettive dell'ospite. La reazione infatti viene considerata positiva quando il diametro dell'infiltrato supera i 2 mm intorno a ogni punta del Tine Test o i 10 mm nella metodica secondo Mantoux. Nel test di Heaf a punture multiple esistono quattro gradi di positività del test a seconda della confluenza o meno delle papule e solo i gradi 3 e 4 corrispondono a una positività certa.

La reattività positiva a una cutireazione in un individuo sospetto di infezione tubercolare può suggerire, ma non confermare una diagnosi di TB, così come l'estensione e l'intensità dei fenomeni infiltrativi fino alla necrosi della papula possono essere in relazione all'intensità della malattia in atto. In ogni caso la valutazione del test deve essere sempre considerata con cautela, in quanto la reattività personale dell'ospite, dall'ipersensibilità ritardata fino all'anergia, può giocare un ruolo molto importante che deve essere attentamente valutato dal punto di vista clinico. È oggi ben definito il concetto che un test tubercolinico positivo si negativizza se il soggetto non è sottoposto a nuovi contatti con *M. tuberculosis*. Inoltre, il test cutaneo della tubercolina non è in grado di differenziare tra le specie del complesso del micobatterio della TB, non distingue tra le fasi latenti dell'infezione e la malattia e infine non distingue i soggetti vaccinati da quelli infettati naturalmente (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006). Inoltre, l'esposizione a micobatteri ambientali può generare dei falsi positivi.

In ambito veterinario, l'utilizzo di antigeni specifici comuni nei micobatteri del complesso tubercolare, come ESAT-6, CFP10 e Rv3615c, in alternativa al PPD ha contribuito ad aumentare la specificità del test (Buddle *et al.*, 2009; Casal *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014). Alla fine degli anni '80 del secolo scorso è stato sviluppato un test sui bovini basato sulla misurazione della produzione di IFN- γ da parte di linfociti circolanti da sangue intero in risposta alla PPD (Wood *et al.*, 1990). La produzione di IFN- γ è valutata in risposta al PPDa e PPDb per distinguere i micobatteri ambientali da *M. bovis*. Successivamente, questa tecnologia è stata utilizzata anche per valutare la TB nell'uomo (Andersen *et al.*, 2000; Pai *et al.*, 2014). Attualmente, sono disponibili almeno due tipi di kit commerciali: il QuantiFERON-TB Gold, che utilizza gli antigeni ESAT-6, CFP-10 con o senza TB7.7 e il T-SPOT.TB assay, che utilizza ESAT-6 e CFP-10 in formato ELISPOT. Un saggio basato su ESAT-6/CFP-10 è disponibile anche per gli animali (Bass *et al.*, 2013). Nell'uomo l'utilizzo di ESAT-6 e CFP-10 come antigeni immunodominanti permette di distinguere gli individui vaccinati da quelli infettati. Infatti, il BCG, il vaccino antitubercolare attualmente usato nell'uomo, manca della regione RD1 che codifica per gli

antigeni ESAT-6 e CFP-10. Molti sforzi sono stati fatti per sviluppare test sierologici per identificare anticorpi circolanti specifici per *M. bovis* o altri micobatteri. Tuttavia, questi test non mostrano un'elevata sensibilità e specificità. La risposta anticorpale è bassa se l'infezione è controllata, mentre alti livelli anticorpali circolanti sono in genere associati a una fase tardiva dell'infezione, a un mancato controllo da parte del sistema immunitario di controllare la malattia e a una progressione della gravità della malattia stessa (Wood & Jones, 2001).

Un aspetto centrale nella valutazione del rischio della TB bovina per la salute dell'uomo è l'incidenza dell'infezione umana da *M. bovis* soprattutto per controllare e ottenere una reale stima dell'incidenza della trasmissione animale-uomo. Nonostante l'utilizzo di nuovi antigeni, i test attualmente in uso non sono in grado di distinguere un'infezione tubercolare causata dalle specie dei micobatteri del complesso tubercolare. Infatti, nonostante la presenza di alcune differenze morfologiche e biochimiche tra *M. bovis* e *M. tuberculosis*, i due organismi sono strettamente correlati e causano nell'uomo una malattia che non è facilmente distinguibile dal punto di vista clinico, radiografico e patologico e neanche attraverso un'analisi diretta al microscopio (Kovalyov, 1989; Collins, 2000; Ashford, 2001).

I metodi diretti per la diagnosi della TB si basano sull'isolamento dei batteri da espettorati o biopsie. La presenza dei micobatteri è rilevata in base a una colorazione di Ziehl-Neelsen seguita dall'osservazione al microscopio ottico o colorazione con auramina rilevata tramite microscopia a fluorescenza (Marais *et al.*, 2008). Inoltre, poiché il trattamento della maggior parte dei pazienti affetti da TB non dipende dall'identificazione precisa della specie che l'ha causata, molti centri clinici non investono risorse per differenziare i due organismi (Collins *et al.*, 2000; Ashford *et al.*, 2001; Drobniewski *et al.*, 2003). Tuttavia, *M. bovis* mostra una resistenza intrinseca alla pirazinamide, che non dovrebbe essere impiegata come prima linea di difesa quando si sospetta una TB causata da *M. bovis* (Grange & Yates, 1994). Per ottenere una diagnosi differenziale di TB nell'uomo è essenziale coltivare i micobatteri e stabilire la specie a cui appartengono in base a proprietà colturali, test biochimici e tecniche molecolari (Grange *et al.*, 1996; Drobniewski *et al.*, 2003). La discriminazione tra *M. bovis* e *M. tuberculosis* attraverso metodi basati su markers molecolari presenta delle difficoltà legate al fatto che le specie del complesso tubercolare presentano il 99,9% di omologia a livello nucleotidico e identiche sequenze delle molecole 16S di rRNA (Garnier *et al.*, 2003). Infatti, i primi test a DNA o RNA commercialmente disponibili non erano in grado di distinguere le diverse specie (Richter *et al.*, 2004). Test molecolari basati sull'amplificazione genica "multiplex PCR" sono usati per distinguere le infezioni da batteri appartenenti al complesso *M. avium* da quelli del complesso tubercolare. I marcatori molecolari più comunemente usati per differenziare i micobatteri del complesso tubercolare sono le sequenze d'inserzione IS6110, la regione DR, le sequenze ricche di poly(GC), (PGRS) e il numero variabile delle sequenze ripetute in tandem (VNTR) (Haddad *et al.*, 2004) e analisi attraverso l'utilizzo di enzimi di restrizione (REA) su cromosomi interi che è in grado di evidenziare variazioni molecolari nelle specie tubercolari (Collins *et al.*, 1994). Tali metodi consentono una diagnosi accurata ma richiedono laboratori specializzati e personale esperto e quindi non facilmente utilizzabili specialmente nei Paesi in via di sviluppo.

BASE ED EVOLUZIONE NORMATIVA DELLE ATTIVITÀ DI ERADICAZIONE E CONTROLLO NEI CONFRONTI DELLA TUBERCOLOSI BOVINA IN ITALIA

Introduzione

Il primo atto normativo in materia di tubercolosi bovina in Italia risale al 1929 quando con Regio Decreto 9 maggio n. 994 “Regolamento sulla vigilanza igienica del latte destinato al consumo diretto” all’articolo 9 veniva introdotto il divieto dell’uso del latte proveniente da animali affetti da varie patologie, tra cui la tubercolosi bovina.

Successivamente, il Regolamento di Polizia Veterinaria (RPV), approvato con il Decreto del Presidente della Repubblica 8 febbraio 1954 n. 320, introdusse l’obbligo di immediata denuncia al sindaco (articolo 2) di qualunque caso, anche sospetto, di malattia infettiva e diffusiva degli animali, l’obbligo di segnalazione dei casi di tubercolosi clinicamente manifesta negli animali lattiferi da parte del veterinario comunale all’ufficiale sanitario, e viceversa da parte dell’ufficiale sanitario al veterinario comunale, nei casi di malattia accertata nell’uomo in cui non sia possibile escludere la trasmissione della malattia agli animali, unitamente alle misure urgenti da adottate per impedire il contagio. Oltre alle disposizioni generali, l’RPV, al Titolo II, Capo XI, ha fornito norme sanitarie speciali per tale malattia infettiva. L’articolo 102 prescrive i provvedimenti da attuare nei riguardi dei bovini affetti da tubercolosi: l’isolamento e il sequestro in separato ricovero o almeno in un idoneo posto della stalla comune, sino ad avvenuta macellazione, con divieto di usare abbeveratoi adibiti per gli altri animali, la marcatura all’orecchio destro consistente nell’asportazione con apposita tenaglia di un lembo di padiglione a forma di T, la disinfezione periodica della stalla e particolarmente delle poste occupate dagli animali infetti, il divieto di utilizzo del latte per l’alimentazione umana, nel caso di tubercolosi clinicamente manifesta, da destinare agli animali dell’allevamento purché bollito o comunque risanato, e infine il divieto di monta.

Lo stesso articolo 102 introduce per i bovini risultati negativi al test tubercolinico controlli periodici allo scopo di accertare l’eventuale comparsa di nuovi casi di infezione e di permettere l’applicazione delle misure di lotta nei riguardi degli animali colpiti. Vieta altresì i trattamenti immunizzanti contro la tubercolosi e dispone l’applicazione dei provvedimenti suindicati anche nel caso di sospetto di tubercolosi segnalato da parte di un veterinario sulla base della prova tubercolinica o delle prove di laboratorio o dell’esame clinico o dell’esame anatomopatologico effettuato su animali vivi, macellati o morti provenienti da detta stalla.

All’articolo 103 la prova diagnostica della tubercolina è resa obbligatoria, oltre che per gli animali lattiferi anche per i tori destinati alla monta pubblica e privata e adibiti alla fecondazione artificiale (esclusi quelli allevati allo stato brado) all’atto della prima approvazione e in seguito ogni anno.

All’articolo 104 si dispone infine che nei casi di tubercolosi degli animali di altre specie si adottano, in quanto applicabili, le misure indicate nell’articolo 102. I cani, i gatti, le scimmie e gli psittaci riconosciuti affetti da tubercolosi devono, con provvedimento del sindaco, essere soppressi, e i locali e gli oggetti che possono essere stati contaminati, accuratamente disinfettati.

La Legge 9 giugno 1964 n. 615 “Bonifica sanitaria degli allevamenti dalla tubercolosi e dalla brucellosi”, tuttora in vigore, disponeva l’attuazione del risanamento degli allevamenti dalla tubercolosi bovina mediante piani nazionali di profilassi che definivano le misure per la protezione degli allevamenti indenni e i casi in cui si rendevano obbligatori i trattamenti

immunizzanti, l'esecuzione delle prove diagnostiche, la marcatura e l'abbattimento degli animali infetti. Stabiliva inoltre per la prima volta una indennità da corrispondere agli allevatori che aderivano ai programmi di risanamento su base volontaria.

Il primo piano di profilassi nazionale nei confronti della tubercolosi bovina risale al Decreto Ministeriale 11 marzo 1965 che introduceva l'identificazione degli animali di età superiore ai tre mesi da effettuare mediante tatuaggio, la diagnosi mediante prova tubercolinica intradermica, la macellazione degli animali risultati positivi entro sessanta giorni (quindici giorni nel caso di tubercolosi clinicamente manifesta) e l'obbligo delle operazioni di profilassi nel caso di un'adesione da parte degli allevatori superiore al 60% degli allevamenti o quando almeno una uguale percentuale di bovini in una data provincia risultasse già sottoposto alla profilassi volontaria e per gli allevamenti di vacche il cui latte era destinato al consumo diretto.

Il piano di profilassi emanato nel 1965 veniva aggiornato tre anni più tardi con il DM 1° giugno 1968 che introduceva l'identificazione individuale mediante apposizione di una marca auricolare sui soggetti sottoposti alle attività di profilassi, l'esecuzione delle prove diagnostiche su tutti gli animali di età superiore alle sei settimane di età, l'esclusione degli allevamenti con orientamento produttivo da carne dalle attività di risanamento e la definizione, infine, di specifici requisiti per il riconoscimento della qualifica degli allevamenti ufficialmente indenni (assenza di manifestazioni cliniche riferibili a un'infezione tubercolare, l'esecuzione di due prove diagnostiche almeno semestrali con esito favorevole su tutti i bovini di età superiore alle sei settimane e il controllo periodico annuale).

Con la Legge 124/1976 l'obbligo di denuncia introdotto dall'RPV veniva esteso a tutti i casi di "tubercolosi" e non più limitato alla sola "tubercolosi aperta clinicamente diagnosticabile" come inizialmente previsto dal citato Regio Decreto 9 maggio 1929 n. 994. Con questo dispositivo di legge veniva inoltre introdotto l'obbligo della marcatura con asportazione del lembo a T degli animali riconosciuti infetti, definitivamente abrogato dalla Ordinanza del Ministero della Salute del 28 maggio 2015 che lo ha sostituito con l'identificazione elettronica mediante bolo endoruminale da effettuare nei territori non ufficialmente indenni ad opera del Servizio veterinario a carico di tutti gli animali presenti negli allevamenti infetti entro due giorni dalla notifica ufficiale al proprietario o detentore della positività degli stessi.

Con il DM del 30 giugno 1977 il risanamento degli allevamenti bovini dalla tubercolosi diventò obbligatorio su tutto il territorio nazionale.

Nel frattempo, il corpo giuridico in materia di tubercolosi si consolidava attraverso vari atti normativi di derivazione comunitaria.

Il primo intervento legislativo europeo è rappresentato dalla Direttiva del Consiglio del 26 giugno 1964 n. 432 relativa a problemi di polizia sanitaria in materia di scambi intracomunitari di animali delle specie bovina e suina (Direttiva 64/432/CEE), con cui il Consiglio della Comunità economica europea ha inteso armonizzare le prescrizioni sanitarie degli Stati Membri in materia di polizia veterinaria e scambi intracomunitari di animali delle specie bovina e suina al fine di contribuire a eliminare gli ostacoli nel commercio comunitario derivanti dalle disparità normative esistenti e dare attuazione all'organizzazione del mercato comune.

Tale direttiva, che a oggi conta 61 interventi di modifica e 11 rettifiche, è stata recepita dal nostro ordinamento con la Legge 397/1976 e con il DL.vo 196/1999, a sua volta aggiornato nel 2001, nel 2010 e infine nel 2015.

La direttiva disciplina l'obbligo per ogni Stato Membro di vigilare affinché gli animali da produzione e da macello della specie bovina e suina destinati agli scambi, i luoghi di provenienza e di carico (allevamenti, centri di raccolta e stalle di sosta) nonché i mezzi di trasporto siano conformi a determinate disposizioni di polizia sanitaria atte a contrastare la propagazione delle malattie animali trasmissibili soggette a denuncia obbligatoria elencate nell'Allegato E alla stessa direttiva. In particolare, regola l'attività di sorveglianza, le azioni conseguenti le

segnalazioni di sospetto e conferma, le certificazioni sanitarie e i requisiti per il conferimento delle qualifiche sanitarie degli allevamenti.

Successivamente alla Direttiva 64/432/CEE e successive modifiche, il Consiglio della Comunità Economica Europea ha emanato la direttiva del Consiglio del 17 maggio 1977 (Direttiva 77/391/CEE) che ha instaurato un'azione comunitaria di accelerazione e intensificazione del processo di eradicazione della tubercolosi bovina disponendo agli Stati Membri di approntare piani nazionali volti al raggiungimento nel più breve termine della qualifica di ufficialmente indenne da tubercolosi ai sensi delle disposizioni comunitarie applicabili in materia e segnatamente alla Direttiva 64/432/CEE. Tale provvedimento, nella misura in cui intende migliorare lo stato sanitario del bestiame bovino della Comunità e quindi garantire una maggiore redditività dell'allevamento, persegue le finalità della politica agraria comune definite nel trattato che istituisce la Comunità Economica Europea (CEE), andando pertanto a costituire un'azione comune per la quale è prevista la partecipazione finanziaria del Fondo Europeo Agricolo.

Ai sensi dell'articolo 9 della Direttiva 77/391/CEE, la Commissione accerta se sussistono i presupposti per la partecipazione finanziaria della Comunità. A tal fine, secondo quanto previsto dal Regolamento (UE) 652/2014 art. 12 comma 1, gli Stati Membri presentano entro il 31 maggio di ogni anno alla Commissione i programmi annuali o pluriannuali per i quali richiedono il contributo finanziario da parte della Comunità. Tali programmi includono la descrizione della situazione epidemiologica, la definizione delle zone geografiche e amministrative di applicazione del programma, le misure sanitarie, l'obiettivo, il tempo previsto per il suo raggiungimento e una analisi dei costi previsti.

Gli Stati Membri presentano annualmente inoltre, secondo quanto previsto dall'art. 14 del Regolamento (UE) 652/2014, relazioni tecniche e finanziarie, intermedie (entro il 31 agosto) e finali (entro il 30 aprile), con cui informano la Commissione rispettivamente dell'andamento delle attività eseguite nell'anno in corso e dei risultati ottenuti nell'anno precedente.

Con il DM 592/1995 "Regolamento concernente il piano nazionale per la eradicazione della tubercolosi negli allevamenti bovini e bufalini", entra in vigore su tutto il territorio nazionale il regolamento concernente il piano nazionale per l'eradicazione della tubercolosi negli allevamenti bovini e bufalini, che abroga il DM 1° giugno 1968 e successive modifiche e stabilisce le misure da applicare agli allevamenti bovini al fine di ottenere l'eradicazione della malattia per la tutela della salute pubblica e della protezione degli allevamenti ufficialmente indenni.

Il regolamento dispone il controllo annuale mediante prova intradermica in tutti gli allevamenti bovini, anche se allo stato brado, di tutti i capi di età superiore alle sei settimane. Il controllo ufficiale di tutti gli animali al di sopra delle sei settimane di età non si applica agli allevamenti da ingrasso nei quali devono essere introdotti unicamente capi provenienti da allevamenti ufficialmente indenni e scortati da relativa certificazione. Per questi allevamenti il regolamento demanda alle regioni in collaborazione con gli istituti zooprofilattici sperimentali, la predisposizione di specifici piani di sorveglianza.

Nel corso degli anni sono state emanate una serie di ordinanze ministeriali finalizzate a intensificare l'azione di lotta nei confronti delle tubercolosi bovina.

Il 2 gennaio 1993 viene approvata l'ordinanza recante norme integrative per l'eradicazione della tubercolosi negli allevamenti bovini che ordinava una serie di misure finalizzate a intensificare la vigilanza sanitaria nei pubblici macelli soprattutto per poter fornire alle unità operative elementi utili alla individuazione di allevamenti silenti o sfuggiti al controllo e ad assicurare l'esclusione di ogni rischio di diffusione della malattia tubercolare negli allevamenti bovini dove veniva praticata la commercializzazione e lo scambio degli animali.

Il 14 novembre 2006 viene emanata l'ordinanza recante misure straordinarie di polizia veterinaria in Campania, Calabria, Puglia e Sicilia, ritendendo necessario e urgente potenziare le

misure di lotta nei confronti della tubercolosi bovina ai fini della salvaguardia della sanità animale e della salute pubblica, e considerato il carattere endemico della malattia nelle regioni del Sud Italia. Tale ordinanza disponeva:

- l'aggiornamento della qualifica sanitaria degli allevamenti bovini e bufalini nella Banca Dati Nazionale dell'Anagrafe zootecnica (di seguito BDN) entro quindici giorni dalla acquisizione, sospensione e revoca;
- le modalità di identificazione degli animali da abbattere (applicazione del bolo endoruminale e/o di una marca auricolare di colore rosso da applicare all'orecchio destro idoneo a consentire il prelievo di un frammento cutaneo ai fini dell'accertamento dell'identità degli animali);
- la tipologia di controlli da effettuare al macello (prelievo di campioni di pelo, cute e sangue da ogni animale proveniente da un allevamento infetto al fine di consentire la verifica della corrispondenza degli animali inviati al macello con quelli prelevati in allevamento);
- l'abbattimento degli animali infetti entro quindici giorni dalla notifica ufficiale dell'esito del controllo;
- l'invio da parte del Servizio veterinario locale al Servizio veterinario regionale e/o Osservatorio Epidemiologico Veterinario Regionale, entro quindici giorni dall'apertura o chiusura del focolaio, del Modello 1 Sez. A e Sez. B di cui all'RPV e delle relative relazioni epidemiologiche redatte secondo i modelli allegati alla stessa ordinanza;
- l'invio da parte del Servizio veterinario regionale e/o Osservatorio Epidemiologico Veterinario Regionale al Ministero della Salute e al Centro di Referenza Nazionale per *Mycobacterium bovis* di relazioni semestrali sullo stato di avanzamento del piano di controllo;
- l'istituzione, infine, di una *task force* permanente presso il Dipartimento per la sanità pubblica veterinaria, la nutrizione e la sicurezza degli alimenti del Ministero della Salute per l'indirizzo, il coordinamento e l'attuazione delle misure previste dall'ordinanza in questione.

L'ordinanza ministeriale 9 agosto 2012 rinnovava le misure straordinarie di lotta ed eradicazione contenute nel provvedimento del 2006 e introduceva:

- l'identificazione mediante bolo endoruminale degli animali presenti negli allevamenti infetti, entro due giorni dalla notifica di sieropositività, nonché di quelli vaccinati e oggetto di transumanza/monticazione/demonticazione/pascolo vagante prima di ogni spostamento;
- la messa a disposizione delle informazioni relative alla programmazione, all'esecuzione e all'esito delle attività di controllo nel Sistema Informativo della Sanità Animale (SANAN), accessibile tramite il portale www.vetinfo.it;
- l'autorizzazione a sostituire la compilazione cartacea del modello 4 con la registrazione in BDN dei dati previsti dallo stesso modulo prima dell'uscita degli animali dall'allevamento di partenza e a non effettuare i test ufficiali di pre-movimentazione previsti dal Decreto Legislativo 22 maggio 1999 n. 196 a condizione che le attività di profilassi nei confronti della brucellosi fossero integralmente registrate nel sistema informativo SANAN;
- l'applicazione di una sanzione amministrativa pecuniaria al commerciante o detentore della stalla di sosta che non assicurasse il trasferimento degli animali entro trenta giorni dal loro acquisto ad altra azienda non di sua proprietà ai sensi del Decreto Legislativo 22 maggio 1999 n. 196 e la revoca dell'autorizzazione della stalla di sosta in caso di reiterazione dell'infrazione nonché l'addebito al detentore del costo delle prove ufficiali condotte sugli animali;

- la registrazione del sospetto, dell'accertamento e dell'estinzione dei focolai di brucellosi nel Sistema Informativo Malattie Animali Nazionale (SIMAN) unitamente agli esiti delle indagini epidemiologiche.

Nel 2015, ritenendo necessario e urgente proseguire e intensificare ulteriormente l'attività di lotta alla tubercolosi bovina nei territori nazionali non ancora ufficialmente indenni, anche alla luce di quanto raccomandato dalla Commissione europea nel report dell'audit 8407 effettuato dal *Food Veterinary Office (FVO)* del 2010 per la valutazione delle attività di eradicazione della tubercolosi e dell'audit FVO 6979 del 2013 e tenuto conto dei risultati conseguiti con l'adozione delle precedenti ordinanze e ritenuto altresì necessario rafforzare le misure di sorveglianza anche nei territori ufficialmente indenni al fine di tutelare la qualifica sanitaria acquisita, è pubblicata l'ordinanza ministeriale 28 maggio 2015 che disciplina le misure straordinarie di lotta ed eradicazione e di controllo della tubercolosi bovina in tutto il territorio nazionale, introducendo:

- la registrazione nella BDN di tutti i capi identificati elettronicamente, entro sette giorni dall'identificazione e comunque prima di ogni spostamento;
- nei soli territori non ufficialmente indenni, l'identificazione mediante bolo endoruminale o con altro mezzo identificativo associato a prelievo di materiale genetico dei capi oggetto di transumanza/monticazione/demonticazione o che si spostano per pascolo vagante oppure allevati allo stato brado o semibrado;
- nei soli territori non ufficialmente indenni, l'identificazione mediante bolo endoruminale degli animali presenti negli allevamenti infetti entro due giorni dalla notifica ufficiale al proprietario o detentore della positività degli animali;
- la registrazione nel sistema informativo SANAN da parte del Servizio veterinario di tutte le informazioni relative all'esecuzione e all'esito delle attività di profilassi, entro sette giorni dall'acquisizione dei risultati;
- l'obbligo dell'utilizzo del modello 4 informatizzato per tutte le movimentazioni animali, ivi comprese quelle per transumanza e monticazione, pascolo vagante, semibrado e brado permanente;
- entro due giorni lavorativi dalla conferma di positività la notifica da parte del Servizio veterinario al proprietario e/o detentore del riscontro di animali positivi e dell'obbligo di macellazione, entro quindici giorni, degli animali dichiarati infetti, l'avvio di un'accurata indagine epidemiologica e la registrazione nel sistema informativo SIMAN delle informazioni relative al focolaio sospetto ed eventualmente confermato e all'indagine epidemiologica;
- specifici provvedimenti per gli animali destinati alla transumanza, monticazione, semibrado e brado permanente, tra cui l'identificazione, la georeferenziazione e la registrazione nella BDN di tutti i pascoli e nei soli territori non ufficialmente indenni il controllo degli animali nei trenta giorni precedenti lo spostamento al pascolo;
- specifiche misure sanitarie per le stalle di sosta e gli allevamenti da ingrasso, tra cui il controllo mensile delle stalle di sosta da rendicontare utilizzando l'apposita funzionalità informatica disponibile nel portale www.vetinfo.it e il controllo nei trenta giorni precedenti (o successivi) la data di introduzione in allevamento degli animali da ingrasso;
- l'attuazione di periodiche verifiche di efficacia dei controlli da parte dei responsabili dei Servizi veterinari di sanità animale delle aziende sanitarie locali, finalizzate alla verifica del rispetto delle disposizioni previste dalla ordinanza in oggetto e dalla normativa vigente in materia.

Qualifica sanitaria di allevamento e territorio ufficialmente indenne da tubercolosi bovina

Ai sensi dell'allegato A, parte I al DL.vo 196/1999, un allevamento bovino è considerato ufficialmente indenne da tubercolosi quando:

- tutti i capi sono esenti da manifestazioni cliniche riferibili alla tubercolosi;
- tutti gli animali della specie bovina di età superiore a sei settimane hanno reagito negativamente ad almeno due intradermotubercolizzazioni ufficiali eseguite la prima sei mesi dopo la fine delle operazioni di risanamento da qualunque eventuale infezione in allevamento e la seconda sei mesi più tardi. La seconda prova non è richiesta qualora l'allevamento sia stato costituito con soli animali provenienti da allevamenti ufficialmente indenni da tubercolosi e, in questo caso, la prima intradermotubercolizzazione ha luogo perlomeno sessanta giorni dopo che la costituzione dell'allevamento;
- dopo l'esecuzione della prima prova (a sei mesi dal risanamento) non è stato introdotto nell'allevamento alcun animale di età superiore a sei settimane, salvo qualora abbia reagito negativamente a una intradermotubercolizzazione nei trenta giorni precedenti o nei trenta giorni successivi alla data di introduzione in allevamento; in quest'ultimo caso, si procede a isolare fisicamente l'animale, o gli animali, dagli altri animali dell'allevamento in modo da evitare qualsiasi contatto diretto o indiretto con essi fino a dimostrazione della negatività. Tuttavia il Servizio veterinario ufficiale, per gli spostamenti degli animali nel proprio territorio di competenza, può dispensare da questa prova gli animali provenienti da un allevamento ufficialmente indenne da tubercolosi.

Anche ai sensi del DM 592/1995, alcun bovino o bufalino può essere introdotto senza l'apposita certificazione (modello D) redatta dal Veterinario ufficiale in cui si attesti che detto animale proviene da un allevamento ufficialmente indenne da tubercolosi. Detto certificato può non essere richiesto quando sul territorio nazionale da almeno 4 anni almeno il 99,8% degli allevamenti è ufficialmente riconosciuto indenne da tubercolosi e in cui gli allevamenti non ufficialmente indenni si trovano sotto controllo ufficiale ed è vietato il trasferimento di capi da tali allevamenti salvo che gli stessi siano portati direttamente al macello sotto controllo ufficiale.

Ogni capo inoltre deve essere sottoposto all'arrivo nella nuova azienda a prova tubercolinica non prima di quindici giorni e non oltre quarantadue giorni dopo la partenza dall'allevamento di origine. Ai sensi della normativa nazionale non sottostanno all'obbligo della prova diagnostica gli animali che si spostano nell'ambito di un territorio con qualifica di ufficialmente indenne da tubercolosi da almeno due anni. La prova diagnostica inoltre non è richiesta quando sul territorio nazionale la percentuale degli allevamenti infetti da tubercolosi è inferiore allo 0,2% e risulti da un attestato del Veterinario ufficiale che l'animale:

- a) è debitamente identificato;
- b) proviene da un allevamento ufficialmente indenne da tubercolosi;
- c) in occasione del trasporto non è entrato in contatto con bovini o bufalini non provenienti da allevamenti ufficialmente indenni da tubercolosi.

Ai fini del mantenimento della qualifica di allevamento ufficialmente indenne, ai sensi dell'allegato A, parte I, punto 2 del d.lvo 196/1999, è necessario che:

- continuo a essere soddisfatte le condizioni per il raggiungimento della qualifica;
- nessun animale manifesti alcun sintomo riferibile a tubercolosi;
- tutti gli animali che entrano in allevamento provengano da allevamenti ufficialmente indenni da tubercolosi;

- non sia stato introdotto in azienda alcun animale di età superiore a sei settimane che non sia risultato negativo alla prova diagnostica ufficiale eseguita trenta giorni prima dell'introduzione o dopo la stessa previo isolamento sanitario;
- tutti gli animali, fatta eccezione per quelli di età inferiore a 6 settimane e nati in allevamento, siano sottoposti annualmente a una intradermotubercolizzazione.

Tuttavia, la frequenza delle prove di routine può essere modificata a seconda dell'incidenza dell'infezione secondo le seguenti modalità:

- qualora la media della percentuale annua di allevamenti bovini infetti da tubercolosi non risulti superiore all'1% in occasione degli ultimi due controlli annuali, l'intervallo tra le tubercolizzazioni di routine può essere portato a due anni e possono essere esonerati dalle tubercolizzazioni i maschi da ingrasso nell'ambito di una unità epidemiologica isolata purché provengano da allevamenti ufficialmente indenni da tubercolosi e il Servizio veterinario ufficiale assicuri che i maschi da ingrasso non saranno destinati all'allevamento e saranno direttamente abbattuti;
- qualora la media della percentuale annua di allevamenti bovini infetti da tubercolosi non risulti superiore allo 0,2% in occasione degli ultimi due controlli biennali, l'intervallo tra le tubercolizzazioni di routine può essere portato a tre anni e/o l'età degli animali sottoposti a queste prove può essere portata a 24 mesi;
- qualora la media della percentuale annua di allevamenti bovini infetti da tubercolosi non risulti superiore allo 0,1% in occasione degli ultimi due controlli triennali, l'intervallo tra le tubercolizzazioni di routine può essere portato a quattro anni, oppure il Servizio veterinario ufficiale può dispensare dalla tubercolizzazione dei capi degli allevamenti, a condizione che siano soddisfatti i seguenti requisiti:
 - 1) prima di essere introdotti in un allevamento tutti i bovini siano stati sottoposti a una intradermotubercolizzazione che abbia dato risultato negativo;
 - 2) tutti i bovini macellati siano oggetto di una ricerca delle lesioni provocate dalla tubercolosi e queste ultime siano sottoposte a un esame istopatologico e batteriologico per evidenziare il bacillo della tubercolosi.

Il Servizio veterinario ufficiale può inoltre decidere di aumentare la frequenza delle tubercolizzazioni nello Stato Membro o nella parte di Stato Membro qualora cresca il livello di diffusione della malattia.

La qualifica di allevamento ufficialmente indenne da tubercolosi è sospesa quando non sono più soddisfatte le condizioni richieste per il raggiungimento e il mantenimento o quando le reazioni di uno o più animali a una tubercolizzazione siano considerate positive o dubbie oppure venga sospettato un caso di tubercolosi nel corso dell'ispezione *post mortem* di routine. Se si ritiene che reagisca positivamente alla tubercolizzazione, un animale viene allontanato dall'allevamento e abbattuto. Sono quindi effettuati appropriati esami *post mortem* e epidemiologici e prove di laboratorio sulla reazione positiva o sulla carcassa dell'animale sospetto. La qualifica di allevamento ufficialmente indenne è sospesa fino al completamento di tutte le prove di laboratorio. Se la presenza della tubercolosi non è confermata, la qualifica di ufficialmente indenne da tubercolosi può essere ripristinata quando una prova su tutti gli animali di età superiore a sei settimane, effettuata almeno quarantadue giorni dopo l'allontanamento dell'animale o degli animali reattivi, ha dato esito negativo.

Il provvedimento di sospensione interviene anche nel caso in cui l'allevamento contiene animali aventi una qualifica indeterminata; in tal caso la qualifica dell'allevamento rimarrà sospesa fino a quando non si sarà chiarita la situazione degli animali; detti animali vengono separati dagli altri animali dell'allevamento fino a chiarimento della loro situazione, eseguendo un'altra prova dopo quarantadue giorni o esami *post mortem* e prove di laboratorio.

La qualifica di allevamento ufficialmente indenne dalla tubercolosi è revocata se la presenza della tubercolosi trovi conferma nell'isolamento del micobatterio mediante prove di laboratorio. Il Servizio veterinario ufficiale può altresì ritirare la qualifica se:

- a) non sono più soddisfatte le condizioni per il raggiungimento ed il mantenimento, o
- b) in occasione dell'esame *post mortem* risultano classiche lesioni da tubercolosi, o
- c) in un'indagine epidemiologica è stabilita la probabilità della presenza di un'infezione, o
- d) per qualunque altra ragione ritenuta necessaria per le esigenze di controllo della tubercolosi bovina.

La qualifica di allevamento ufficialmente indenne da tubercolosi rimane ritirata fino a quando siano stati puliti e disinfettati i locali e gli attrezzi di lavoro e tutti i bovini di età superiore alle sei settimane abbiano reagito negativamente ad almeno due intradermotubercolizzazioni consecutive, la prima almeno sessanta giorni e la seconda almeno quattro mesi e non più tardi di dodici mesi dopo la rimozione dell'ultimo animale risultato positivo.

Ai sensi del Decreto Legislativo 22 maggio 1999 n. 196, un territorio può essere dichiarato ufficialmente indenne da tubercolosi qualora siano soddisfatte le seguenti condizioni:

- a) la percentuale di allevamenti bovini di cui è confermato che sono stati infetti da tubercolosi non ha superato lo 0,1% annuo del totale degli allevamenti negli ultimi sei anni e almeno il 99,9% degli allevamenti è stato dichiarato ufficialmente indenne da tubercolosi ogni anno, negli ultimi sei anni;
- b) ciascun bovino è identificato secondo la normativa comunitaria;
- c) tutti i bovini macellati sono sottoposti a un'ispezione ufficiale *post mortem*;
- d) sono rispettate le procedure per la sospensione e il ritiro della qualifica di ufficialmente indenne da tubercolosi.

Il territorio mantiene la qualifica di ufficialmente indenne da tubercolosi se continuano a essere rispettate le condizioni sopra descritte; tuttavia, qualora vi siano cambiamenti significativi nella situazione di un territorio riconosciuto ufficialmente indenne da tubercolosi, la Commissione europea può decidere di sospendere o di revocare tale qualifica finché non siano soddisfatti i requisiti previsti dalla decisione.

Animali e allevamenti sospetti o infetti

Un bovino o un bufalino è considerato sospetto di infezione tubercolare quando:

- a) viene in contatto con capi di allevamenti infetti;
- b) le prove diagnostiche effettuate ai sensi della normativa vigente in materia ed interpretate dal Veterinario ufficiale sono da considerarsi dubbie.

I casi di sospetto di tubercolosi nei bovini e nei bufalini devono essere ufficialmente segnalati al Servizio veterinario competente per territorio ai sensi dell'RPV.

Nei confronti degli animali sospetti devono essere immediatamente applicate opportune misure di isolamento al fine di evitare ogni possibile contagio nell'attesa della diagnosi definitiva.

Nel caso di animali provenienti da allevamenti ubicati nel territorio di competenza di un'altra azienda/unità sanitaria locale, il Veterinario ufficiale che ha eseguito la diagnosi deve notificare l'episodio infettivo all'azienda/unità sanitaria locale di provenienza e alla regione. Se provenienti dall'estero si impone l'immediato avviso alla regione e al Ministero della Salute.

Nessun bovino o bufalino può entrare o uscire da un allevamento in cui vi siano animali sospetti d'infezione tubercolare salvo per immediata macellazione e previa autorizzazione rilasciata ai sensi dell'RPV, nell'attesa della diagnosi definitiva.

Un bovino o un bufalino è considerato infetto da tubercolosi quando:

- a) reagisce positivamente alle prove diagnostiche ufficiali;

- b) anche in presenza di un esito negativo alle prove diagnostiche ufficiali, la malattia risulta clinicamente manifesta o l'infezione è evidenziata dall'esito positivo di adeguate ricerche di laboratorio.

Un allevamento è considerato infetto da tubercolosi qualora uno o più capi sono dichiarati infetti in base ai riscontri clinici e/o diagnostici eseguiti *intra vitam* o *post mortem*.

Il Veterinario ufficiale addetto all'ispezione delle carni è tenuto a segnalare tempestivamente ogni riscontro di lesioni tubercolari, negli animali da macello, tramite l'apposito modello 10/33, fatta eccezione per i bovini o bufalini abbattuti in applicazione del piano di profilassi di Stato contro la tubercolosi bovina, per i quali è prevista la compilazione del modello 9/33. Al più presto, e comunque entro otto giorni dalla avvenuta macellazione, il modello 10/33 è trasmesso al Servizio veterinario ove ha sede l'allevamento di origine dell'animale infetto. Il Servizio veterinario territorialmente competente provvede a svolgere, non oltre quindici giorni, le opportune indagini e le prove diagnostiche.

Provvedimenti per gli animali sospetti e infetti

I bovini o bufalini dichiarati infetti devono essere subito isolati e macellati, sotto controllo ufficiale, al più presto e comunque non oltre quindici giorni dalla notifica ufficiale al proprietario o al detentore.

Ai sensi dell'ordinanza 28 maggio 2015 nelle aree protette di rilievo nazionale, qualora un focolaio si verifichi in allevamenti allo stato brado o al pascolo permanente nonché in tutti i casi in cui non risulti possibile garantire l'isolamento degli animali, il Servizio veterinario dispone direttamente l'abbattimento totale.

Per comprovate difficoltà di carattere logistico o commerciale, il Servizio veterinario può prorogare il termine per l'abbattimento totale fino a un massimo di trenta giorni dalla data di notifica del provvedimento, posto che ciò non costituisca un rischio per la salute.

Nel caso in cui il proprietario o detentore non provvede a macellare tutti i capi, l'autorità competente ordina l'abbattimento coattivo dei capi, con l'ausilio del Servizio veterinario e, se necessario, delle forze dell'ordine. In caso di abbattimento coattivo non è corrisposta l'indennità di abbattimento e tutte le spese sostenute per l'applicazione delle misure di polizia veterinaria sono a carico del proprietario o detentore. Per garantire il rapido abbattimento degli animali positivi o l'applicazione dell'abbattimento totale, in caso di assenza di adeguati stabilimenti di macellazione all'interno della regione di appartenenza dell'allevamento, il Servizio veterinario regionale può autorizzare la macellazione dei capi in stabilimenti situati in altre regioni, previo nulla osta da parte del Servizio veterinario regionale competente sul mattatoio individuato, informando contestualmente il Ministero della Salute.

Negli allevamenti dichiarati infetti si adottano le seguenti disposizioni:

- accurata indagine epidemiologica da parte del Veterinario ufficiale mirata a individuare l'origine della malattia e gli eventuali contatti avvenuti con altri allevamenti;
- segnalazione al Servizio di igiene pubblica territorialmente competente della presenza dell'infezione, unitamente alle misure urgenti adottate per impedire il contagio all'uomo;
- isolamento e sequestro degli animali infetti e sospetti dal resto dell'effettivo dell'allevamento;
- macellazione degli animali infetti;
- accurata pulizia e disinfezione;
- divieto di monta;

- mungitura degli animali sospetti o infetti separata e comunque successiva a quella dei soggetti sani, seguita da accurato lavaggio, pulizia e disinfezione delle attrezzature e dei locali;
- divieto di qualsiasi spostamento in entrata e in uscita dall'allevamento infetto, salvo autorizzazione per l'uscita di animali destinati a immediata macellazione;
- isolamento ed esecuzione delle prove diagnostiche ufficiali su vitelli e annutoli nati da madri infette;
- impiego del latte delle bovine infette prima dell'abbattimento, qualora non venga distrutto, unicamente per l'alimentazione animale, previo trattamento di risanamento nell'ambito dello stesso allevamento;
- rimozione dall'allevamento del latte di animali sani appartenenti ad allevamenti infetti in contenitori separati, identificati con appositi contrassegni e utilizzato esclusivamente per la fabbricazione di latte trattato termicamente o di prodotti a base di latte, dopo essere stato sottoposto a un idoneo trattamento termico da effettuarsi sotto il controllo delle autorità competenti. Tuttavia detto latte può essere risanato direttamente nell'azienda di produzione, a condizione che l'azienda stessa sia in possesso di specifico impianto per il risanamento del latte autorizzato dall'autorità sanitaria locale e sotto il costante controllo del Servizio veterinario ufficiale;
- sistemazione del letame proveniente dai ricoveri o da altri locali di stabulazione utilizzati dagli animali in luogo inaccessibile agli animali dell'allevamento. Il letame raccolto deve sottoposto ad adeguata disinfezione o conservato per almeno cinque mesi prima dell'uso; le stesse indicazioni si applicano ai liquami qualora non vengano raccolti contemporaneamente al letame;
- soppressione dei cani, dei gatti e degli psittacidi riconosciuti infetti.

Ripopolamento

A seguito dell'eliminazione dall'allevamento di tutti i soggetti infetti, nell'allevamento è necessario eseguire le prove ufficiali per confermare l'avvenuta eliminazione della malattia negli animali eventualmente rimasti.

L'introduzione di nuovi capi può avvenire soltanto dopo che i soggetti di età superiore a sei settimane abbiano fornito risultato negativo ad almeno due prove ufficiali, la prima delle quali eseguita ad almeno quarantadue giorni dall'eliminazione dell'ultimo capo infetto e dal termine delle operazioni di disinfezione ambientale, la seconda dopo almeno sei settimane dalla prima.

Entro sette giorni dall'eliminazione dei capi infetti e, comunque, prima di ricostituire l'allevamento, i ricoveri, gli altri locali di stabulazione, nonché tutti i contenitori, le attrezzature e gli utensili usati per gli animali e comunque tutto ciò che possa essere entrato in contatto con gli animali infetti, inclusi i mezzi di trasporto e le aree di carico/scarico, devono essere puliti e disinfettati sotto controllo ufficiale in seguito al quale il Veterinario rilascia il relativo certificato di disinfezione; l'utilizzo dei pascoli infetti non può avvenire prima di sessanta giorni dall'allontanamento degli animali.

Disposizioni particolari

Tra le disposizioni particolari di cui al Decreto Ministeriale del 15 dicembre 1995, n. 592 sono previsti i controlli sul personale di stalla cui è affidata la custodia degli animali. Nel caso in cui

questo rappresenti un pericolo per la diffusione del contagio, il Servizio veterinario competente deve darne comunicazione al Servizio di igiene pubblica.

Inoltre, nell'ambito delle misure da adottare in caso di infezione tubercolare, è prevista la possibilità di estendere le misure di polizia sanitaria in materia anche ad animali di altre specie, nei casi in cui il Servizio veterinario ritenga che la loro presenza possa compromettere l'esito del programma di eradicazione.

Laboratori ufficiali di riferimento

Il Regolamento (CE) 737/2008 della Commissione del 28 luglio 2008 e successive modifiche designa i laboratori comunitari di riferimento per talune malattie tra cui la tubercolosi bovina e modifica l'allegato VII del Regolamento (CE) 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004.

Il laboratorio comunitario di riferimento per la tubercolosi bovina è individuato nel VISAVET – Laboratorio de vigilancia veterinaria, Facultad de Avda, Madrid; mentre il laboratorio nazionale di riferimento per l'Italia è individuato nel Centro di Referenza Nazionale per la Tubercolosi da *M. bovis*, istituito con DM 4 ottobre 1999 presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sezione di Brescia.

Il laboratorio comunitario di riferimento per la tubercolosi bovina, oltre alle funzioni e ai compiti generali in materia di salute animale di cui all'articolo 32, paragrafo 2, del Regolamento (CE) 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004, espleta vari compiti e responsabilità, tra cui:

- 1) coordinare i metodi utilizzati negli Stati Membri per diagnosticare la tubercolosi bovina, e in particolare:
 - a) la tipizzazione, la conservazione e la fornitura di ceppi di *Mycobacterium* spp., agente della tubercolosi negli animali;
 - b) la preparazione, il controllo e la fornitura ai laboratori nazionali di riferimento di reagenti di riferimento, al fine di uniformare le prove e i reagenti utilizzati negli Stati Membri;
 - c) la validazione dei reagenti di riferimento, inclusi gli antigeni e le tubercoline presentati dai laboratori di riferimento nazionali per la tubercolosi bovina;
 - d) la costituzione e il mantenimento di una raccolta di *Mycobacterium* spp., agente della tubercolosi negli animali, e il mantenimento di una banca dati di ceppi isolati nella Comunità comprendente la tipizzazione;
 - e) l'organizzazione periodica di prove comparative delle procedure diagnostiche a livello comunitario e la realizzazione di prove di idoneità relative ai laboratori comunitari di riferimento;
 - f) la raccolta e il confronto dei dati e delle informazioni concernenti i metodi diagnostici utilizzati e i risultati degli esami effettuati nella Comunità;
 - g) la caratterizzazione di *Mycobacterium* spp., agente della tubercolosi negli animali, con i metodi più aggiornati per consentire una migliore comprensione dell'epidemiologia della malattia;
 - h) l'aggiornamento sugli sviluppi, a livello internazionale, in materia di sorveglianza, epidemiologia e prevenzione della tubercolosi bovina;
 - i) l'acquisizione di conoscenze approfondite sulla preparazione e sull'impiego dei prodotti di immunologia veterinaria utilizzati per la lotta contro la tubercolosi bovina e la sua eradicazione, inclusa la valutazione dei vaccini.

- 2) svolgere attività di ricerca e, ove possibile, coordinare le attività di ricerca dirette a migliorare la lotta contro la tubercolosi bovina e la sua eradicazione.

Al laboratorio di riferimento nazionale spetta invece il controllo ufficiale delle tubercoline e dei reagenti per garantirne la rispondenza alle norme vigenti in materia.

Indennità di abbattimento

Ai proprietari degli animali abbattuti o macellati in applicazione del piano di profilassi di Stato contro la tubercolosi bovina è riconosciuta la corresponsione di un'indennità ai sensi della Legge 23 gennaio 1968 n. 33, secondo le norme e i criteri previsti dal decreto del Ministro della sanità 14 giugno 1968 e successive modifiche, ai sensi della Legge 28 maggio 1981 n. 286.

La concessione di detta indennità è vincolata al rispetto da parte del detentore degli animali della tempistica prevista per l'abbattimento dei capi infetti; in generale l'allevatore è tenuto a offrire la massima collaborazione per l'esecuzione delle operazioni di risanamento e in particolare deve provvedere al contenimento degli animali e a rispettare tutti gli obblighi previsti dal presente regolamento.

Unitamente alla domanda di indennizzo, il richiedente consegna al Servizio veterinario territorialmente competente il certificato di abbattimento (modello 9/33) non oltre sessanta giorni dall'abbattimento dell'ultimo capo infetto.

L'entità dell'indennità di abbattimento per i capi di specie bovina (e bufalina) infetti e abbattuti o distrutti per la tubercolosi è stata oggetto fin dalla sua prima determinazione con Decreto Ministeriale 14 giugno 1968 di periodici aggiornamenti, l'ultimo dei quali è contenuto nel Decreto Ministeriale del 19 settembre 2016. Attualmente la misura massima dell'indennità di abbattimento prevista dall'articolo 6 della Legge 28 maggio 1981 n. 296, da corrispondere ai proprietari dei bovini abbattuti perché infetti da tubercolosi è stabilita in € 473,81 che, nel caso in cui le carni e i visceri debbano essere interamente distrutti, può essere elevata a € 869. L'indennità di abbattimento per i bufalini è di € 408,43 che diventano € 748,49 nel caso le carni e i visceri debbano essere completamente distrutti. Le indennità sono incrementate del 50% nel caso di allevamenti che non superino i 10 capi e distinte per categoria, età e sesso degli animali.

Sicurezza degli alimenti

Nella vigente normativa in materia di sicurezza alimentare, la tubercolosi è trattata nell'ambito della macellazione degli animali infetti e del destino delle carni ed è presente tra i requisiti sanitari per la produzione primaria per quanto concerne gli animali produttori di latte.

Relativamente al primo ambito, il Regolamento (CE) 854/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 (all. I, sez. II, capo III, capo IV; sez. IV, capo IX) stabilisce che qualora gli animali abbiano reagito in modo positivo o dubbio a tubercolinoreazione o vi siano altri motivi per sospettare un'infezione tubercolare, essi siano macellati separatamente dagli altri, con tutte le precauzioni per evitare il rischio di contaminazione delle altre carcasse, della catena di macellazione e del personale presente nel macello.

Le carni di animali nei quali all'ispezione *post mortem* siano state evidenziate lesioni tubercolari localizzate in una serie di organi o in una serie di zone della carcassa, sono dichiarate non idonee al consumo umano. Tuttavia, qualora una lesione tubercolare sia stata constatata nei linfonodi di un solo organo o di una sola parte di carcassa, solo l'organo colpito o la parte di carcassa colpita e i linfonodi associati possano essere dichiarati non idonei al consumo umano.

Per quanto riguarda la produzione di latte, il Regolamento (CE) 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 prevede (all. II, sez. IX, cap. 1) che il latte crudo provenga da vacche o bufale appartenenti a un allevamento ufficialmente indenne da tubercolosi ai sensi della direttiva 64/432/CEE; tuttavia il latte crudo proveniente da allevamenti che non soddisfano tale requisito può essere utilizzato, previa autorizzazione dell'autorità competente, nel caso di animali che non presentano reazione positiva alle prove diagnostiche ufficiali né sintomi di malattia, previo trattamento termico che consenta di ottenere una reazione negativa alla prova della fosfatasi alcalina.

EPIDEMIOLOGIA E SORVEGLIANZA DELLA TUBERCOLOSI NEGLI ANIMALI E NELL'UOMO

Fonti dei dati

Negli animali domestici (specie bovina e bufalina)

Il presente rapporto utilizza i dati dei piani nazionali di eradicazione della tubercolosi negli allevamenti bovini e bufalini attuati in Italia dal 2001 al 2016 dai Servizi Veterinari delle Aziende Sanitarie Locali (ASL) e trasmessi dalle Regioni al Ministero della Salute.

I Servizi veterinari utilizzano il SANAN per pianificare le attività di profilassi negli allevamenti di propria competenza e per registrare l'esito delle intradermotubercolizzazioni effettuate. Attraverso lo stesso sistema informativo il Servizio veterinario regionale e il Ministero della Salute hanno pertanto la possibilità di monitorare il livello di esecuzione delle attività di controllo durante l'anno e l'andamento del piano di eradicazione.

I dati registrati nel SANAN confluiscono nel Sistema informativo Rendicontazioni deputato a raccogliere i dati sanitari e finanziari necessari a soddisfare il debito informativo del nostro Paese nei confronti della Commissione europea relativamente ai piani di controllo oggetto di cofinanziamento.

Le informazioni relative ai focolai di malattie animali e alle rispettive indagini epidemiologiche sono raccolte dal Sistema informativo SIMAN per la notifica dei focolai e la gestione delle emergenze epidemiche. In tale applicativo risulta altresì disponibile una funzionalità derivante dall'integrazione dei dati relativi ai focolai con quelli anagrafici contenuti in BDN, utile a effettuare indagini di *trace back* e *trace forward* finalizzate a individuare le possibili vie di introduzione e diffusione dell'infezione.

I dati sulle popolazioni animali in Italia, sono stati estratti dalla BDN dell'anagrafe zootecnica, raggiungibile tramite il Portale unico dei sistemi informativi veterinari VETINFO (<https://www.vetinfo.sanita.it/>) ed elaborati sotto forma di mappe presenti nel documento dal CRN-TB.

La BDN dell'anagrafe zootecnica è uno strumento fondamentale per la conoscenza reale della consistenza e della distribuzione del patrimonio zootecnico nazionale e per la garanzia della tracciabilità e rintracciabilità degli animali, elementi essenziali per la sicurezza alimentare, la sorveglianza epidemiologica e la gestione delle emergenze sanitarie a tutela della sanità animale e della salute pubblica.

Nel gennaio 2002 il Ministero della Salute ha affidato all'IZS dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" il compito di progettare, realizzare e gestire la BDN, di cui la Commissione Europea con Decisione n. 153 del 13 febbraio 2006 ne ha formalmente riconosciuto il carattere pienamente operativo.

Ad oggi la BDN gestisce le anagrafi bovina e bufalina, ovina e caprina, suina, avicola, apistica dell'acquacoltura e degli equidi.

La banca dati dell'anagrafe bovina è alimentata dalla registrazione continua da parte di operatori pubblici (Ministero, Regioni, ASL) e degli stessi allevatori, dei dati inerenti gli allevamenti, le stalle di sosta, i centri genetici, i centri di raccolta, i mercati e i pascoli presenti sul territorio italiano e i capi in essi detenuti o transitati.

Per ciascuna struttura zootecnica, univocamente individuata dal codice aziendale, sono disponibili le informazioni relative alla georeferenziazione, alla tipologia di struttura,

all'orientamento produttivo e alla modalità di allevamento e per ciascun capo sono riportate le informazioni relative al codice identificativo individuale, alla data di nascita, alla razza, alla madre e a tutte le movimentazioni, dalla nascita sino alla macellazione.

È compito del detentore infine aggiornare, per ogni allevamento, il relativo registro di stalla in cui è tenuto ad annotare tutti i movimenti in ingresso e in uscita (nascite e acquisti di bovini, cessioni e morti in azienda). Le medesime informazioni devono inoltre essere registrate, entro 7 giorni dallo specifico evento, anche nella BDN.

Nell'uomo

In Italia, la sorveglianza delle malattie infettive è svolta principalmente attraverso il Sistema di Notifica delle Malattie Infettive (SIMI). Questo sistema è regolato dal DM del 15 dicembre 1990 e successiva modifica relativa alla sorveglianza della TB e alla micobatteriosi (DM del 29 luglio 1998) ed è coordinato dalla Direzione Generale della Prevenzione del Ministero della Salute. Il flusso informativo si svolge attraverso il Medico, ospedaliero o di base, che diagnostica la malattia infettiva (per la tubercolosi basta il sospetto) ed effettua la segnalazione alla ASL di competenza. Le ASL sono incaricate dell'adozione di eventuali misure di profilassi a tutela della salute pubblica e la Regione ha azione di supervisione e coordinamento con gli Organismi Centrali.

La TB bovina può essere notificata come zoonosi in classe II che include le malattie rilevanti perché a elevata frequenza e/o passibili di interventi di controllo o in classe III che include le malattie per le quali sono richieste particolari documentazioni (AIDS, lebbra, malaria, micobatteriosi non tubercolare, TB). In caso si verifichino episodi epidemici a trasmissione alimentare è prevista la notifica in classe IV.

La suddivisione in classi risponde a criteri di tempestività di informazione e intervento, di rilevanza epidemiologica e a esigenze differenziate di profilassi. Le modalità di notifica e le malattie notificabili suddivise per classi sono riportate in Tabella 6.

Oltre al SIMI vi è inoltre il Sistema Informativo Ospedaliero (SIO) che raccoglie mensilmente i dati relativi alle dimissioni ospedaliere per istituto di erogazione e contestualmente produce una reportistica utile ai fini del monitoraggio del flusso informativo e della valutazione dell'attività erogata. I dati raccolti riguardano tutte le prestazioni di ricovero effettuate presso presidi ospedalieri pubblici, case di cura private accreditate con il Servizio Sanitario Nazionale, case di cura private solo autorizzate e tutti gli istituti aziendalizzati pubblici e privati (Aziende Ospedaliere, Policlinici Universitari e IRCCS).

Annualmente il SIO fornisce i dati per l'elaborazione di Rapporti per la descrizione dell'attività di ricovero sintetizzando l'enorme mole di informazioni rilevate con l'obiettivo di fornire un quadro d'insieme sugli elementi essenziali dell'assistenza ospedaliera. Le basi di dati sono una preziosa fonte di dati per ricerche, studi epidemiologici oltre che per la valutazione e la programmazione dei servizi sanitari.

La Scheda di Dimissione Ospedaliera (SDO) costituisce una rappresentazione sintetica della cartella clinica, finalizzata a consentire una raccolta dei dati sanitari del paziente e informazioni sulla tipologia di assistenza erogata dall'équipe sanitaria. Rappresenta quindi un supporto nei processi di valutazione, programmazione, gestione, controllo dell'attività ospedaliera, rilevazione sistematica di carattere epidemiologico e statistico. È essenzialmente composta da due parti:

- dati anagrafici e di ammissione;
- dati sanitari alla dimissione.

Tabella 6. Classi di notifica delle malattie infettive secondo il SIMI

Classi di notifica	Tempi di segnalazione del Medico alla ASL	Malattie
Classe I Malattie per le quali si richiede segnalazione immediata o perché soggette al Regolamento sanitario internazionale o perché rivestono particolare interesse	12 ore	Colera, botulismo, febbre gialla, febbre ricorrente epidemica, influenza con isolamento virale, febbri emorragiche virali (febbre di Lassa, Marburg, Ebola), rabbia, peste, tetano, poliomielite, trichinosi, tifo esantematico, difterite
Classe II Malattie rilevanti perché ad elevata frequenza e/o passibili di interventi di controllo	48 ore	Blenorragia, brucellosi, diarree infettive non da <i>Salmonella</i> (DINS), epatite virale A, B, nAnB, epatite virale non specificata, febbre tifoide, legionellosi, leishmaniosi cutanea, leishmaniosi viscerale, leptospirosi, listeriosi, meningite ed encefalite acuta virale, meningite meningococcica, morbillo, parotite, pertosse, rickettsiosi diversa da tifo esantematico, rosolia, salmonellosi non tifoidee (SNT), scarlattina, sifilide, tularemia, varicella
Classe III Malattie per le quali sono richieste particolari documentazioni	48 ore	AIDS, lebbra, malaria, micobatteriosi non tubercolare, tubercolosi
Classe IV Malattie per le quali alla segnalazione del singolo caso da parte del Medico deve seguire la segnalazione dell' ASL solo quando si verificano focolai epidemici	24 ore	Dermatofitosi (tigna), infezioni, tossinfezioni e infestazioni di origine alimentare, pediculosi, scabbia
Classe V Malattie infettive e diffuse notificate all' ASL e non comprese nelle classi precedenti; zoonosi indicate dal Regolamento di Polizia Veterinaria (DPR 320/1954) e non precedentemente menzionate	Ogni anno in un riepilogo al Ministero <i>(con le modalità previste della Classe IV, quando assumono le caratteristiche di focolaio epidemico)</i>	

Le informazioni rilevate attraverso la SDO sono finalizzate a descrivere i seguenti aspetti essenziali del ricovero ospedaliero:

- motivi che hanno determinato il ricovero (diagnosi principale di dimissione ed eventuali diagnosi concomitanti e/o complicanti);
- tipologie di trattamento adottate nel corso del ricovero (eventuali interventi chirurgici, principali procedure diagnostiche e terapeutiche effettuate);
- esito complessivo del trattamento (stato del paziente al momento della dimissione, incluso il decesso, e la sua destinazione dopo la dimissione).

Le diagnosi di dimissione (principale e secondarie) vengono codificate secondo la Classificazione Internazionale delle Malattie, (*International Classification of Diseases, Ninth Revision, Clinical Modification, ICD9-CM*), stilata dalla WHO, sistema di classificazione nel quale le malattie e i traumatismi sono ordinati per finalità statistiche in gruppi tra loro correlati. La classificazione utilizzata è la versione italiana dell'ICD9-CM, che contiene oltre 11000 codici di diagnosi e oltre 3500 codici di interventi e procedure. La SDO fa parte dei flussi informativi del Nuovo Sistema Informativo Sanitario (NSIS).

È necessario tenere presente che la banca dati delle SDO, per quanto abbia un ricchissimo contenuto informativo e una copertura pressoché totale delle strutture ospedaliere italiane, ha comunque dei limiti e delle criticità nell'utilizzo, come ad esempio problemi di omogeneità della compilazione, problemi di completezza e accuratezza per alcune variabili (soprattutto nei primi anni) e variazione dei sistemi di classificazione nel corso degli anni.

Tubercolosi nella specie bovina in Italia (2001-2016)

Al fine di armonizzare le informazioni raccolte nelle diverse regioni, la normativa vigente in materia di TB, ha definito delle modalità di controllo che oltre a salvaguardare la salute pubblica perseguendo il raggiungimento dello stato di indennità dell'intero territorio nazionale, ha individuato degli indicatori che permettono di definire il trend della malattia prima a livello nazionale e successivamente a livello comunitario.

Prima di entrare nel merito di questi indicatori, è necessaria una panoramica della popolazione bovina italiana e della sua distribuzione, che è subordinata alla vocazione zootecnica delle diverse province e regioni italiane (Figura 10) che ha fortemente condizionato l'evoluzione della malattia sul territorio e di conseguenza il suo controllo.

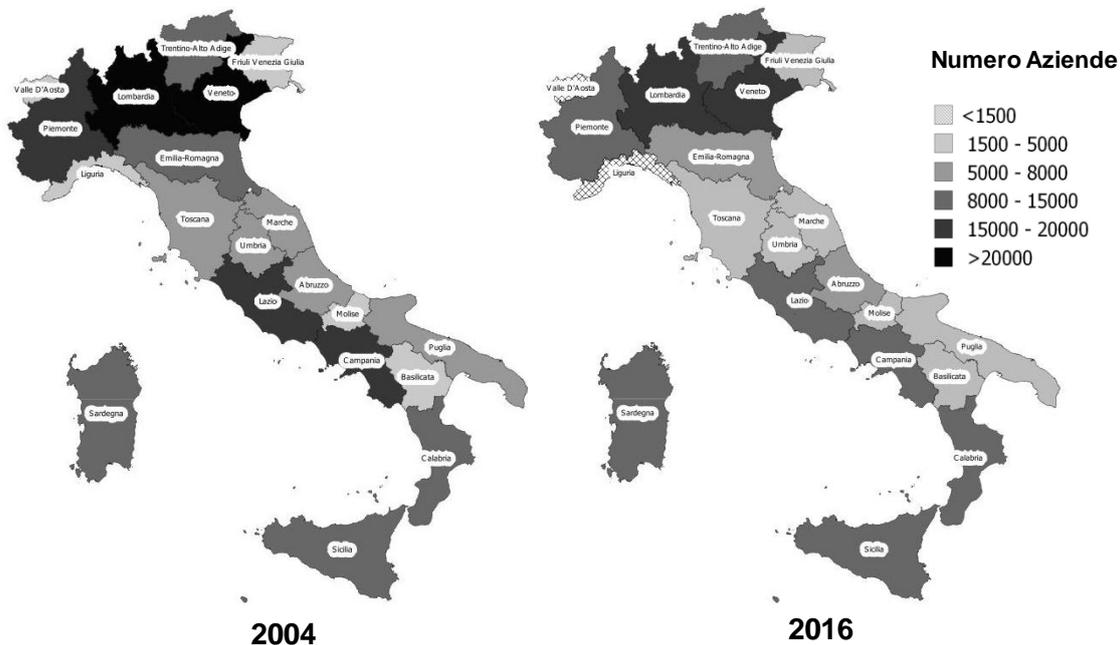
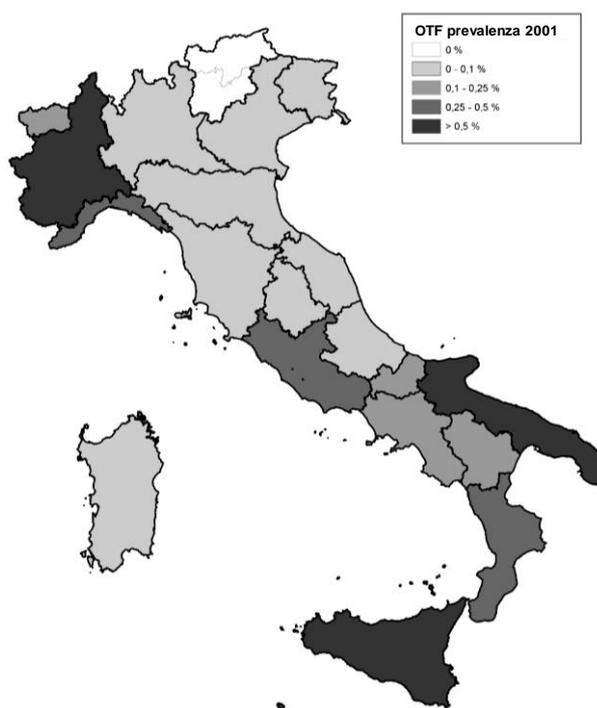


Figura 10. Numero di aziende con allevamenti bovini al 31 dicembre 2004 e 2016
(Fonte dati VETINFO ed elaborazione dati CRN-TB)

A partire dagli anni duemila il piano di controllo ed eradicazione della tubercolosi bovina trova completa attuazione, con diverse modalità applicative, proprio in funzione del patrimonio zootecnico presente sul territorio, in termini di numeri di unità zootecniche, di consistenza media delle aziende e di tipologia produttiva (produzione latte, carne, pascolo, ecc).

Nel 2001 la prevalenza della malattia rispecchia la situazione socio-economica legata alla distribuzione territoriale della popolazione bovina, infatti nelle aree a elevata vocazione zootecnica la prevalenza è prossima allo zero, mentre negli altri territori vi è un'elevata diffusione della tubercolosi (Figura 11).



**Figura 11. Prevalenza di *M. bovis*. Italia, 2001 (la prevalenza si riferisce alle aziende presenti)
(Fonte dati VETINFO ed elaborazione dati CRN-TB)**

In questo contesto devono essere valutati i dati relativi al Piano di Eradicazione Nazionale; infatti, nel periodo considerato, a fronte di un incremento progressivo dei controlli eseguiti si assiste a un progressivo decremento del numero degli allevamenti soggetti a programma e conseguente riduzione del numero di allevamenti controllati da 142209 nel 2001 a 57391 nel 2016 (Figura 12).

La riduzione del 43% degli allevamenti bovini controllati è da mettere in relazione principalmente a due fattori: la progressiva chiusura di aziende di piccole dimensioni con l'ottenimento, a partire dal 2004, della qualifica di Ufficialmente Indenne da parte di alcuni territori (Figura 13), beneficiando di conseguenza di un livello minimo di sorveglianza (come indicato anche dalla normativa comunitaria) con riduzione del numero dei controlli effettuati.

Comunque a partire dal 2006, con l'entrata in vigore dell'ordinanza ministeriale 14/11/2006 "Misure straordinarie di polizia veterinaria in materia di tubercolosi", si è assistito a un incremento dei controlli anche a seguito della verifica più puntuale delle unità zootecniche soprattutto nelle regioni con una prevalenza più elevata.

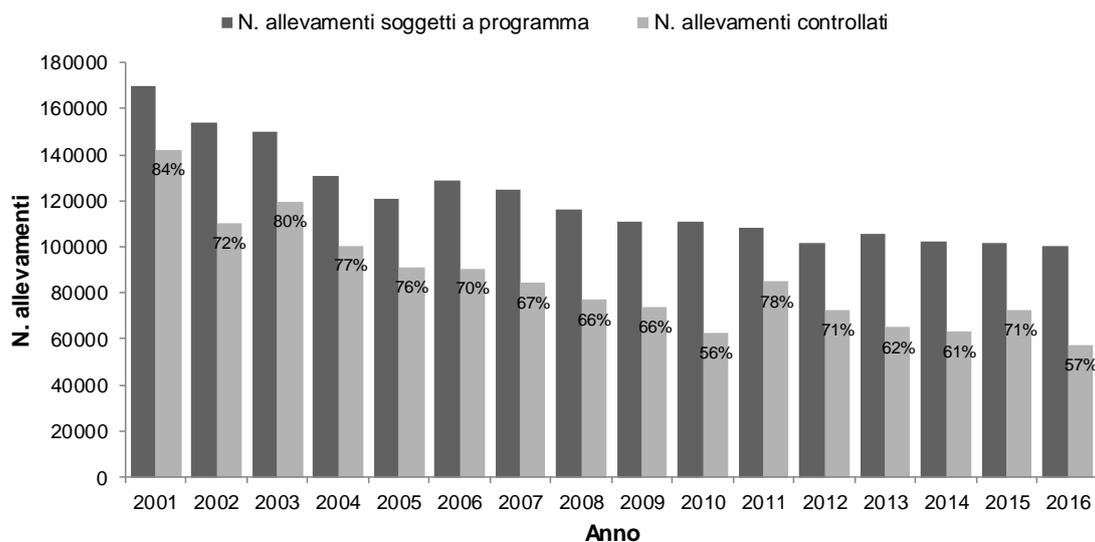


Figura 12. Allevamenti bovini soggetti a programma e controllati per TB bovina. Italia, 2001-2016 (Fonte dati VETINFO ed elaborazione dati CRN-TB)

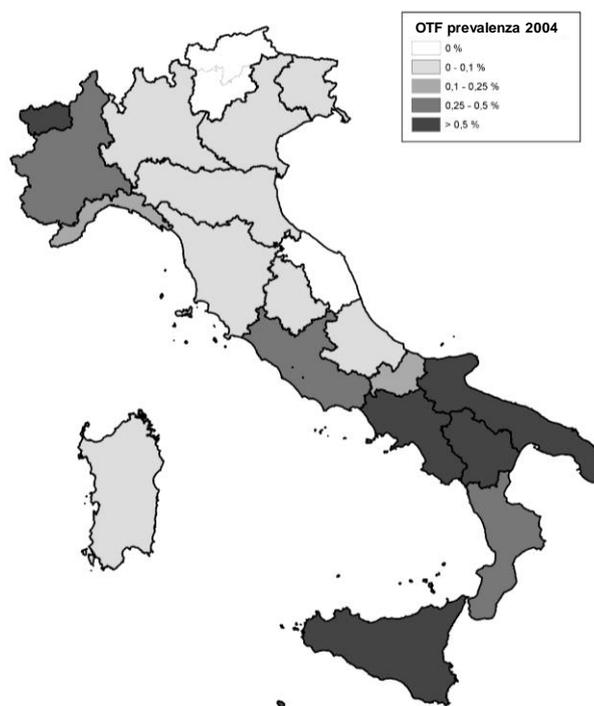


Figura 13. Prevalenza di *M. bovis*. Italia, 2004 (la prevalenza si riferisce alle aziende presenti) (Fonte dati VETINFO ed elaborazione dati CRN-TB)

Questa eterogeneità di applicazione fornisce apparentemente un andamento altalenante ininfluenza sulla situazione territoriale, andata progressivamente migliorando (Figure 13-15) anche grazie l'acquisizione dello stato di indennità da parte delle regioni a maggior vocazione zootecnica (produzione di latte).



Figura 14. Territori (Province e/o Regioni) ufficialmente indenni da TB bovina. Italia, 2010
(Fonte dati VETINFO ed elaborazione dati CRN-TB)

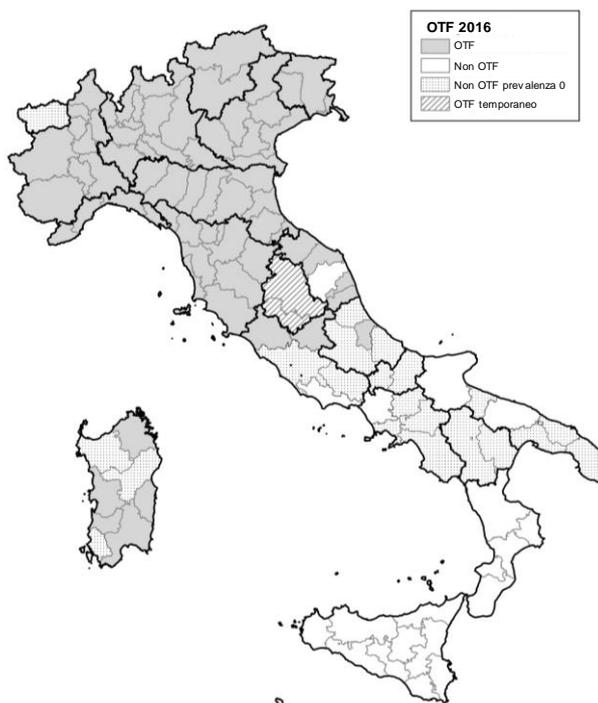


Figura 15. Territori (Province e/o Regioni) ufficialmente indenni da TB bovina. Italia, 2016
(Fonte dati VETINFO ed elaborazione dati CRN-TB)

In linea generale possiamo affermare che l'attività di eradicazione della malattia sul territorio nazionale, è stata lenta ma progressiva tanto da arrivare nel 2016 a un totale di 68 province OTF (vedi Figura 15).

Nella Tabella 7 è rappresentata la distribuzione delle regioni e province ufficialmente indenni da tubercolosi (OTF) in Italia e le relative decisioni comunitarie attestanti la qualifica sanitaria.

Tabella 7. Regioni e province ufficialmente indenni da TB bovina. Italia, maggio 2016
(Fonte dati EFSA)

Regione	Provincia	Decisione CE
Abruzzo	Pescara	2006/169/CE
Emilia-Romagna	Tutte le province	2007/174/CE
Friuli Venezia Giulia	Tutte le province	2006/290/CE
Lazio	Rieti	2011/277/CE
	Viterbo	
Lombardia	Bergamo	2003/467/CE
	Como	2005/28/CE
	Lecco	2003/467/CE
	Sondrio	
	Tutte le province	
Marche	Ascoli Piceno	2003/467/CE
	Pesaro/Urbino e Ancona	2016/467/CE
Liguria	Genova, Imperia, La Spezia e Savona	2016/467/CE
Piemonte	Novara	2007/174/CE
	Verbania	
	Vercelli	2008/97/CE
	Asti-Biella	2012/204/EU
Sardegna	Alessandria, Cuneo e Torino	2016/467/CE
	Cagliari	2010/391/CE
	Medio Campidano	
	Ogliastra	
	Olbia-Tempio	
Oristano		
Toscana	Grosseto	2004/230/CE
	Livorno	2007/174/CE
	Lucca	
	Pisa	2008/97/CE
	Pistoia	
	Prato	
	Siena	2007/174/CE
	Tutte le province	2010/391/CE
Trentino-Alto Adige	Bolzano	2003/467/CE
	Trento	
Umbria	Tutta la regione	2017/888/EU
Veneto	Belluno	2007/174/CE
	Padova	
	Tutte le province	2008/404/CE

Queste attestazioni territoriali, sono supportate anche dalla valutazione epidemiologica dell'incidenza e della prevalenza di diffusione della malattia sul territorio, come possiamo osservare in Figura 16.

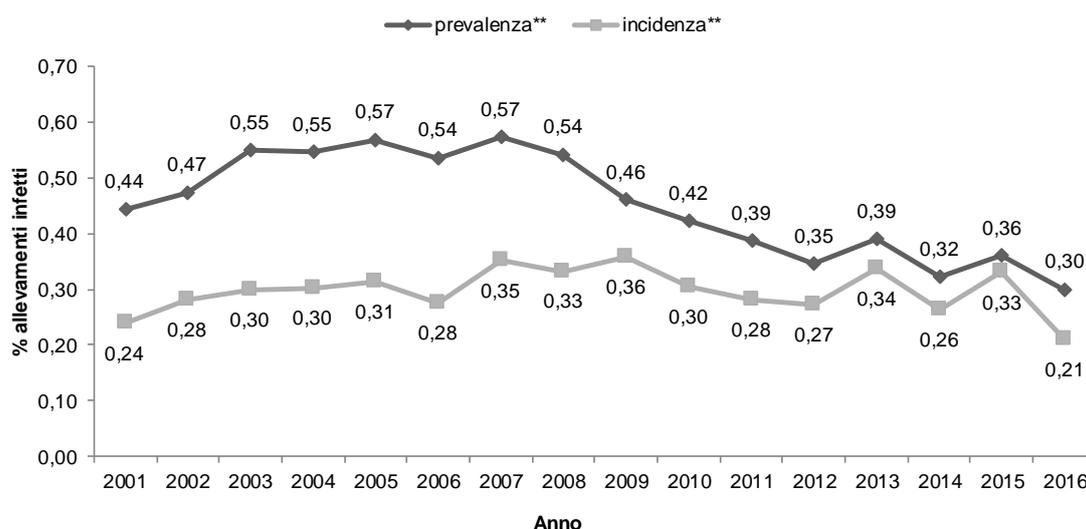


Figura 16. Prevalenza e incidenza da TB bovina. Italia, 2001-2016
(Fonte dati VETINFO ed elaborazione dati CRN-TB)

A questa riduzione della prevalenza è associata anche una progressiva diminuzione dell'insorgenza di focolai; l'incidenza degli stessi si è mantenuta pressoché stabile nella maggior parte degli anni, con un aumento nel 2013 a causa della riacutizzazione della malattia nella regione Sicilia, andata però significativamente migliorando negli anni successivi.

A partire dal 2009 le curve, di prevalenza e incidenza, tendono ad avvicinarsi sempre più a dimostrazione del progressivo miglioramento nel controllo della malattia in particolare nella gestione dei focolai, nei quali i tempi di chiusura durante l'anno solare sono sensibilmente migliorati con una riduzione numerica del 48%, di quelli rimasti aperti rispetto al 2009 (Figura 17).

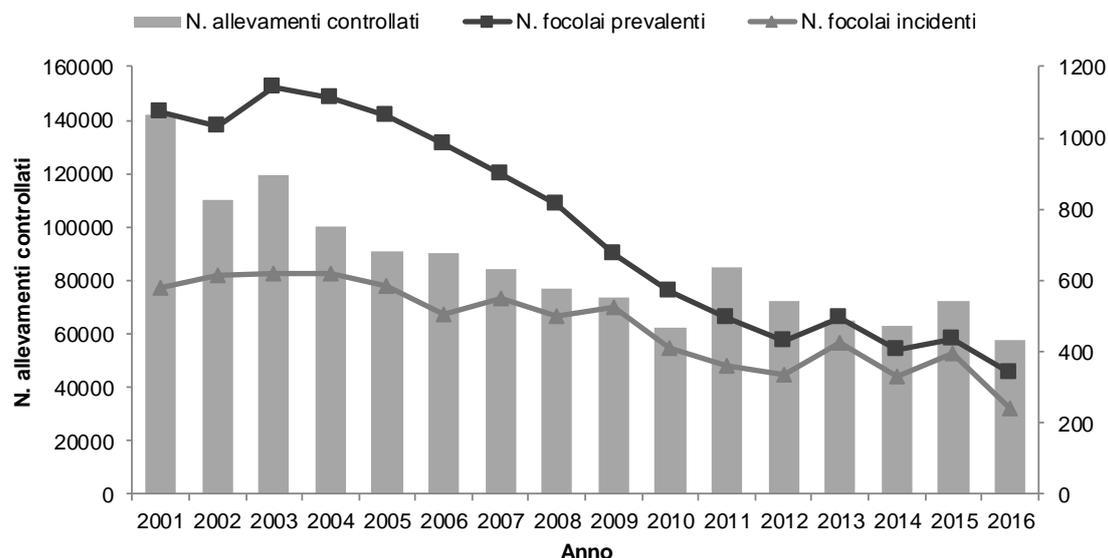


Figura 17. Focolai prevalenti e incidenti da TB bovina. Italia, 2001-2016
(Fonte dati VETINFO ed elaborazione dati CRN-TB)

Ciò rappresenta un importante indicatore di efficienza dei Servizi Veterinari che hanno saputo ottimizzare i tempi di esecuzione della prova intradermica, dando la possibilità agli allevamenti di riacquisire la qualifica sanitaria in tempi più ragionevoli per la gestione sia della malattia sia dell'attività imprenditoriale.

È in questo contesto che deve essere valutato il costante miglioramento del numero di allevamenti ufficialmente indenni presenti sull'intero territorio nazionale (Figura 18).

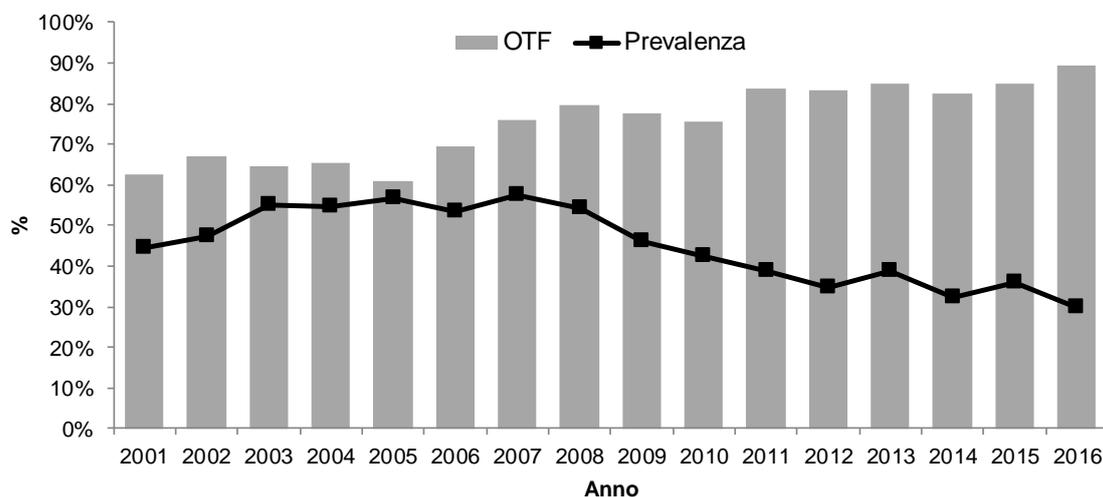


Figura 18. Allevamenti OTF (%) e prevalenza da TB bovina. Italia, 2001-2016
(Fonte dati VETINFO ed elaborazione dati CRN-TB)

Gli approcci adottati nel corso degli anni, nelle regioni Veneto, Lombardia, Piemonte, Marche e Toscana hanno permesso di raggiungere la qualifica di ufficialmente indenne, mentre per altri territori di ridurre drasticamente la prevalenza della malattia con valori prossimi allo zero (Umbria, Valle d'Aosta, Basilicata e alcune province del Lazio, Abruzzo, Molise Sardegna e Puglia).

Anche l'adozione della politica dello stamping out dei capi presenti in un allevamento infetto, non sempre condivisa dagli allevatori, ha contribuito notevolmente a ridurre l'incidenza della malattia (Figura 19).

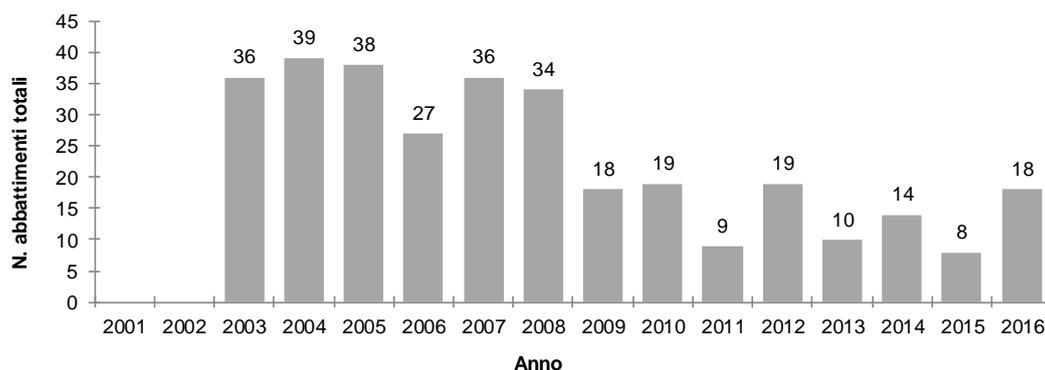


Figura 19. Abbattimenti totali da TB bovina. Italia, 2001-2016
(Fonte dati VETINFO ed elaborazione dati CRN-TB)

Questa scelta trova ragione d'essere in quanto è dimostrato che i focolai di nuova insorgenza (incidenti) sono presenti in allevamenti caratterizzati in passato da episodi di tubercolosi bovina, gestiti attraverso gli abbattimenti selettivi, con possibile mantenimento dell'infezione allo stato latente associata anche a contaminazione ambientale.

Lo stamping out è imprescindibile in territori ufficialmente indenni o con prevalenze molto basse, ma è consigliabile anche in situazioni di recrudescenza dell'infezione con epidemie che coinvolgono numerosi allevamenti per giungere rapidamente all'eradicazione e non rischiare di mantenere *M. bovis* in allevamento. Esempi successivi della gestione di nuovi episodi di tubercolosi bovina nelle regioni autonome di Sardegna e Valle d'Aosta e nella provincia autonoma di Trento confermano che il costo-beneficio del de-popolamento negli allevamenti infetti è sempre vantaggioso sia per l'allevatore, che deve essere garantito nella disponibilità di poter rimpiazzare senza grandi perdite gli animali abbattuti, soprattutto se in aree disagiate, sia per il servizio sanitario nazionale, che riesce così a controllare e a eradicare questa pericolosa zoonosi i tempi ragionevoli.

Alla fine del 2016 la situazione dell'Italia, per quanto concerne la diffusione della tubercolosi, appare molto favorevole anche se frammentata, con 8 regioni e 12 province OTF, prevalentemente localizzate nell'Italia Centro-Settentrionale.

Questa situazione è comunque in evoluzione, con altre regioni e province che si apprestano a ricevere qualifica OTF, in quanto altre regioni tra cui, l'Umbria, la Valle d'Aosta e alcuni territori del Centro-Sud come alcune province del Lazio, della Campania, della Puglia, della Sardegna e della Basilicata presentano prevalenza zero o molto bassa (<0,5%).

Ci sono comunque alcuni territori in cui la tubercolosi bovina rimane endemica e che nel 2016 hanno contribuito per il 94% dei focolai prevalenti e per il 100% per quelli incidenti (Figura 20).

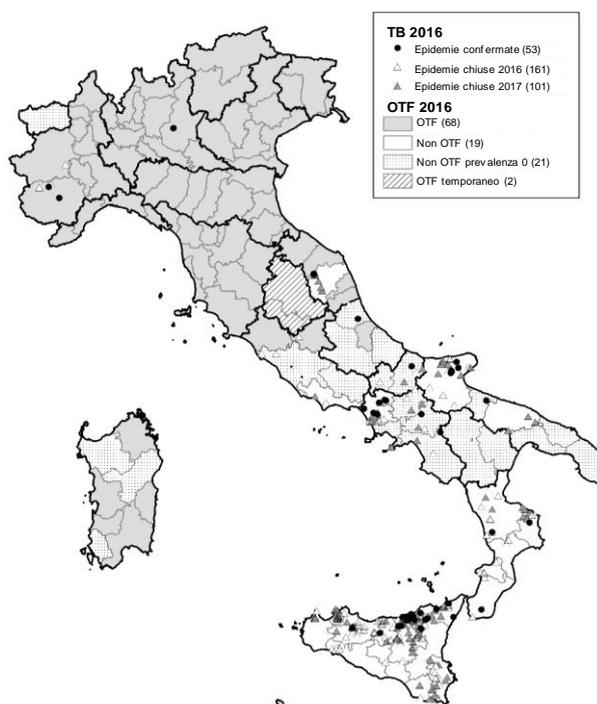


Figura 20. Localizzazione focolai di TB bovina. Italia, 2016
(Fonte dati VETINFO ed elaborazione dati CRN-TB)

Sicuramente a questo risultato hanno contribuito anche le diverse Ordinanze Ministeriali in materia di tubercolosi, brucellosi bovina e bufalina, brucellosi ovi-caprina, leucosi, emanate dal Ministero della Salute, la prima datata 14 novembre 2006, la seconda del 2009 e l'ultima del 28 maggio 2015.

Gli anni di applicazione di queste ordinanze, hanno promosso una maggiore attenzione da parte dei Servizi Veterinari territoriali, assicurando la copertura quasi totale del patrimonio controllabile riuscendo così a contribuire alla riduzione dei focolai prevalenti nelle regioni dove la malattia è considerata endemica (da 898 nel 2007 a 340 nel 2016); tuttavia l'incidenza ancora elevata (il 100% dei focolai incidenti è stato registrato in questi territori), testimonia le difficoltà dell'eradicazione di *M. bovis* dal territorio.

È evidente che le criticità legate alle movimentazioni illegali e alla carenza nella verifica dell'efficacia non sono ancora del tutto sotto controllo e che i Servizi Veterinari sono chiamati a elevare l'impegno nell'applicazione del piano di eradicazione, al fine di incrementare il numero di aziende ufficialmente indenni.

Dei 56.911 allevamenti soggetti a programma nel 2016, nelle regioni/province italiane OTF, solo 5 sono risultati positivi evidenziati attraverso la sorveglianza al macello che riveste un ruolo fondamentale al fine di fornire indicazioni utili ad individuare quegli allevamenti dove risiedono animali anergici. Il numero di segnalazioni al macello registrate durante il periodo di applicazione del piano è indicato in Figura 21.

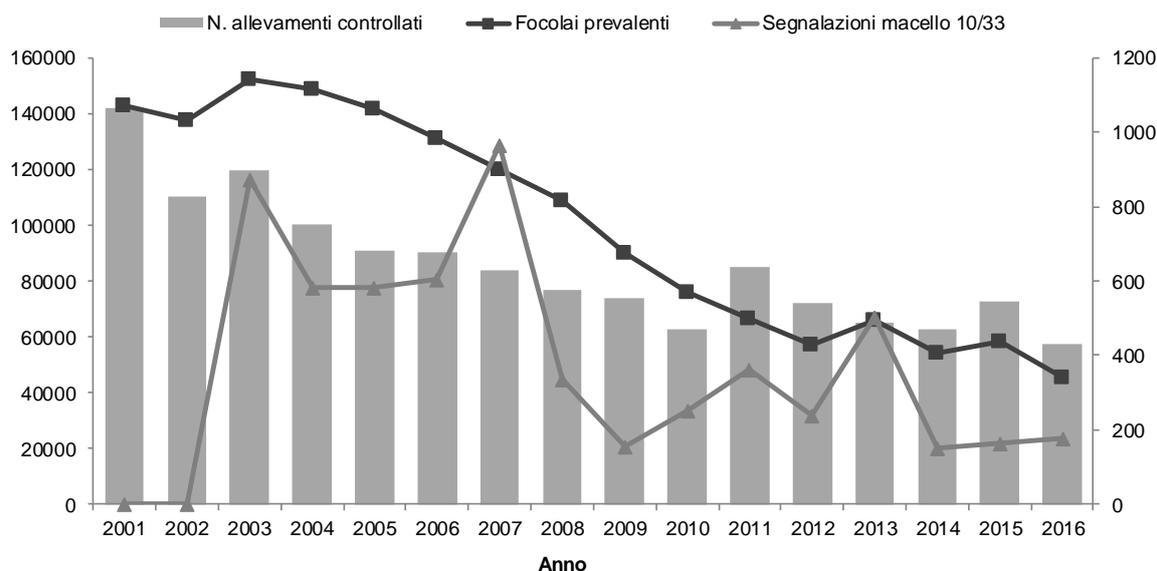


Figura 21. TB bovina in Italia: segnalazioni al macello e focolai. Italia, 2001-2016
(Fonte dati VETINFO ed elaborazione dati CRN-TB)

È utile sottolineare che la qualifica europea di ufficialmente indenne non significa assenza di focolai sul territorio: è infatti ammessa l'esistenza di focolai commisurata allo 0,1% delle aziende controllabili, senza che questo infici sullo status sanitario del territorio.

Questo potrebbe spiegare, almeno in parte, i fenomeni di recrudescenza della tubercolosi bovina verificatisi nel triennio 2007-2009 nelle regioni autonome di Sardegna e Valle d'Aosta e nella provincia autonoma di Trento, quest'ultima ufficialmente indenne da tubercolosi bovina.

Nella provincia autonoma di Trento tra il 2007 e il 2009 si sono verificati una ventina di focolai di tubercolosi bovina causata da *M. caprae* (Zanardi, 2011), di cui i primi scoperti attraverso la sorveglianza al macello, mentre i successivi individuati con il tracing on e rilevati con la prova tubercolinica. Diversi focolai secondari causati dal commercio di animali infetti sono stati scoperti in altre regioni italiane (Veneto, Lombardia e Puglia). La probabile origine dell'infezione è stata identificata con l'introduzione, in una grande stalla di sosta, di diverse partite di bovine infette provenienti da centri di raccolta e stalle di sosta esteri.

L'epidemia di tubercolosi bovina in Sardegna (Sgarangella, 2009) si è verificata in un territorio delimitato, area del Goceano nell'ASL di Sassari, caratterizzato da aree di pianura, collina e montagna, dall'esistenza di pascoli comuni e pertinenze di terreni aziendali, adibiti anch'essi a pascolo, intorno ai corpi principali degli allevamenti in pianura. La tubercolosi bovina era presente in questa zona già nel 1998; la tipologia di allevamento coinvolta è stata la linea vacca-vitello. Hanno sicuramente inciso anche la modalità di pascolo brado e l'età media dei capi elevata. Anche in questo caso, i quasi 80 focolai sono stati rilevati in seguito alla segnalazione al macello di lesioni tubercolari. Presenza di lesioni tubercolari è stata anche riscontrata nei cinghiali selvatici, da ritenersi indicatori biologici dell'infezione trasmessa dai bovini.

Le criticità emerse in questo episodio epidemico sono state: il diradamento delle prove tubercoliniche (frequenza biennale), la persistenza dell'infezione in bovine di età avanzata, la frammentazione delle aziende, con una media di capi contenuta, la pratica non regolamentata del pascolo comune e privato in appezzamenti di terreno (pertinenze) tra loro confinanti, la movimentazione illegale degli animali, le difficoltà logistiche nella gestione dei focolai e nella disinfezione degli allevamenti, legate alle caratteristiche oro-geografiche del territorio. La realizzazione di un piano straordinario basato sull'analisi del rischio e sul controllo con la prova tubercolinica con frequenza semestrale, con individuazione delle aziende positive e rimozione della fonte d'infezione attraverso lo stamping out, ha reso possibile il contenimento e l'eradicazione dell'infezione in soli tre anni.

Per quanto riguarda la regione Valle d'Aosta, la difficoltà a eradicare la tubercolosi bovina, la cui prevalenza è rimasta costante oltre il 2% nel corso degli anni, ha indotto i Servizi Veterinari ad applicare un monitoraggio stringente della popolazione bovina, attraverso l'uso parallelo della prova tubercolinica e dell'interferone-gamma per aumentare la sensibilità diagnostica. I pascoli in comune, la partecipazione degli animali a fiere e i combattimenti delle "reine" (regine) sono elementi peculiari e radicati nelle tradizioni della regione, che comportano movimentazioni e rimescolamenti degli animali, più volte l'anno, infatti al pascolo comune erano ammessi allevamenti con differente qualifica sanitaria e la diffusione dell'infezione era causata anche da movimentazioni di animali infetti.

L'applicazione di un piano straordinario di eradicazione della tubercolosi bovina ha portato all'individuazione di 49 nuovi focolai nel 2008 su un totale di 57, alcuni coinvolgenti anche allevamenti di capre, che avevano condiviso il pascolo con bovini infetti.

L'epidemia di tubercolosi bovina verificatasi nelle diverse regioni presenta alcuni elementi in comune come la persistenza delle infezioni sul territorio confermata dall'isolamento degli stessi genotipi. Queste regioni caratterizzate da territori montuosi con tipologie prevalenti di aziende per la produzione di latte (produzioni tipiche) e per la linea vacca-vitello, con un patrimonio bovino di età avanzata.

Con l'entrata in vigore dell'O.M. "Misure straordinarie di polizia veterinaria in materia di tubercolosi, brucellosi bovina e bufalina, brucellosi ovi-caprina, leucosi in Calabria, Campania, Puglia e Sicilia" del 2006 si è assistito ad un aumento del numero di nuovi focolai di tubercolosi da *M. bovis*.

Questo fenomeno ha coinvolto principalmente la regione Sicilia dove si è assistito all'incremento di segnalazioni di lesioni sospette a seguito di macellazione di bovini per positività

alla brucellosi bovina. Anche in questa regione la persistenza dell'infezione in bovine di età avanzata, la frammentazione delle aziende, la movimentazione illegale degli animali, le difficoltà nella gestione dei focolai per le caratteristiche geografiche del territorio, la promiscuità con altre specie animali domestiche e selvatiche ha contribuito a mantenere attivi dei focolai di infezione (Di Marco, 2012).

A questo si aggiunge che la procrastinata chiusura dei focolai è fonte di continue reinfezioni, dimostrato anche dal fatto che il numero dei focolai incidenti è sovrapponibile a quello dei prevalenti.

Aspetti microbiologici e genotipici dei micobatteri isolati da animali in Italia

Nel periodo 2003-2016, il laboratorio del Centro di referenza ha sottoposto a isolamento 9822 campioni di cui 2564 conferimenti di bovini, 91 bufalini, 1095 ruminanti selvatici, 2071 cinghiali, 101 volpi, 482 suini e 155 animali da compagnia, come dettagliato in Tabella 8.

Tabella 8. Campioni per tipologia e per specie animale negli anni 2013-2016

Specie	N.visceri/carcasse conferiti
Bovino	2564
Bufalo	91
Ovi-caprino	44
Suino	482
Ruminanti selvatici	1095
Volpi	101
Cinghiali	2071
Avicoli	77
Primati	10
PET	155
Pesci	464
Mammiferi marini	8

I campioni, dopo essere stati trattati con i protocolli precedentemente descritti, sono stati seminati in parallelo sia nelle provette del MGIT 960 sia nei terreni solidi a base d'uovo in uso presso il CRN-TB. I risultati dell'isolamento sono indicati in Tabella 9.

Il CRN-TB inoltre ha eseguito la genotipizzazione dei ceppi isolati, a livello nazionale, dai focolai/casi di TB dagli allevamenti di bovino/bufalo negli ultimi 15 anni; questi dati hanno permesso una valutazione delle caratteristiche genetiche della popolazione di *M. bovis*/*M. caprae* e fornito nuove informazioni sulle modalità di diffusione della malattia nel tempo e nello spazio nel nostro Paese.

La raccolta dei ceppi a livello nazionale è iniziata nel 2000 ma fino al 2007 i ceppi provenivano principalmente dalle regioni del Nord-Italia e più limitatamente da focolai del Centro-Sud. Dal 2007, dopo il raggiungimento da parte di alcune regioni del Nord della qualifica di ufficialmente indenni, e grazie al miglioramento nella raccolta dei ceppi da parte della rete IZS nel Centro-Sud, la maggioranza degli isolati proviene da focolai di TB del Centro-Sud Italia e in particolare dalla Sicilia.

Tabella 9. Ceppi di micobatteri isolati dal 2003 al 2016 presso CRN-TB

Specie	2003-2016
<i>M. bovis</i>	834
<i>M. avium</i>	101
<i>M. fortuitum</i>	56
<i>M. marinum</i>	33
<i>M. nonchromogenicum</i>	49
<i>M. chelonae</i>	30
<i>M. terrae complex</i>	18
<i>M. kansasii</i>	7
<i>M. microti</i>	14
<i>M. gordonae</i>	4
Colture miste <i>M. bovis</i> e altro micobatterio (<i>M. nonchromogenicum</i> - <i>M. avium</i> - <i>M. kansasii</i>)	4
<i>M. tuberculosis</i>	1
Totale	1151

L'analisi genotipica mediante *spoligotyping* di 5152 ceppi isolati dal 2000 al 2016 da 3491 focolai di TB in allevamenti di bovino/bufalo ha permesso una valutazione delle caratteristiche genetiche della popolazione di *M. bovis*/*M. caprae* presente nel nostro Paese. I ceppi sono stati differenziati in 145 spoligotipi di cui i 3 più diffusi sono *M. bovis* SB0120, SB0134 e SB0841 (Figura 22).

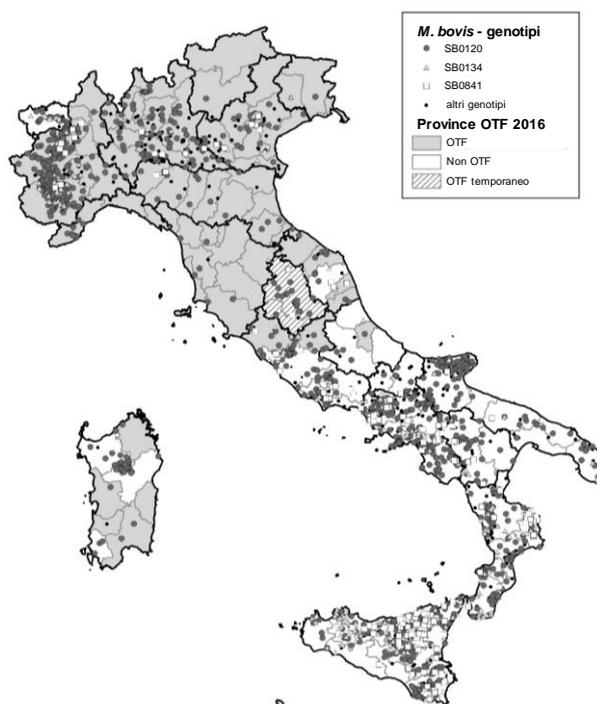


Figura 22. Spoligotipi di TB bovina maggiormente diffusi. Italia, 2000-2016
(Fonte ed elaborazione dati CRN-TB)

L'insieme di questi 3 spoligotipi rappresenta più del 70% degli isolati (Boniotti, 2009). Il 48,4% dei ceppi appartiene allo spoligotipo SB0120, uno degli spoligotipi maggiormente diffusi in Francia, Belgio (Haddad, 2004), Germania, Spagna (Aranaz, 1996), e Portogallo (Duarte, 2010), quasi assente nel Regno Unito e Irlanda (Smith, 2003; Haddad, 2004) dove invece prevale lo spoligotipo SB0140 o spoligotipi caratterizzati dall'assenza dello spacer 11 (Smith, 2012).

M. caprae è presente nel 9,2 % dei nostri allevamenti positivi alla TB ma con una diversa distribuzione territoriale (Figura 23). In particolare si trova più frequentemente nelle regioni del Nord-Est (Lombardia, Veneto, Trentino-Alto Adige) e al Sud in Puglia e Campania. Lo spoligotipo più frequente è SB0418, il 4° spoligotipo maggiormente diffuso in Italia (6,8%). SB0418 è stato identificato anche in Austria, Germania e nei Paesi dell'Est Europa.

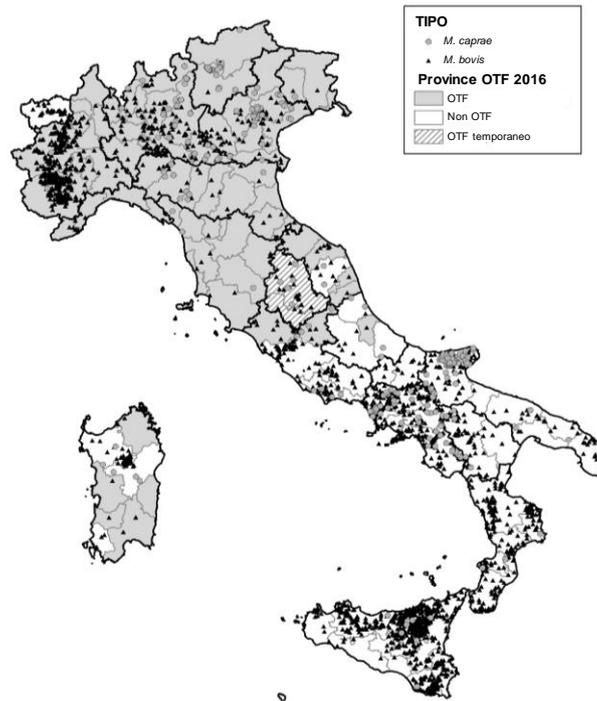


Figura 23. Distribuzione geografica di *M. caprae* e *M. bovis*. Italia, 2000-2016
(Fonte ed elaborazione dati CRN-TB)

Come già indicato da diversi autori, l'analisi *spoligotyping* ha una scarsa capacità differenziativa (indice di diversità genotipica di 0,7% nella popolazione di *M. bovis* in Italia) (Boniotti, 2009) e non fornisce informazioni sufficienti per i rintracci epidemiologici o per studiare in dettaglio la presenza di cluster spaziotemporali nel nostro Paese.

Per questo motivo a partire dal 2008, presso il CRN-TB, tutti i ceppi di *M. bovis*/*M. caprae* sono stati tipizzati con *spoligotyping* e con l'analisi MLVA utilizzando 12 loci VNTR che comprendono: 5 loci ETR (ETRA, ETRB, ETRC, ETRD, ETRE) descritti da Frothingham (Frothingham, 1998) e 7 loci VNTR/ MIRU selezionati da Boniotti (Boniotti, 2009) come altamente discriminanti per la popolazione di *M. bovis* in Italia: VNTR2163a (QUB11a), VNTR2163b (QUB11b), VNTR3155 (QUB15), VNTR2996 (MIRU 26), VNTR4052 (QUB26), VNTR3232 (QUB3232) e VNTR1895 (QUB1895). Il pannello comprende anche il set consensus identificato dal progetto europeo VEnoMYC.

La combinazione spoligotyping/MLVA è stata applicata a partire dal 2008 su 3008 ceppi isolati da 1915 focolai di TB in allevamenti di bovino/bufalo identificando 868 genotipi diversi e mostrando un notevole aumento della capacità differenziativa del sistema.

Se consideriamo lo spoligotipo maggiormente diffuso SB0120 (presente nel 48,5% dei nostri focolai) dei ceppi isolati dal 2008-2016, esso è differenziato con l'analisi MLVA in 418 genotipi diversi rappresentati in un albero di connessioni con *Minimum Spanning Tree* (MST) in Figura 24.

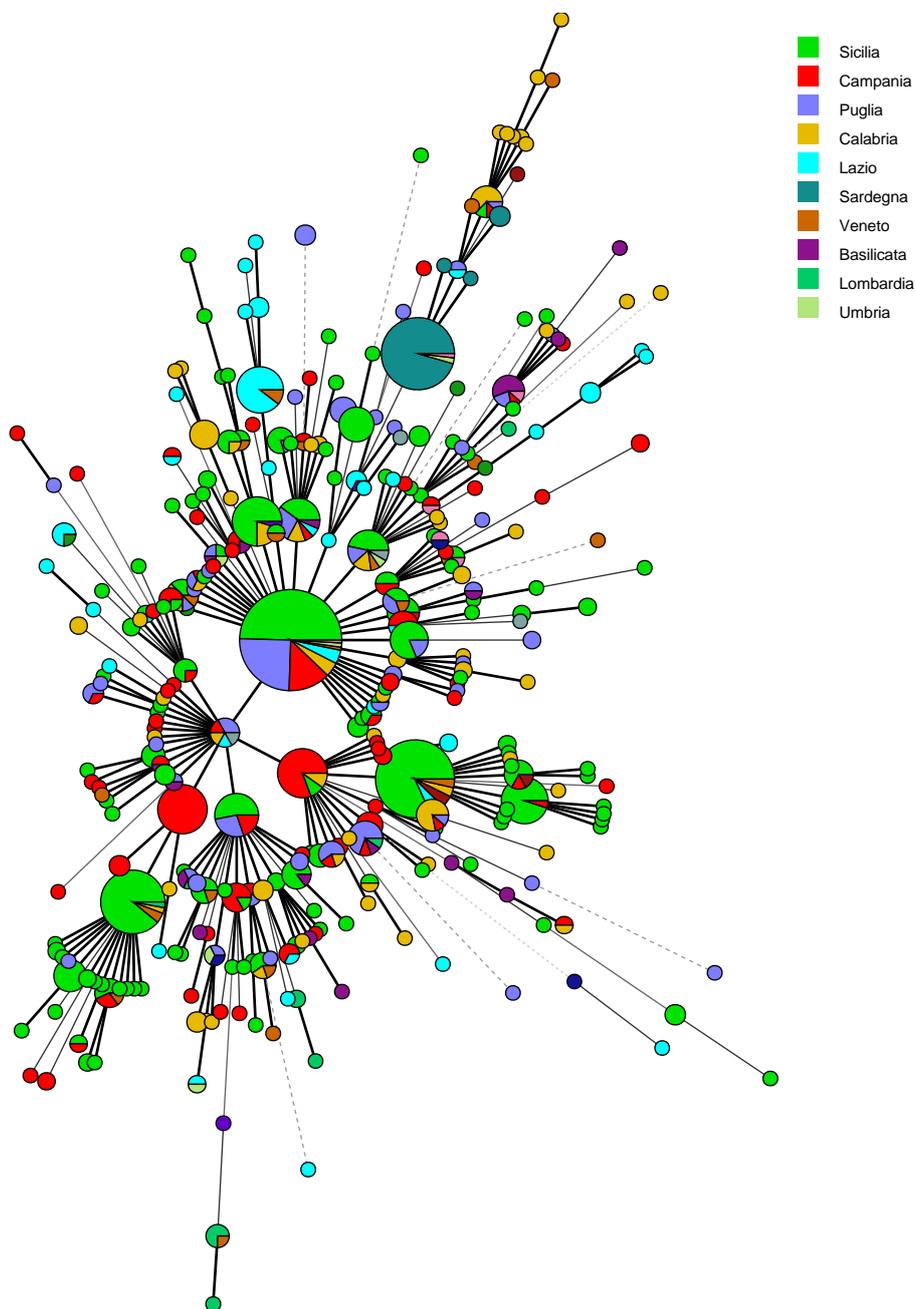


Figura 24. Albero filogenetico con MST dei genotipi di SB0120 (2008-2016)
(Fonte ed elaborazione dati CRN-TB)

L'analisi ha evidenziato che:

- il genotipo più diffuso SB0120/4553310444365 (ordine dei marcatori VNTR come descritto sopra), al centro dell'albero MST, potrebbe essere uno dei precursori della popolazione di *M. bovis* in Italia. Inizialmente era diffuso anche nelle regioni del Nord-Centro Italia ma poi ridotto dai piani di eradicazione. I dati di genotipizzazione spoligotyping/MLVA a nostra disposizione dal 2008, lo identificano principalmente nelle regioni del Sud (Sicilia, Campania, Puglia e Calabria);
- alcuni dei genotipi più diffusi di SB0120 mostrano una precisa localizzazione geografica (regionalizzazione), come ad esempio SB0120/7,5,5,3,2,10,3,5,4,3,6,5 presente prevalentemente in Sardegna, SB0120/5,3,5,3,3,10,4,4,4,3,6,5 localizzato esclusivamente in Campania, e SB0120/3,3,5,3,3,10,4,4,4,3,6,5 isolato principalmente in Sicilia;
- associati ai cluster principali sono presenti numerose varianti genetiche risultato di una microevoluzione nel tempo dei genotipi principali. Se consideriamo i profili genetici di SB0120 degli ultimi 3 anni (2014-2016), in generale vi è stata una riduzione della diversità genotipica di SB0120 corrispondente a una riduzione della prevalenza di TB come risultato all'applicazione dei piani di eradicazione in Italia, tuttavia si evidenzia l'espansione di alcuni genotipi specialmente in Sicilia rappresentata dalle sfere di colore verde dell'albero MST. Il genotipo principale SB0120/4553310444365 si è ridotto in Puglia e Calabria ma continua la sua diffusione in Sicilia e Campania, mentre 2 genotipi, prima rappresentati da pochi isolati, sono in espansione in Sicilia con la formazione di nuove varianti genetiche.

Lo spoligotipo SB0134 (frequenza dell'11% dei focolai) è stato differenziato dall'analisi MLVA in 76 genotipi. Analogamente a quanto descritto per SB0120, anche il genotipo principale di SB0134 (5453410454365), prima presente in tutto il Paese, è dal 2008 principalmente diffuso nelle regioni del Centro-Sud Italia (Sicilia, Campania, Puglia, Lazio). Il 2° genotipo (SB0134/5453410354365) ora prevale in Sicilia e Campania, mentre il 3° maggiormente frequente (SB0134/3353410454365) mostra una precisa clusterizzazione geografica in Calabria. Negli ultimi 3 anni i 2 genotipi principali continuano la loro diffusione in Sicilia e Campania.

Lo spoligotipo SB0841 (frequenza dell'8%) è stato differenziato dall'analisi MLVA in 57 genotipi distinti di cui i 3 più frequenti (5453310444365, 555335444365 e 5553310444365) sono presenti quasi esclusivamente in Sicilia, e sono in continua espansione come mostrano i dati degli ultimi 3 anni.

Se consideriamo *M. caprae*, lo spoligotipo più frequente è SB0418 che rappresenta il 4° spoligotipo più diffuso in Italia (6,8% dei focolai). Si trova sia nelle regioni del Nord Italia (Lombardia, Veneto e Trentino Alto-Adige) sia al Sud (Campania e Puglia). L'analisi MLVA lo suddivide in 53 genotipi diversi di cui i 5 maggiormente diffusi hanno una diversa distribuzione geografica: 2 sono presenti nel Nord Italia e corrispondono rispettivamente al genotipo Lechtal (Prodinger, 2005) che ha interessato un gruppo di focolai in Lombardia (Vallecamonica, BS) dal 2002-2005 (Chiari, 2014), e al genotipo Allgau che è stato isolato da un gruppo di focolai localizzati principalmente in provincia di Trento e in Veneto. Grazie alla combinazione delle informazioni raccolte dall'indagine epidemiologica tradizionale e dalla genotipizzazione, in entrambi i casi è stata possibile un'accurata ricostruzione epidemiologica che ha identificato come fonte d'infezione l'introduzione di animali infetti dal Nord Europa (Austria e/o Germania) dove sono stati rilevati gli stessi genotipi nel bovino e nel cervo (Fink, 2015).

Gli altri 3 genotipi più frequenti di SB0418 (535251053435, 535351053435 e 73635953635) sono principalmente presenti in Puglia e Campania e mostrano molte varianti genetiche, risultato di microevoluzione nel tempo dei genotipi principali. In questo caso non abbiamo informazioni epidemiologiche sufficienti per stabilire se si tratta di ceppi presenti da lungo tempo in Italia o se possano essere stati introdotti con il commercio di animali da altri Paesi europei.

La raccolta dei ceppi e delle informazioni mediante la rete IZS e la genotipizzazione routinaria con *spoligotyping* e MLVA ci hanno permesso di ottenere molte informazioni sulla dinamica della popolazione di *M. bovis*/*M. caprae* in Italia in particolare a partire dal 2008. L'applicazione dei piani di eradicazione ha ridotto la variabilità genetica della popolazione di *M. bovis* in un bottleneck selezionando un numero limitato di genotipi di cui alcuni si stanno espandendo in particolare nelle regioni NOTF dove la presenza della TB è tuttora rilevante come Sicilia e Campania. In parallelo alla loro diffusione compaiono spesso varianti genetiche (mutazioni in uno/due loci VNTR) nello stesso territorio (regione).

Nel corso degli anni il sistema di genotipizzazione è stato utilizzato come supporto alle indagini epidemiologiche tradizionali per confermare o smentire ipotesi di trasmissione e diffusione della TB sul territorio nazionale, dimostrando la sua validità per il rintraccio delle fonti d'infezione diventando parte integrante dei piani di eradicazione della TB in Italia.

Considerazioni

È ormai dimostrato che l'applicazione di un programma di eradicazione basato su un test diagnostico e l'eliminazione dei capi infetti è in grado di ridurre rapidamente l'incidenza e le forme cliniche di TB, fino alla sua eliminazione.

Gli elementi che caratterizzano il successo di un piano di eradicazione per la TB sono molteplici:

- la disponibilità di un'anagrafe bovina aggiornata e la capacità di controllo della movimentazione degli animali;
- la corretta applicazione e interpretazione della prova tubercolinica, eventualmente abbinata al test dell'interferone-gamma;
- il mantenimento di un'efficace sistema di sorveglianza al macello;
- l'esecuzione dell'esame colturale per l'isolamento dell'agente eziologico, affiancato da tecniche di tipizzazione molecolare dei ceppi isolati;
- l'esecuzione d'indagini epidemiologiche approfondite in caso di focolaio;
- la tempestiva estinzione dei focolai, possibilmente attraverso il depopolamento dell'allevamento focolaio;
- il rispetto dei flussi informativi a livello locale, regionale e nazionale.

La prova intradermica con la tubercolina, l'ispezione post-mortem e l'esame colturale sono i punti fondanti su cui è imperniata la diagnosi della tubercolosi bovina. 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 malattia antica per la quale oggi sono disponibili affidabili tecniche di diagnostica molecolare che possono anche essere di aiuto nello studio dell'evoluzione genetica della popolazione di *M. bovis* e nella comprensione dei collegamenti epidemiologici che si possono evidenziare con la mappatura e la comparazione dei ceppi circolanti sul nostro territorio e di quelli presenti in altri paesi (Boniotti, 2009).

È da ricordare che la diagnosi di tubercolosi bovina è sempre a livello di allevamento e non di singolo animale, poiché la probabilità che un allevamento infetto sia identificato correttamente dall'IDT (herd level sensitivity) è in funzione della prevalenza d'infezione intra-aziendale, del numero di animali controllati, della sensibilità del test a livello di singolo animale e del numero minimo di animali positivi al test richiesto per classificare l'allevamento come infetto.

Il controllo di qualità in itinere della diagnosi e dell'efficacia del sistema di sorveglianza per la tubercolosi bovina è decisivo per mantenere il controllo della situazione sanitaria, soprattutto nelle aree OTF o in quelle nella fase finale dell'eradicazione. Infatti, il calo "fisiologico" di

attenzione nei sistemi di sorveglianza delle malattie già eradicabili è inconfutabile e può portare a spiacevoli, non imprevedibili, recrudescenze, come avvenuto in Italia negli anni 2007-2010.

Nel complesso, c'è stata una tendenza generale a ridurre l'infezione in tutto il Paese.

Fa eccezione la regione Sicilia in cui la prevalenza negli ultimi anni ha fatto registrare un incremento, mentre nelle altre regioni NOTF si attesta a 0,26%.

È interessante sottolineare che, se si esclude la Sicilia, il calcolo della prevalenza della tubercolosi bovina e bufalina in Italia nell'anno 2016 si attesta sullo 0,1%.

La prevalenza nelle regioni/province non-OTF, dal 2009 al 2016, è diminuita del 40%, anche in seguito all'applicazione delle O.M. che si sono susseguite dal 2006 in poi e hanno accelerato i processi di eradicazione in Calabria, Campania, Puglia, Basilicata e Sicilia.

Inoltre, considerando le recrudescenze di tubercolosi bovina verificatesi in regioni/province OTF, è da considerare l'opportunità di applicare piani di sorveglianza basati sulla valutazione del rischio d'introduzione dell'infezione, non basandosi esclusivamente sulla sorveglianza al macello come misura di controllo.

Infatti, il mantenimento del controllo con il test tubercolinico su tutti gli allevamenti nelle regioni OTF è molto raccomandabile e la frequenza andrebbe decisa su evidenze epidemiologiche aggiornate.

Nel caso in cui tutti gli allevamenti non siano controllati annualmente, si può programmare il controllo annuale su un campione rappresentativo di allevamenti selezionati su base random, integrato con quelli selezionati sulla base della valutazione del rischio, in modo da garantire la copertura di tutti gli allevamenti controllabili in un determinato periodo, che può essere di 2, 3 o 4 anni in funzione della determinazione del rischio.

Esempi di criteri di reclutamento di allevamenti considerati a rischio di introdurre la tubercolosi bovina possono essere i seguenti:

- allevamenti sede di focolai pregressi o con anamnesi di molte reazioni non conclusive all'IDT o con reazioni non confermate o con presenza di un singolo animale positivo rilevato al macello;
- allevamenti identificati in attività di rintraccio di animali movimentati da focolai pregressi (anche se già risultati negativi a una prova tubercolinica);
- stalle di sosta o centri di raccolta, in cui applicare il post-movement testing a campione su partite di nuova introduzione;
- allevamenti che praticano l'alpeggio o la transumanza o altre forme che portano al rimescolamento di animali provenienti da differenti allevamenti;
- allevamenti da ingrasso che compra-vendono animali da diversi fornitori;
- allevamenti che acquistano capi da stalle di sosta.

Gli allevamenti da ingrasso che inviano i capi esclusivamente al macello, senza movimentazioni "da vita", sono esentati dal controllo con la prova tubercolinica, per ovvie difficoltà nel contenimento degli stessi e di pericolo per gli operatori. Essi sono accreditati in modo induttivo, poiché possono introdurre solo animali provenienti da allevamenti ufficialmente indenni e comunque controllati con la prova intradermica non più di 30 giorni prima della movimentazione. Nondimeno, anche per essi vale l'indagine epidemiologica e la sorveglianza epidemiologica al macello, la visita ispettiva post-mortem con i successivi approfondimenti diagnostici tesi all'isolamento e identificazione del micobatterio. Il controllo degli allevamenti da ingrasso è importante perché, ancorché non direttamente collegati dal punto di vista funzionale con quelli da riproduzione, rappresentano un indice della presenza dell'agente eziologico sul territorio, la cui identificazione genotipica associata alla georeferenziazione delle aziende, consente un'analisi spazio-temporale della distribuzione della tubercolosi bovina. A questo riguardo, la genotipizzazione (Bonioti, 2009) dei ceppi isolati rappresenta un valido strumento per completare e comprendere meglio il quadro epidemiologico originato, va ricordato, dalle

informazioni derivanti dall'indagine epidemiologica che, alla luce della normativa comunitaria, acquisisce un'importanza fondamentale nella definizione della probabilità di presenza d'infezione in allevamento.

La sorveglianza al macello è il cardine su cui si basa il controllo della tubercolosi bovina sia in territori ufficialmente indenni sia in quelli non ufficialmente indenni.

Perciò, è importante raccogliere i dati nazionali relativi alla segnalazione di lesioni sospette, ascrivibili a tubercolosi bovina, poiché molti animali sono macellati fuori della loro regione di origine.

Un altro punto cruciale da tenere a mente nel controllo della TB è l'esecuzione dell'IDT prima della movimentazione degli animali (pre-moving test), entro i 30 giorni precedenti l'introduzione del capo in allevamento, eventualmente associato all'isolamento degli animali nell'allevamento di destinazione, da sottoporre al post-moving test. Infatti, ancorché la prova tubercolinica esprima il suo potenziale di svelare l'infezione con maggior probabilità a livello di allevamento rispetto al singolo animale, queste procedure di bio-sicurezza garantiscono la drastica riduzione del rischio di introduzione dell'infezione, anche da allevamenti ubicati in territori OTF.

La segnalazione tempestiva dei focolai in atto anche in questi territori è non solo auspicabile ma doverosa al fine di evitare o almeno mitigare la possibile diffusione della tubercolosi bovina nel paese importatore.

Uno snodo cruciale di amplificazione dell'infezione anche a livello nazionale sono i commercianti, alcuni dei quali possiedono stalle di sosta o centri di raccolta e che sono legati a reti commerciali consolidate con i corrispettivi in altri Stati Membri. L'epidemia occorsa nella provincia autonoma di Trento testimonia che la diffusione della malattia con il commercio di animali infetti, si evidenzia come uno stillicidio di focolai secondari nel tempo e nello spazio.

Le indagini epidemiologiche effettuate nei focolai di TB in Italia indicano tra le cause più frequenti d'infezione da *M. bovis* le seguenti:

- introduzione di animali infetti (movimentazioni illecite);
- introduzione di animali infetti da Stati Membri non OTF e OTF (Humblet, 2009);
- condivisione di pascoli comuni (contaminazione);
- promiscuità di animali da ingrasso e da riproduzione (allevamenti misti, stalle di sosta, centri di raccolta);
- contiguità con altri allevamenti infetti;
- allevamento promiscuo con capre (Zanardi, 2009);
- persistenza dell'infezione negli animali e nell'ambiente (abbattimento selettivo vs stamping out, difficoltà nelle disinfezioni). Questa circostanza è stata apprezzata soprattutto nei casi in cui l'abbattimento selettivo è stato preferito al depopolamento totale per estinguere i focolai. In questi casi è sempre possibile che l'infezione persista in allevamento a livello ambientale o latente negli animali rimasti "negativi" alla prova tubercolinica, per poi esplodere dopo qualche anno con elevate prevalenze intra-aziendali e non infrequenti forme anatomo-patologiche di generalizzazione;
- fenomeno della latenza.

Tra le cause meno frequenti di mantenimento, introduzione o re-introduzione di TB da *M. bovis* si possono considerare le seguenti:

- trasporti promiscui o con mezzi non disinfettati;
- contatti con bovini non indenni a fiere, mercati ed esposizioni;
- fecondazione artificiale;
- contatti con altri animali domestici o selvatici;
- siero di latte contaminato (caseifici);
- personale di stalla.

La sorveglianza della TB richiede un approccio olistico, che contempra nella sua disamina l'ampio spettro d'ospite di *M. bovis*, la complessa patogenesi, il lento progredire della malattia con il possibile alternarsi di fasi acute, l'interazione dinamica tra ospite domestico, selvatico e ambiente, l'imperfetta sensibilità dei test a disposizione, tutti fattori che rendono complessa la sua epidemiologia.

La fenomenologia della tubercolosi bovina è studiabile, interpretabile e controllabile alla luce di conoscenze consolidate della malattia naturale, sia teoriche sia pratiche, di dati epidemiologici di qualità, collegati ad anagrafi aggiornate e affidabili, che consentono di costruire e utilizzare indicatori di efficacia e di efficienza per la sorveglianza epidemiologica.

Tubercolosi nell'uomo in Italia (2005-2016)

I dati presentati sono relativi ai casi di TB umana in Italia raccolti attraverso le SDO.

In questo studio sono state incluse tutte le SDO che, tra il 2005 e il 2016, presentavano il codice ICD9-CM 031,8 (altre forme di malattie da micobatteri non specificati) in uno dei sei livelli di diagnosi (diagnosi principale e fino a 5 diagnosi secondarie). In Tabella 10 sono presentati i ricoveri totali, suddivisi in day-hospital e in regime ordinario; questi ultimi classificati in acuti, lungodegenza e riabilitazione. È inoltre riportata la durata mediana (con intervallo interquartile – *InterQuartile Range*, IQR) dell'ospedalizzazione e il numero di decessi registrati.

In Tabella 11 sono riportati sia i ricoveri in regime ordinario sia i casi di TB bovina per anno, con i dettagli relativi alla diagnosi. Per i pazienti ricoverati più di una volta il numero dei casi è stato ottenuto considerando solo il primo ricovero ospedaliero. È stata inoltre, calcolata l'incidenza annua e l'incidenza media del periodo 2005-2016 sia dei ricoveri sia dei casi, considerando come denominatore la popolazione italiana per anno (dati ISTAT).

Le caratteristiche demografiche dei pazienti, classe di età, genere e nazionalità, sono riportate nella Tabella 12.

Per analizzare eventuali variazioni della distribuzione spaziale e temporale dei casi, il periodo di studio (2005-2016) è stato suddiviso in 3 sottoperiodi (2005-2008, 2009-2012, 2013-2016) ed è stata stimata l'incidenza media a livello di Provincia per ciascun sotto-periodo.

L'analisi statistica è stata effettuata con Stata, versione 13 (Stata Cooperation, College Station, Texas, USA); le mappe sono state realizzate con Quantum GIS, *Geographic Information System*.

Come si può osservare dalla Tabella 10, durante i 12 anni (2005-2016) considerati nello studio, il numero di ricoveri totali, così come quello in day hospital e in regime ordinario, mostra un trend in diminuzione rispetto all'inizio del periodo. Dei 1084 ricoveri in regime ordinario sono stati quasi tutti acuti (1077), 2 a lungodegenza e 5 in riabilitazione. La durata mediana dell'ospedalizzazione nel periodo considerato è stata di 13 giorni e negli anni presenta un andamento altalenante. Nel periodo di studio si sono riscontrati un totale di 37 decessi con un massimo di 14 decessi nel 2005 e un minimo di zero decessi nel biennio 2014-2015.

La Tabella 11 mostra il numero di pazienti ricoverati (casi) e suddivisi come diagnosi principale e secondaria, e i ricoveri totali in regime ordinario. Nel periodo di studio si sono verificati 900 casi che hanno generato 1084 ricoveri in regime ordinario. Il dettaglio dei ricoveri evidenzia che 459 hanno riportato *M. bovis* come diagnosi principale e 625 come diagnosi secondaria. I tassi di incidenza variano tra 0,87 e 3,27/1000000 per i ricoveri e tra 0,76 e 2,65/1000000 per i casi.

Tabella 10. Ricoveri totali, in day hospital e in regime ordinario, tipologia di ricovero ordinario, durata della degenza e numero di decessi per anno in Italia per infezione da *M. bovis* (fonte SDO)

Anno	Ricoveri						Giorni degenza in regime ordinario mediana (IQR)	Decessi
	totali	in day- hospital	in regime ordinario	acuti	lungo- degenza	riabilitazione		
2005	274	83	191	191	0	0	16 (8-30)	14
2006	170	57	113	112	0	1	12 (4-28)	6
2007	127	42	85	84	1	0	14 (7-29)	3
2008	152	51	101	100	0	1	13 (5-26)	1
2009	127	42	85	84	1	0	9 (4-21)	1
2010	148	59	89	89	0	0	10 (4-21)	4
2011	82	29	53	52	0	1	14 (6-34)	2
2012	105	33	72	72	0	0	10 (4-22)	3
2013	94	32	62	60	0	2	10 (4-16)	1
2014	99	31	68	68	0	0	12,5 (5-30)	0
2015	119	27	92	92	0	0	13 (7-23)	0
2016	98	25	73	73	0	0	13 (6-28)	2
Totale	1595	511	1084	1077	2	5	13 (5-26)	37

Tabella 11. Pazienti ricoverati, come diagnosi principale e secondaria, Ricoveri totali in regime ordinario e tassi di incidenza per anno in Italia per infezione da *M. bovis* (fonte SDO)

Anno	Persone ricoverate	Come diagnosi principale	Come diagnosi secondaria	Ricoveri totali in regime ordinario	Popolazione residente	Tasso di incidenza ricoveri (x 1000000)	Tasso di incidenza casi (x 1000000)
2005	155	53	138	191	58462375	3,27	2,65
2006	96	47	66	113	58751711	1,92	1,63
2007	68	32	53	85	59131287	1,44	1,15
2008	79	43	58	101	59619290	1,69	1,33
2009	70	52	33	85	60045068	1,42	1,17
2010	69	31	58	89	60340328	1,47	1,14
2011	46	21	32	53	60626442	0,87	0,76
2012	64	31	41	72	59394207	1,21	1,08
2013	58	37	25	62	59685227	1,04	0,97
2014	64	34	34	68	60782668	1,12	1,05
2015	70	46	46	92	60795612	1,51	1,15
2016	61	32	41	73	60665551	1,20	1,01
Totale	900	459	625	1084	59858314	1,51	1,26

Nella Figura 25 si osserva come i tassi di incidenza presentano un trend decrescente dal 2005 al 2007, sia per ricoveri sia per i casi, per poi risalire leggermente nel 2012 e mantenersi piuttosto costanti fino al 2016.

Le classi d'età che presentano il maggior numero di pazienti ricoverati sono 25-44 anni (260) seguita da 45-64 anni (199) e 1-4 anni (169). La percentuale più alta di casi ha riguardato i maschi (58,9%) rispetto alle femmine (41,1%). In particolare, si riscontra un'associazione tra l'età e il genere: nei maschi la maggior parte dei casi si concentra nella classe 25-44 anni, nelle femmine nella classe 1-4 anni. Considerando la nazionalità, 740 casi risultano italiani e 160 stranieri. In particolare, il maggior numero di stranieri proveniva dall'Africa (67), seguito da Europa (47), Asia (23) e Sud America (19).

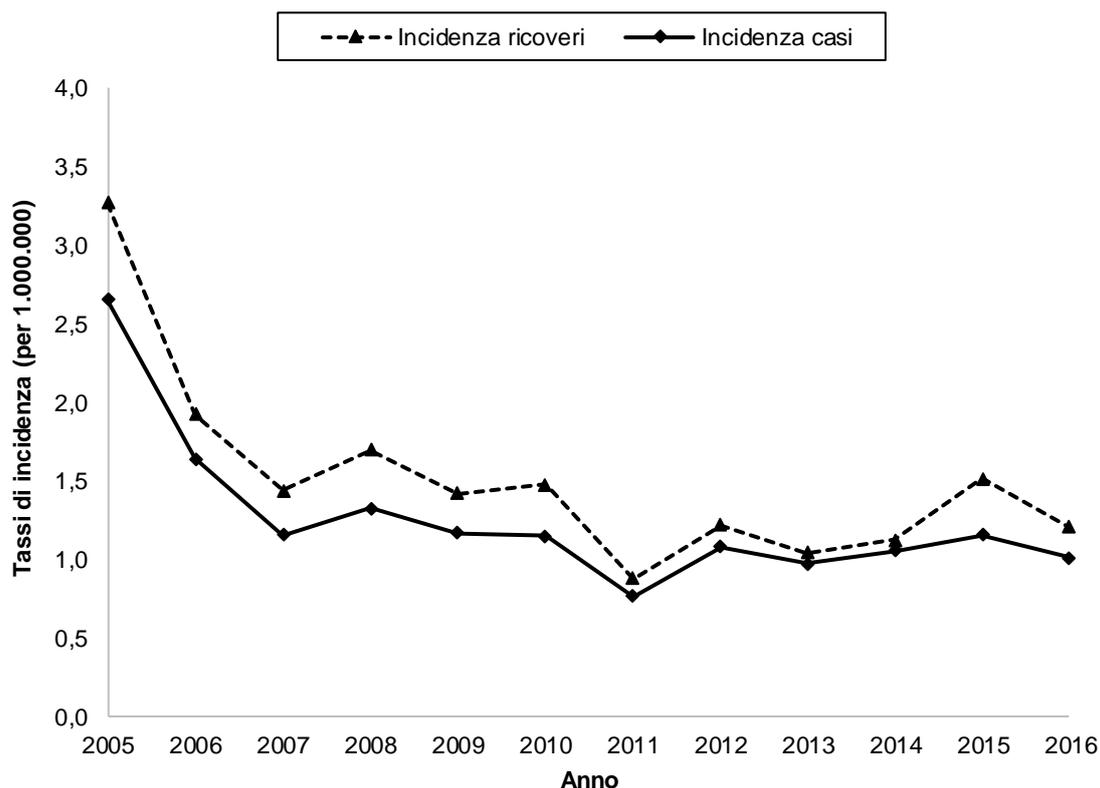


Figura 25. Tassi di incidenza per ricoveri e per casi per infezione da *M. bovis*. Italia, 2005-2016 (fonte SDO)

Tabella 12. Casi ricoverati per fascia d'età, per sesso e nazionalità per infezione da *M. bovis*. Italia, 2005-2016 (fonte SDO)

Fascia d'età	Maschi		Femmine		Italiani		Stranieri		Totale	
	n.	%								
<1	4	0,8	3	0,8	4	0,5	3	1,9	7	0,8
1-4	68	12,8	101	27,3	152	20,5	17	10,6	169	18,8
5-14	37	7,0	41	11,1	65	8,8	13	8,1	78	8,7
15-24	14	2,6	16	4,3	16	2,2	14	8,8	30	3,3
25-44	175	33,0	85	23,0	181	24,5	79	49,4	260	28,9
45-64	136	25,7	63	17,0	170	23,0	29	18,1	199	22,1
≥65	96	18,1	61	16,5	152	20,5	5	3,1	157	17,4
Totale	530	100,0	370	100,0	740	100,0	160	100,0	900	100,0

L'analisi dell'incidenza a livello provinciale effettuata per i 3 sotto-periodi (2005-2008, 2009-2012, 2013-2016), ha evidenziato che i casi sono distribuiti in Italia in modo non uniforme (Figura 25). Il primo periodo è quello in cui si osserva un'incidenza media più alta (1,43) rispetto al secondo (0,93) e al terzo periodo (1,02).

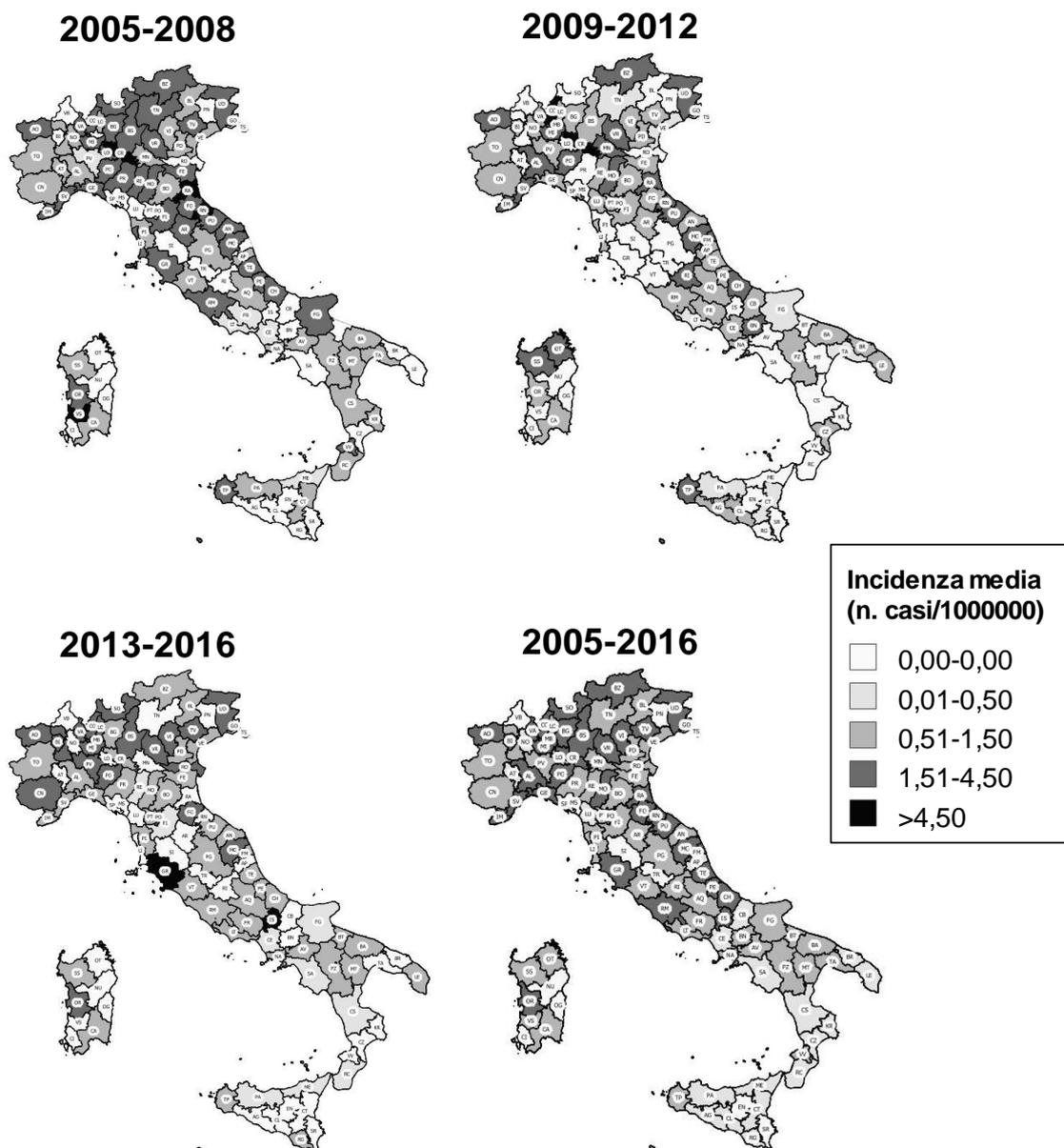


Figura 25. SDO: incidenza media dei casi di tubercolosi umana da *M. bovis* nelle province italiane nel periodo 2005-2016 e nei tre sottoperiodi

CONCLUSIONI

Questo rapporto, aggiorna e raccoglie in modo organico ed esaustivo tutte le informazioni disponibili sulla circolazione negli animali e nell'uomo di *Mycobacterium bovis* e di altri micobatteri del MTBC in Italia. Oltre agli aspetti generali della malattia, a quelli microbiologici specifici dei vari micobatteri del MTBC e quelli normativi inerenti, sono stati raccolti e analizzati i dati ufficiali disponibili sulla diffusione della malattia nell'uomo e negli animali, consentendo una lettura integrata del fenomeno.

La circolazione di micobatteri nel settore zootecnico e negli animali selvatici è una realtà anche nel nostro Paese, e richiede attenzione e sforzi costanti per migliorare la situazione epidemiologica e minimizzare il rischio di esposizione umana. Il trend in diminuzione nel settore zootecnico osservato nel periodo è un'indicazione di successo, ma la costante circolazione negli animali, inclusi i selvatici, e i limiti dei sistemi di sorveglianza nel definire la reale portata del fenomeno sono punti critici che ancora influiscono negativamente sulla possibilità di controllo di questa malattia.

Nel settore umano l'impatto della tubercolosi causata da microrganismi del MTBC, ad esclusione delle infezioni tubercolari, è limitato, ma dal 2007 non si vede una riduzione del numero di casi nonostante il continuo impegno nel controllo delle infezioni nel settore zootecnico. Le informazioni microbiologiche ed epidemiologiche sui casi sono limitate, di conseguenza non sempre si riesce a collegare l'infezione con le possibili fonti e con i fattori di rischio, limitando ulteriormente le possibilità di intervento. Inoltre non è chiaro il ruolo che rivestono le specie animali selvatiche o altri animali, in particolare quelli da compagnia, nel rischio di infezione per l'uomo.

La sorveglianza della TB richiede un approccio olistico, che contempli nella sua disamina l'ampio spettro d'ospite di *M. bovis*, la complessa patogenesi, il lento progredire della malattia con il possibile alternarsi di fasi acute, l'interazione dinamica tra ospite domestico, selvatico e ambiente, l'imperfetta sensibilità dei test a disposizione, tutti fattori che rendono complessa la sua epidemiologia.

Da questo documento si evince l'importanza di un approccio integrato, con attenzione ai settori di sanità animale, sicurezza alimentare e salute pubblica per individuare tempestivamente i punti critici e le possibilità di intervento. L'integrazione è alla base delle politiche di intervento e controllo della tubercolosi in Italia, come testimoniato dai diversi contributi raccolti in questo rapporto.

Le informazioni che sono presentate in questo rapporto costituiscono un punto di partenza al termine di un percorso durato anni di interventi normativi e di conseguenti impatti sulla sanità umana e animale degli stessi, misurati con i dati ufficiali a disposizione.

Da questo quadro si potrà quindi valutare quanto finora fatto e indirizzare in modo più mirato i futuri interventi, facendo tesoro delle esperienze svolte.

BIBLIOGRAFIA

- Abass NA, Suleiman KM, El Jalii IM. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by their GyrB polymorphism. *I J Med Microbiol* 2010;28:26-9.
- Acha PN, Szyfres B. *Zoonoses and communicable diseases common to man and animals*. 2nd Ed.. Washington, DC: Pan American Health Organization; 1987. (Scientific Publication 503)
- Akhtar F, Javed MT, Rehman A, Khan MN, Akhtar P, Hussain SM, Aslam MS, Kausar R, Qamar M, Cagiola M. The use of pcr technique in the identification of *Mycobacterium* species responsible for bovine *tuberculosis* in cattle and buffaues in Pakistan. *Trop Anim Health Prod* 2015;47:1169-75.
- Akhtar S, Khan MI, Anum AD. Comparative delayed cutaneous hypersensitivity in buffaloes and cattle: reaction to tuberculin purified protein derivative. *Buffalo J* 1992;8:39-45.
- Albernaz TT, Oliveira CMC, da Silva Lima DH, de Silva e Silva N, Pinheiro Cardoso D, Tavora Albuquerque Lopes C, de Farias Brito M, Barbosa da Silva J, Masiero Salvarani F, Cerqueira Leite R, Barbosa JD. Comparison of tubercolin test, histopathological examination, and bacterial culture for the diagnosis of *tuberculosis (Mycobacterium bovis)* in buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Brazil. *Trop Anim Health* 2015;47:1153-9.
- Aldwell FE, Wedlock DN, Buddle BM. Bacterial metabolism, cytokine mRNA transcription and viability of bovine alveolar macrophages infected with *Mycobacterium bovis* BCG or virulent *M. bovis*. *Immunology and Cell Biology* 1996;74:45-51.
- Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, Gey van Pittius NC. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis* 2010;16:1296-9.
- Allix C, Walfavens K, Saegerman C, Godfroid J, Supply P, Fauville-Dufaux M. Evaluation of the epidemiological relevance of Variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. *J Clinic Microbiol* 2006;44:1951-62.
- Allix-Béguec C, Fauville-Dufaux M, Stoffels K, Ommeslag D, Walravens K, Saegerman C, Supply P. Importance of identifying *Mycobacterium bovis* as a causative agent of human *tuberculosis*. *Europ Resp J* 2010;35:692-4.
- Álvarez J, Pérez A, Bezos J, Marqués S, Grau A, Saéz JL, Mínguez O, de Juan L, Domínguez L. Evaluation of the sensitivity and specificity of bovine *tuberculosis* diagnostic tests in naturally infected cattle herds using a Bayesian approach. *Vet Microbiol* 2012;155:38-43.
- Alvarez J. Effect of paratuberculosis on the diagnosis of bovine *tuberculosis* in a cattle herd with a mixed infection using interferon-gamma. *Vet Microbiol* 2009;135:389-93.
- Amadori M, Tameni S, Scaccaglia P, Cavirani S, Archetti IL, Giandomenico RQ. Antibody tests for identification of *Mycobacterium bovis*-infected bovine herds. *J Clin Microbiol* 1998;36:566-8.
- Amadori M. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in calves sensitized by mycobacteria of the *avium*/intracellulare group. *J Vet Med B* 2002;49:89-96.
- Amaro A, Duarte E, Amado A, Ferronha H, Botelho A. Comparison of three DNA extraction methods for *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Let Appl Microbiol* 2008;47:8-11.
- Ameni G, Aseffa A, Engers H, Young D, Gordon S, Hewinson G, Vordermeier M. High prevalence and increased severity of pathology of bovine *tuberculosis* in Holsteins compared to zebu breeds under field cattle husbandry in central Ethiopia. *Clinic and Vaccine Immunol* 2007;14:1356-61.

- Amin S, Khan MA, Hashmi HA, Khan MS, Ahmad I, Bhatti MA. Detection of buffalo *tuberculosis* by using short thermal test and isolation of causal organisms from lymphnodes. *Buffalo J* 1992;8:83-7.
- Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of *tuberculosis*. *Lancet* 2000; 356(9235):1099-104.
- Andreu D, Carreno C, Linde C, Boman HG, Andersson M. Identification of an anti-mycobacterial domain in NK-lysin and granulysin. *Biochemistry Journal* 1999;344:845-9.
- Angkawanish T, Wajjwalku W, Sirimalaisuwan A, Mahasawangkul S, Kaewsakhorn T, Boonsri K, Rutten VP. *Mycobacterium tuberculosis* infection of domesticated Asian elephants, Thailand. *Emerg Infect Dis* 2010;16:1949-51.
- APHIS. *Bovine tuberculosis eradication: Uniform methods and rules, effective January 1, 2005*. Washington, DC: United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service; 2004. (APHIS 91-45-011)
- Aranaz A, Liébana E, Gómez-Mampaso E, Galán JC, Cousins D, Ortega A, Blázquez J, Baquero F, Mateos A, Suarez G, Domínguez L. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J of Syst Bacteriol* 1999;49:1263-73.
- Aranaz A., Cousins D., Mateos A., Domínguez L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1785-9.
- Archetti IL. Impiego del test g-interferon per la diagnosi di tubercolosi bovina in Regione Lombardia. *Sel Vet* 1996;4:329-38.
- Armstrong JA, Hart PD. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the unusual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *Journal of Experimental Medicine* 1975;142:1-16.
- Armstrong JA, Hart PDA. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion lysosomes with phagosomes. *Journal of Experimental Medicine* 1971;134:713-40.
- Ascione G, Cozza D, Iovane G, Galiero G. Survey of the presence of *Mycobacterium caprae* in water buffaloes in the Campania region. *Rev Vet* 2010;21:490-1.
- Ashford DA, Whitney E, Raghunathan P, Cosivi O. Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. *Rev Sci Tech* 2001;20(1):325-37.
- Australian Wildlife Network. *Tuberculosis in Australian seals. Fact Sheet*. Mosman: Australian Wildlife Network; 2010. Disponibile all'indirizzo: [https://wildlifehealthaustralia.com.au/Portals/0/Documents/FactSheets/Mammals/Tuberculosis%20in%20Australian%20Seals%20Nov%202010%20\(1.2\).pdf](https://wildlifehealthaustralia.com.au/Portals/0/Documents/FactSheets/Mammals/Tuberculosis%20in%20Australian%20Seals%20Nov%202010%20(1.2).pdf); ultima consultazione 26/4/18.
- Awad FI, Mohamoud AH. Single intradermal comparative tuberculin test in Egyptian buffalo. *Vet Rec* 1957;69:133.
- Bahrmand AR, Bakayev VV, Babaei MH. Use of polymerase chain reaction for primary diagnosis of pulmonary *tuberculosis* in the clinical laboratory. *Scand J Infect Dis* 1996;28:469-72.
- Bailey SS, Crawshaw TR, Smith N, Palgrave CJ. *Mycobacterium bovis* infection in domestic pigs in Great Britain. *Vet Journal* 2013;198:391-7.
- Baker L, Brown T, Maiden MC, Drobniowski F. Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1568-77.
- Bancroft JD, Gamble M. *Theory and practice of histological techniques*. Sixth edition. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2008.

- Barbosa JD, Siva JB, Rangel CP, Fonseca AH, Silva NS, Bomjardim HA, Freitas NFQR. Tuberculosis prevalence and risk factors for water buffalo in Pará, Brazil. *Trop Anim Hlth Prod* 2014;46:513-7.
- Barnett JE, Booth P, Brewer JI, Chanter J, Cooper T, Crawshaw T, Davison NJ, Greenwood A, Riley P, Smith NH, Wessels M. *Mycobacterium bovis* infection in a grey seal pup (*Halichoerus grypus*). *Vet Rec* 2013;173:168.
- Barouni AS, Augusto CJ, Lopes MTP, Zanini MS, Salas CE. A *pncA* polymorphism to differentiate between *M. bovis* and *M. tuberculosis*. *Mol Cell Prob* 2004;18:164-70.
- Bass KE, Nonnecke BJ, Palmer MV, Thacker TC, Hardegger R, Schroeder B, Raeber AJ, Waters WR. Clinical and diagnostic developments of a gamma interferon release assay for use in bovine tuberculosis control programs. *Clin Vaccine Immunol* 2013;20(12):1827-35.
- Bastida R, Loureiro J, Quse V, Bernardelli A, Rodríguez D, Costa E. Tuberculosis in a wild subantarctic fur seal from Argentina. *J of Wild Dis* 1999;35:796-8.
- Bates JH. Transmission and pathogenesis of tuberculosis. *Clinics in Chest Medicine* 1980;1:167-74.
- Beja-Pereira A, Caramelli D, Lalueza-Fox C, Vernesi C, Ferrand N, Casoli A, Goyache F, Royo LJ, Conti S, Lari M, Martini A, Ouragh L, Magid A, Atash A, Zsolnai A, Boscato P, Triantaphylidis C, Ploumi K, Sineo L, Mallegni F, Taberlet P, Erhardt G, Sampietro L, Bertranpetit J, Barbujani G, Luikart G, Bertorelle G. *The origin of European cattle: evidence from modern and ancient DNA*. Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A. 2006;103:8113-8.
- Benson V. Water buffalo may be sensitive to tubercoline tests. *Epidemiology Area Officer*, Florida, USA: USDA APHIS; 2000.
- Bezoz J, Alvarez J, Romero B, Aranaz A, Juan Ld. Tuberculosis in goats: assessment of current *in vivo* cell-mediated and antibody-based diagnostic assays. *Vet J* 2012;191(2):161-5.
- Bezoz J, Casal C, Romero B, Schroeder B, Hardegger R, Raeber AJ, López L, Rueda P, Dominguez L. Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. *Res Vet Science* 2014;97:544-52.
- Bezoz J, de Juan L, Romero B, Alvarez J, Mazzucchelli F, Mateos A, Domínguez L, Aranaz A. Experimental infection with *Mycobacterium caprae* in goats and evaluation of immunological status in tuberculosis and paratuberculosis co-infected animals. *Vet Immunol Immunopathol* 2010;133(2-4):269-75.
- Blackwell JM, Barton CH, White JK, Roach TI, Shaw MA, Whitehead SH, Mock BA, Searle S, Williams H, Baker AM. Genetic regulation of leishmanial and mycobacterial infections: the *Lsh/Ity/Bcg* gene story continues. *Immunology Letters* 1994;43:99-107.
- Blackwell JM. Structure and function of the natural-resistance-associated macrophage protein (Nrampl), a candidate protein for infectious and autoimmune disease susceptibility. *Molecular Medicine Today* 1996;2:205-211.
- Boadella M, Lyashchenko K, Greenwald R, Esfandiari J, Jaroso R, Carta T. Serologic tests for detecting antibodies against *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Eurasian wild boar (*Sus Scrofa Scrofa*). *J of Vet Diagnostic Inv* 2011;23:77-83.
- Bobadilla-del-Valle M, Ponce-de-Leon A, Kato-Maeda M, Hernandez-Cruz A, Calva-Mercado JJ, Chavez-Mazari B, Caballero-Rivera BA, Nolasco-Garcia JC, Sifuentes-Osornio J. Comparison of Sodium carbonate, cetyl-pyrimidinium chloride, and sodium borate for preservation of sputa for culture of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2003;41:4487-8.
- Böddinghaus B, Rogall T, Flohr T, Blöcker H, Böttger EC. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J of Clin Microbiol* 1990;28:1751-9.
- Bollo E, Cornaglia, Galietti F, Faccenda L, Casalone C. Apoptosis in mycobacterial infections: a study on animal models. In: *Proceedings of the 15th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology*. Alghero (Italy), 1997;16-19.9.

- Bollo E, Ferroglio E, Dini V, Mignone W, Biolatti B, Rossi L. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in lymph nodes of wild boar (*Sus scrofa*) by a target-amplified test system. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2000;47(5):337-42.
- Bollo E, Galietti F, Biolatti B, Pregel P, Dondo A. Virulent mycobacteria induce different levels of apoptosis of murine macrophages *in vitro*. In: *Proceedings of the 17th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology*, Nantes (France), 1999;14-17.
- Bollo E, Pregel P, Dondo A, Galietti F. Apoptosis in mycobacterial infections: *in vitro* investigations on mechanisms of induction. In: *Proceedings of the 18th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology*, Amsterdam (The Netherlands), 2000.
- Boniotti MB, Gaffuri A, Gelmetti D, Tagliabue S, Chiari M, Mangeli A, Spisani M, Nassuato C, Gibelli L, Sacchi C, Zanoni M, and Pacciarini ML. Detection and molecular characterization of *Mycobacterium microti* in wild boar from Northern Italy. *J Clin Microbiol* 2014;52:2834-43.
- Boniotti MB, Gorla M, Loda D, Garrone A, Benedetto A, Mondo A, Tisato E, Zanoni M, Zoppi S, Dondo A, Tagliabue S, Bonora S, Zanardi G, Pacciarini ML. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of variable-number-tandem-repeats for a geographic optimized genotyping. *Journal of Clinical Microbiology* 2009;636-44.
- Boniotti MB, Loda D, Cozza D, Tagliabue S, Galiero G, Pacciarini ML. Genotyping of *Mycobacterium bovis* isolates from water buffalo (*Bubalus bubalis*). *VI International M. bovis conference: Cardiff, Wales, Great Britain, 16-19 June 2014: Delegates Handbook*. - 1 p [Nr. Estr. 5915] 2014.
- Bonovska M, Tzvetkov Y, Najdenski H, Bachvarova Y. PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in experimentally infected dogs. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005 52,165-70.
- Boukary AR, Thys E, Rigouts L, Matthys F, Berkvens D, Mahamadou I, Yenikoye A, Saegerman C. Risk factors associated with bovine tuberculosis and molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains in urban settings in Niger. *Transbound Emerg Dis* 2012;59(6):490-502.
- Boyazoglu J, Hatziminaoglou Y, Morand-Fehr P. The role of the goat in the society: past present and perspective for the future. *Small Ruminant Research* 2005;60:13-23.
- Brennan PJ. "Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium Tuberculosis*". *Tuberculosis* 2003;83:91-97.
- Brosch R, Gordon SV, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Soravito C, Barrell BG, Cole ST. Use of a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing, and comparative genomics. *Infect and Immunity* 1998;66:2221-9.
- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutiérrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.* 2002;99:3684-9.
- Bryk R, Lima D.C, Erdjument-Bromage H, Tempts P, Nathan C. Metabolic Enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein. *Science* 2002;295:1073-77.
- Buddle BM, Aldwell F, Wedlock N. Vaccination of cattle and possums against bovine tuberculosis, In: Griffin F, De Lisle G (Ed.). *Tuberculosis in wildlife and domestic animals*. Dunedin: University of Otago Press; 1995. p. 111-5.
- Buddle BM, de Lisle GW, Pfeffer A, Aldwell FE. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *Vaccine* 1995;13:1123-30.
- Buddle BM, Livingstone PG, de Lisle GW. Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle. *N Z Vet J* 2009;57(4):173-80.

- Buddle BM, McCarthy AR, Ryan TJ, Pollock JM, Vordermeier H, Hewinson RG, Andersen P, de Lisle GW. Use of mycobacterial peptides and recombinant proteins for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-positive cattle. *Vet Rec* 2003a;153:615-20.
- Buddle BM, Ryan TJ, Pollock JM, Andersen P, de Lisle GW. Use of ESAT-6 in the interferon-gamma test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. *Vet Microbiol* 2001;80:37-46.
- Buick W. TB in domestic species other than cattle and badgers. *Govern Vet J* 2006;16:87-91.
- Cadmus SI, Yakubu MK, Magaji AA, Jenkins AO, van SD. *Mycobacterium bovis*, but also *M. africanum* present in raw milk of pastoral cattle in north-central Nigeria. *Tropical Animal Health and Production* 2010;42:1047-8.
- Carpenter E, Fray L, Gormley. Antigen-specific lymphocytes enhance nitric oxide production in *Mycobacterium bovis* BCG-infected bovine macrophages. *Immunology and Cell Biology* 1998;76:363-8.
- Casal C, Bezos J, Díez-Guerrier A, Álvarez J, Romero B, de Juan L, Rodriguez-Campos S, Vordermeier M, Whelan A, Hewinson RG, Mateos A, Domínguez L, Aranaz A. Evaluation of two cocktails containing ESAT-6, CFP-10 and Rv-3615c in the intradermal test and the interferon- γ assay for diagnosis of bovine tuberculosis. *Prev Vet Med* 2012;105(1-2):149-54.
- Cassidy JP. The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. *Vet Microbiol* 2006;112:151-61.
- Castets M, Boisvert H, Grumbach F, Brunel M, Rist N. Les bacilles tuberculeux de type Africain: note préliminaire. *Revue de tuberculose et de pneumologie (Paris)* 1968;32:179-84.
- Cavanagh R, Begon M, Bennett M, Ergon T, Graham IM, de Haas PE, Hart CA, Koedam M, Kremer K., Lambin X, Roholl P, Soolingen DD. *Mycobacterium microti* infection (vole tuberculosis) in wild rodent populations. *J of Clinic Microbiol* 2002;40:3281-5.
- Caws M, Thwaites G, Dunstan S, Hawn TR, Lan NT, Thuong NT, Stepniewska K, Huyen MN, Bang ND, Loc TH, Gagneux S., van Soolingen D, Kremer K, van der Sande M, Small P, Anh PT, Chinh NT, Quy HT, Duyen NT, Tho DQ, Hieu NT, Torok E, Hien TT, Dung NH, Nhu NT, Duy PM, van Vinh Chau N, Farrar J. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens* 2008;28:e1000034.
- Chen S, Parlane NA, Lee J, Wedlock DN, Buddle BM, Rehm BH. New skin test for detection of bovine tuberculosis on the basis of antigen-displaying polyester inclusions produced by recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2014;80(8):2526-35.
- Chiari M, Zanoni M, Alborali LG, Zanardi G, Avisani D, Tagliabue S, Gaffuri A, Pacciarini ML, Boniotti MB. Isolation of *Mycobacterium caprae* (Lechtal Genotype) from Red Deer (*Cervus elaphus*) in Italy. *J Wildl Dis* 2014;50(2):330-3.
- Claxton PD, Eamens GJ, Mylrea PJ. Laboratory diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust Vet J* 1979;55:514-20.
- Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA. Purification, characterization, and genetical analysis of *Mycobacterium tuberculosis* urease, a potentially critical determinant of host-pathogen interaction. *Journal of Bacteriology* 1995;177:5644-52.
- Coad M, Downs SH, Durr PA, Clifton-Hadley RS, Hewinson RG, Vordermeier HM, Whelan AO. Blood-based assays to detect *Mycobacterium bovis* infected cattle missed by tuberculin skin testing. *Vet Rec* 2008;162:382-4.
- Cockle PJ, Gordon SV, Hewinson RG, Vordermeier HM. Field evaluation of a novel differential diagnostic reagent for detection of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Clinic and Vaccine Immunol* 2006;13:1119-24.
- Cohan FM. What are bacterial species? *An Review of Microbiol* 2002;56:457-87.
- Collins CH. The bovine tubercle bacillus. *Br J Biomed Sci* 2000;57(3):234-40.

- Collins DM, de Lisle GW, Collins JD, Costello E. DNA restriction fragment typing of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle and badgers in Ireland. *Vet Rec* 1994;134(26):681-2.
- Colston JM, Cox RA. Mycobacterial growth and dormancy. In: Ratledge C Dale J (Ed.). *Mycobacteria: molecular biology and virulence*. Oxford: Blackwell Science Ltd.; 1999. p. 198-219.
- Converse PJ, Dannenberg AM, Estep JE, Sugisaki K, Abe Y, Schofield BH, Pitt MLM. Cavitory *tuberculosis* produced in rabbits by aerosolized virulent tubercle bacilli. *Infection and Immunity* 1996;64:4776-87.
- Corner LA, Gormley E, Pfeiffer DU. Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: conditions for maximising the number of positive cultures. *Vet Microbiol* 2012;156:162-71.
- Corner LA, Trajstman AC, Lund K. Determination of the optimum concentration of decontaminants for the primary isolation of *Mycobacterium bovis*. *New Zeal Vet J* 1995;43:129-33.
- Corner LA, Trajstman AC. An evaluation of 1-hexadecylpyridium chloride as a decontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions. *Vet Microbiol* 1988;18:127-34.
- Costello E, O'Grady D, Flynn O, O'Brien R, Rogers M, Quigley F, Egan J, Griffin J. Study of restriction fragment length polymorphism analysis and *spoligotyping* for epidemiological investigations of *Mycobacterium bovis* infection. *J Clin Microbiol* 1999;37:3217-22.
- Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, Duignan P, Murray A, Dupont C, Ahmed N, Collins DM, Butler WR, Dawson D, Rodriguez D, Loureiro J, Romano MI, Alito A, Zumarraga M, Bernardelli A. *Tuberculosis* in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1305-14.
- Cousins DV, Corner LA, Tolson J, Jone S, Wood P. *Eradication of bovine tuberculosis from australia: key management and technical aspects*. Melbourne: Commonwealth Serum Laboratories Ltd; 1998.
- Cousins DV, Peet RL, Gaynor WT, Williams SN, Gow BL. *Tuberculosis* in imported hyrax (*Procavia capensis*) caused by an unusual variant belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Veterinary Microbiology* 1994;42:135-45.
- Cousins DV, Williams S, Liebana E, Aranaz A, Bunschoten A, van Embden J, Ellis T. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine *tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1998;36:168-78.
- Dannenberg AMJr. Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology Today* 1991;12:228-33.
- de Jong BC, Antonio M, Awine T, Ogunbemi K, de Jong YP, Gagneux S, DeRiemer K, Zozio T, Rastogi N, Borgdorff M, Hill PC, Adegbola RA. Use of *spoligotyping* and large sequence polymorphisms to study the population structure of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in a cohort study of consecutive smear-positive *tuberculosis* cases in The Gambia. *J Clin Microbiol* 2009;47:994-1001.
- de Jong BC, Antonio M, Gagneux S. *Mycobacterium africanum* review of an important cause of human *tuberculosis* in West Africa. *PLOS Neglected Trop Dis* 2010;4:e744.
- de Kantor IN, LoBue PA, Thoen CO. Human *tuberculosis* caused by *Mycobacterium bovis* in the United States, Latin America and the Caribbean. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010;14(11):1369-1373.
- de la Rua-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, and Clifton-Hadley RS. Ante mortem diagnosis of *tuberculosis* in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Science* 2006;81:190-210.
- de la Rua-Domenech R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine *tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 2006;86(2):77-109.

- de Lisle GW and Havill PF. Mycobacteria isolated from deer in New Zealand from 1970-1983. *New Zeal Vet J* 1985;33:138-40.
- Delgado-Ortega M, Marc D, Dupont J, Trapp S, Berri M, Meurens F. SOCS proteins in infectious diseases of mammals. *Vet Immunol Immunopathol* 2013;151:1-19.
- Dellman HD. Respiratory system. In: Dellman H-D, Brown EM (Ed.). *Textbook of veterinary histology*. 2nd Ed. Philadelphia: Lea and Febiger; 1991. p.187-202.
- Demkin VV, Korneva IN, Riazanova I, Muminov TA, Beisembaeva S, Zhakipbaeva BT, Shopaeva GA, Dauletbakova AM. [RD7 genotyping of *M. tuberculosis* strains isolated from patients with lung tuberculosis in different areas of Kazakhstan] (in Russian with English abstract). *Molekuliarnaia genetika, mikrobiologia i virusologia* 2008;18-22.
- Desmond E, Ahmed AT, Probert WS, Ely J, Jang Y, Sanders CA, Lin SY, Flood J. *Mycobacterium africanum* cases, California. *Emerg Infect Dis* 2004;10:921-3.
- Di Marco V, Mazzone P, Capucchio Mt, Boniotti Mb, Aronica V, Russo M, Fiasconaro M, Cifani N, Corneli S, Biasibetti E, Biagetti M, Pacciarini MI, Cagiola M, Pasquali P, and Marianelli C. Epidemiological significance of the domestic Black Pig (*Sus scrofa*) in the maintenance of the Bovine Tuberculosis in Sicily. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 1209–1218
- Dobbelaer R. The potency of bovine PPD tuberculins in guinea-pigs and in tuberculous cattle. *Journal Biol Standard* 1983;11:213-20.
- Doherty ML, Bassett HF, Quinn PJ, Davis WC, Monaghan ML. Effects of dexamethasone on cell mediated immune-responses in cattle sensitized to *Mycobacterium bovis*. *American Journal of Veterinary Research* 1995;56:1300-6.
- Dondo A, Gorla M, Scicluna MT, Amadori M, Lodetti E. Diagnosi di infezione tubercolare nel bovino: comparazione fra prova intradermica e metodo immunoenzimatico per gamma-interferon (IFN). *Veterinaria Italiana* 1992;6:14-19.
- Drobniewski F, Strutt M, Smith G, Magee J, Flanagan P. Audit of scope and culture techniques applied to samples for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* by hospital laboratories in England and Wales. *Epidemiol Infect* 2003;130(2):235-7.
- Drobniewski FA, Caws M, Gibson A, Young D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2003;3(3):141-7.
- Duarte E, Domingos M, Amado A, Cunha MV, Botelho A. MIRU-VNTR typing adds discriminatory value to groups of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* strains defined by spoligotyping. *Vet Microbiol* 2010;143:299-306.
- Edwards CJ, Bollongino R, Scheu A, Chamberlain A, Tresset A, Vigne JD, Baird JF, Larson G, Ho SY, Heupink TH, Shapiro B, Freeman AR, Thomas MG, Arbogast RM, Arndt B, Bartosiewicz L, Benecke N, Budja M, Chaix L, Choyke AM, Coqueugnot E, Dohle HJ, Goldner H, Hartz S, Helmer D, Herzig B, Hongo H, Mashkour M, Ozdogan M, Pucher E, Roth G, Schade-Lindig S, Schmolcke U, Schulting RJ, Stephan E, Uerpmann HP, Voros I, Voytek B, Bradley DG, Burger J. *Mitochondrial DNA analysis shows a Near Eastern Neolithic origin for domestic cattle and no indication of domestication of European aurochs*. Proceedings of the Royal Society B: *Biological Sciences* 2007;274:1377-85.
- EFSA (European Food Safety Authority). Scientific opinion on the use of a gamma interferon test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *EFSA Journal* 2012;10:2975.
- EFSA (European Food Safety Authority). The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal* 2009;411-36.
- Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH. Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1988;26:2240-5.

- Ellis MD, Davies S, McCandlish IA, Monies R, Jahans K, de la Rua-Domenech. *Mycobacterium bovis* infection in a dog. *Vet Rec* 2006;159:46-48.
- Erler W, Kahlau D, Martin G, Naumann L, Schimmel D, Weber A. Zur Epizootologie der Rindertuberkulose in der Bundesrepublik Deutschland. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 2003;116:288-92.
- Etchehoury I, Valencia GE, Morcillo N, Sequeira MD, Imperiale B, Lopez M, Caimi K, Zumarraga MJ, Cataldi A, Romano MI. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates in Argentina: first description of a person-to-person-to-person transmission case. *Zoonoses Public Health* 2010;57:375-81.
- European Commission, Health & Consumers Directorate-General. *Working Document on causal agents of bovine tuberculosis*. Brussels: European Commission; 2013 (SANCO/7059/2013).
- Feng J, Li Y, Hashad M, Schurr E, Gros P, Adams LG, Templeton JW. Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (Nrampl) gene. *Genome Research* 1996;6:956-64.
- Fifis T, Costopoulos C, Corner LA, Wood PR. Serological reactivity to *Mycobacterium bovis* protein antigens in cattle. *Vet Microbiol* 1992;30:343-54.
- Fink M, Schleicher C, Gonano M, Prodinger WM, Pacciarini M, Glawischnig W, Ryser-Degiorgis MP, Walzer C, Stalder GL, Lombardo D, Schobesberger H, Winter P, Buttner M. Red deer as maintenance host for bovine tuberculosis, Alpine region. *Emerg Infect Diseases* 2015;21:464-7.
- Freitas JA, Guerra JL, Paneta JS. Characteristic of the tuberculosis in slaughtered water buffaloes. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2001;38:170-6.
- Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 1998;144:1189-96.
- Frottier J, Eliaszcwicz M, Arlet V, Gaudillat C. Les infections à *Mycobacterium africanum*. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 1990;174:29-33.
- Galietti F, Bollo E, Dondo A, Chirillo MG, Pozzi E. Apoptosis progression in murine macrophage lines infected with different mycobacterial pathogens. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1999;159.
- Garbaccio S, Macias A, Shimizu E, Paolicchi F, Pezzone N, Magnano G, Zapata L, Abdala A, Tarabla H, Peyru M, Caimi K, Zumarraga M, Canal A, Cataldi A. Association between spoligotype-VNTR types and virulence of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Virulence* 2014;5:297-302.
- Garbaccio SG, Cataldi AA. Evaluation of an immunomagnetic capture method followed by PCR to detect *Mycobacterium bovis* in tissue samples from cattle. *Rev Argent Microbiol* 2010;42:247-53.
- García-Jiménez WL, Benítez-Medina JM, Fernández-Llario P, Abecia JA, García-Sánchez A, Martínez R, Risco D, Ortiz-Pelaez A, Salguero FJ, Smith NH, Gómez L, Hermoso-de-Mendoza J. Comparative pathology of the natural infections by *Mycobacterium bovis* and by *Mycobacterium caprae* in wild boar (*Sus scrofa*). *Transb and Emerg Dis* 2013;60:102-9.
- Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, Duthoy S, Grondin S, Lacroix C, Monsempe C, Simon S, Harris B, Atkin R, Doggett J, Mayes R, Keating L, Wheeler PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV, Hewinson RG. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 2003;100:7877-82.
- Gatfield J, Pieters J. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria in macrophages. *Science* 2000;288:1647-50.
- Gerace E, Pasquali P, Oesch B, Falduto M, Mandanici F, Fiasconaro M, Vitale M, Di Marco V, Amato B. Stimulation of bovine whole-blood samples cultured in media supplemented with recombinant interleukin-7 (IL-7) and IL-12 extends the life span of the gamma interferon assay to detect *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *J Clin Microbiol* 2016;54:2315-20.

- Gideon HP, Flynn JL. Latent tuberculosis: what the host “sees”? *Immunol Res* 2011;50(2-3):202-12.
- Good M, Clegg TA, Costello E, More SJ. The comparative performance of the single intradermal test and the single intradermal comparative tuberculin test in Irish cattle, using tuberculin PPD combinations of differing potencies. *Vet J* 2011;190:60-5.
- Good M, Duignan A. Perspectives on the history of bovine TB and the role of tuberculin in bovine TB eradication. *Vet Med Internat* 2011; Article ID 410470, 11 pages.
- Gordon SV, Eiglmeier K, Garnier T, Brosch R, Parkhill J, Barrell B, Cole ST, Hewinson RG. Genomics of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis* (Edinburgh) 2001;81:157-63.
- Goren MB, Hart PD, Young MR, Armstrong JA. Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1976;73:2510-4.
- Gormley E, Corner LA, Costello E, Rodriguez-Campos S. Bacteriological diagnosis and molecular strain typing of *Mycobacterium bovis*. *Res Vet Sci* 2014;97:S30-43.
- Gormley E, Doyle MB, Fitzsimons T, McGill K, Collins JD. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Vet Microbiol* 2006;112:171-9.
- Gortazar C, Vicente J, Boadella M, Ballesteros C, Galindo RC, Garrido J, Aranaz A, de la Fuente J. Progress in the control of bovine tuberculosis in Spanish wildlife. *Vet Microbiol* 2011;151(1-2):170-8.
- Govoni G, Gros P. Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. *Inflammation Research* 1998;47:277-84.
- Grange JM, Collins CH. Bovine tubercle bacilli and disease in animals and man. *Epidemiol Infect* 1987;99(2):221-34.
- Grange JM, Yates M. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet Microbiol* 1994;40:137-51.
- Grange JM, Yates MD, de Cantor IN. *Guidelines for speciation within the Mycobacterium tuberculosis complex* (2nd Edition). Geneva: World Health Organization of the United Nations; 1996.
- Grange JM, Yates MD. Incidence and nature of human tuberculosis due to *Mycobacterium africanum* in South-East England: 1977-87. *Epidemiol and Infect* 1989;103:127-32.
- Greth A, Flamand JR, Delhomme A. An outbreak of tuberculosis in a captive herd of Arabian oryx (*Oryx leucoryx*): management. *Vet Rec* 1994;134:165-7.
- Griffin JM, Hahsey T, Lynch K, Salman MD, McCarthy J, Hurley T. The association of cattle husbandry practices environmental factors and farmer characteristics with the occurrence of chronic bovine tuberculosis in dairy herds in the Republic of Ireland. *Preventive Veterinary Medicine* 1993;17:145-60.
- Groenen PM, Bunschoten AE, van Soelingen D, J. van Embden JD. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*: application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol Microbiol* 1993;10:1057-65.
- Guadagnini PF. Tuberculosis and mycobacteriosis in swine. The approach to the outbreak [in Italian]. In: Martelli P (Ed.). *Proceedings Società Italiana Patologia Suina, XXIII Meeting Report* 1997; Benedettina Editrice, Parma, Italy. p. 167-76.
- Guanziroli M, Cicuta ME, Zumarraga M, Romano MI. Isolation of *Mycobacterium bovis* from water buffalo (*Bubalus bubalis*, Linne 1758) of the North East of Argentina. *RevVet* 2010;21(1):471473.
- Guanziroli M, Cicuta ME. Primer aislamiento de *Mycobacterium bovis* de búfalo del nordeste argentino. Resumen: V-040, Universidad Nacional del nordeste. *Comunicacione scientificas y tecnologicas* 2006.

- Guarda F, Bollo E, Biolatti B, Negro M, Comino G. Sul coinvolgimento delle tonsille nella tubercolosi del bovino: problemi e prospettive. *Atti Società Italiana di Buiatria* 1995;27:263-7.
- Guarda F, Bollo E, Comino G, Negro M, Curcio A. Tubercolosi bovina: ricerche sul coinvolgimento delle tonsille e sull'amplificazione dell'RNAr del *Mycobacterium tuberculosis* complex nei tessuti per risolvere il problema dei c.d. no lesion reactors. *Atti Società Italiana di Buiatria* 1996;28: 555-571.
- Guarda, Mandelli, Aria, Arru, Cammarata, Biolatti, Scanziani. *Trattato di anatomia patologica veterinaria*. Torino: UTET, IV Ed.; 2013.
- Gutiérrez-Pabello JA, McMurray DN, Adams LG. Upregulation of thymosin β -10 by *Mycobacterium bovis* infection of bovine macrophages is associated with apoptosis. *Infection and Immunity* 2002;70:2121-7.
- Haagsma J. Potency testing of bovine tuberculins. *Development Biol Standard* 1986;58:689-94.
- Haddad N, Masselot M, Durand B. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. *Res Vet Sci* 2004;76(1):1-18.
- Harboe M, Wiker HG, Duncan JR, Garcia MM, Dukes TW, Brooks BW. Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1990;28(5):913-21.
- Hein Wr, Tomasovic AA. An abattoir survey of tuberculosis in feral buffaloes. *Aust Vet J* 1981;57:543-7.
- Hermans PW, van Soolingen D, Bik EM, de Haas PE, Dale JW, van Embden JD. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect and Immunity* 1991;59:2695-705.
- Hermans PWM, van Soolingen D, van Embden JDA. Characterization of a major polymorphic tandem repeat in *Mycobacterium tuberculosis* and its potential use in the epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium goodii*. *J Bacteriol* 1992;174:4157-65.
- Hermans PWN, van Soolingen D, Dale JW, Schuitma ARJ, McAdam R, Catty D, van Embden JDA. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1990;28:2051-8.
- Hershberg R, Lipatov M, Small PM, Sheffer H, Niemann S, Homolka S, Roach JC, Kremer K, Petrov, DA, Feldman MW, Gagneux S. High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. *PLoS Biol* 2008;6:e311.
- Herthnek D, England S, Willensen PTJ, and Bolske G. Sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine semen by real-time PCR. *J Appl Microbiol* 2006;100:1095-102.
- Hewinson RG, Vordermeier HM, Smith NH, Gordon SV. Recent advances in our knowledge of *Mycobacterium bovis*: a feeling for the organism. *Vet Microbiol* 2006;112:127-39.
- Hiko A, Agga GE. First-time detection of *Mycobacterium* species from goats in Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production* 2011;43:133-9.
- Hilty M, Diguimbaye C, Schelling E, Baggi F, Tanner M, Zinsstag J. Evaluation of the discriminatory power of variable number tandem repeat (VNTR) typing of *Mycobacterium bovis* strains. *Vet Microbiol* 2005;109:217-22.
- Hines N, Payeur JB, Hoffman LJ. Comparison of the recovery of *Mycobacterium bovis* isolates using the BACTEC MGIT 960 system, BACTEC 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11 solid media. *J Vet Diagn Invest* 2006;18:243-50.
- Ho MM, Kairo SK, Corbel MJ. Tuberculin purified protein derivative (PPD) immunoassay as an *in vitro* alternative assay for identity and confirmation of potency. *Human Vaccines* 2006;2:29-33.

- Houlihan MG, Williams SJ, Poff JD. *Mycobacterium bovis* isolated from a sheep during routine surveillance. *Vet Rec* 2008;163(3):94-5.
- Howard AD, Zwilling BS. Cytokine production by CD4 and CD8 T cells during the growth of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Clinical and Experimental Immunology* 1998;113:443-9.
- Howard AD, Zwilling BS. Reactivation of *tuberculosis* is associated with a shift from type 1 to type 2 cytokines. *Clinical and Experimental Immunology* 1999;115:428-34.
- Huard RC, de Oliveira Lazzarini LC, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol* 2003;41:1637-50.
- Huard RC, Fabre M, de Haas P, Lazzarini LC, van Soolingen D, Cousins D, Ho JL. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Bacteriology* 2006;188:4271-87.
- Humblet M, Boschitroli ML, Saegerman C. Classification of worldwide bovine *tuberculosis* risk factors in cattle: a stratified approach. *Vet Res* 2009;40:50.
- Humblet MF, Walravens K, Salandre O, Boschiroli ML, Gilbert M, Berkvens D, Fauville-Dufaux M, Godfroid J, Dufey J, Raskin A, Vanholme L, Saegerman C. Monitoring of the intra-dermal *tuberculosis* skin test performed by Belgian field practitioners. *Res in Vet Science* 2011;91:199-207.
- Hunter JE, Duignan PJ, Dupont C, Fray L, Fenwick SG, Murray A. First report of potentially zoonotic *tuberculosis* in fur seals in New Zealand. *The New Zeal Med J* 1998;111:130-1.
- Hunter RL. Pathology of post primary *tuberculosis* of the lung: an illustrated critical review. *Tuberculosis (Edinb)* 2011;91(6):497-509.
- Intemann CD, Thye T, Niemann S, Browne EN, Amanua CM, Enimil A, Gyapong J, Osei I, Owusu-Dabo E, Helm S, Rüsich-Gerdes S, Horstmann RD, Meyer CG. Autophagy gene variant IRGM - 261T contributes to protection from *tuberculosis* caused by *Mycobacterium tuberculosis* but not by *M. africanum* strains. *PLoS Pathogens* 2009; 5:e1000577.
- Italia. Decreti Dirigenziali Regione Campania 226-236/2016. Procedure sull'applicazione della normativa comunitaria, nazionale e regionale per l'eradicazione della tubercolosi bovina e bufalina.
- Italia. Decreto Dirigenziale Regione Campania 03/03/2017, n. 59. Approvazione delle procedure diagnostiche per l'eradicazione della tubercolosi bufalina in Regione Campania.
- Jaroso R, Vicente J, Fernandez-de-Mera IG, Aranaz A, Gortazar C. Eurasian wild boar response to skin-testing with mycobacterial and non-mycobacterial antigens. *Prev Vet Med* 2010;96:211-7.
- Javed TM, Ahmad I, Feliziani F, Pasquali P, Akhtar M, Usman M, Irfan M, Severi G, Cagiola M. Analysis of some of the epidemiological risk factor affecting the prevalence of *tuberculosis* in buffalo at seven livestock farms in Punjab Pakistan. *Asian Biom* 2012;6:35-42.
- Javed TM, Shahid LA, Farooqi FA, Akhtar M, Cardenas GA, Wasiq M, Cagiola M. Risk factors associated with the presence of positive reactions in the SCCIT test in water buffalo around two cities in Punjab, Pakistan. *Acta Tropica* 2010; 115:242-7.
- Jenkins HE, Morrison WI, Cox DR, Donnelly CA, Johnston WT, Bourne FJ, Clifton-Hadley RS, Gettinby G, McInerney JP, Watkins GH, Woodroffe R. The prevalence, distribution and severity of detectable pathological lesions in badgers naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Epidemiol and Infect* 2008;136:1350-61.
- Jha VC, Morita Y, Dhakal M, Besnet B, Sato T, Nagai A, Kato M, Kozawa K, Yamamoto S, Kimura H. Isolation of *Mycobacterium* spp. from milking buffaloes and cattle in Nepal. *J Vet Med Sci* 2007;69(8):819-25.

- Jolley ME, Nasir MS, Surujballi OP, Romanowska A, Renteria TB, De la Mora A, Lim A, Bolin SR, Michel AL, Kostovic M, Corrigan EC. Fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in bovine sera. *Vet Microbiol* 2007;120:113-21.
- Jordao Junior CM, Lopes FCM, David S, Farache Filho A, Leite CQF. Detection of nontuberculous mycobacteria from water buffalo raw milk in Brazil. *Food Microbiol* 2009;26:658-61.
- Joshi D, Harris NB, Waters R, Thacker T, Mathema B, Krieswirth B, Sreevatsan S. Single nucleotide polymorphisms in the *Mycobacterium bovis* genome resolve phylogenetic relationships. *J of Clin Microbiol* 2012;50:3853-61.
- Jurczynski K, Lyashchenko KP, Gomis D, Moser I, Greenwald R, Moisson P. Pinniped *tuberculosis* in Malayan tapirs (*Tapirus indicus*) and its transmission to other terrestrial mammals. *J of Zoo and Wildl Med* 2011;42:222-7.
- Kamerbeek J, Schouls L, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, Van Embden J. Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and tuberculosis control. *J Clin Microbiol* 1997;35:907-14.
- Kanameda M, Ekgatit M, Wongkasemjit S, Sirivan C, Pachemasiri T, Kongkrong C, Buchaphan K, Boontarat B. An evaluation of tuberculin skin tests to diagnose *tuberculosis* in swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Prev Vet Med* 1999;39(2):129-13.
- Kanameda M, Ekgatit M. Isolation of *Mycobacterium bovis* from Swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). *Trop Anim Hlth Prod* 1995;27:227-8.
- Karlson AG, Lessel EF. *Mycobacterium bovis* nom. nov. *Inter J of Syst Bacteriol* 1970;20:273-82.
- Karolemeas K, de la Rua-Domenech R, Cooper R, Goodchild A, Clifton-Hadley RS, Conlan AJ, Mitchell AP, Hewinson RG, Donnelly CA, Wood JL, McKinley TJ. Estimation of the relative sensitivity of the comparative tuberculin skin test in tuberculous cattle herds subjected to depopulation. *PLoS ONE* 2012;7:e43217.
- Kassa GM, Abebe F, Worku Y, Legesse M, Medhin G, Bjune G, Ameni G. Tuberculosis in goats and sheep in Afar Pastoral Region of Ethiopia and isolation of *Mycobacterium tuberculosis* from goat. *Vet Med Int* 2012;869146.
- Kehrli ME, Nonnecke BJ, Roth JA. Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period. *American Journal of Veterinary Research* 1989;50:215-220.
- Khattak I, Mushtaq MH, Ahmad MdD, Khan MS, Chaudhry M, Sadique U. Risk factors associated with *Mycobacterium bovis* skin positivity in cattle and buffalo in Peshawar, Pakistan. *Trop Anim Health Prod* 2016;48:479-85.
- Kiers A, Klarenbeek A, Mendelts B, van SD, Koëter G. Transmission of *Mycobacterium pinnipedii* to humans in a zoo with marine mammals. *The Intern J of Tuberculosis and Lung Dis* 2008;12:1469-73.
- Kleeberg HH. Human tuberculosis of bovine origin in relation to public health. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties* 1994;3(1): 11-32.
- Koneman EW, Allen SD, Dowell VR Jr, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr. *Testo atlante di microbiologia diagnostica*. Antonio Delfino Editore; 1995.
- Koo HC, Park YH, Ahn J, Waters WR, Palmer MV, Hamilton MJ, Barrington G, Mosaad AA, Park KT, Jung WK, Hwang IY, Cho SN, Shin SJ, Davis WC. Use of rMPB70 protein and ESAT-6 peptide as antigens for comparison of the enzyme-linked immunosorbent, immunochromatographic, and latex bead agglutination assays for serodiagnosis of bovine tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2005;43:4498-506.
- Kovalyov GK. On human tuberculosis due to *M. bovis*. A review. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1989;33(2):199-206.

- Kulski KJ, Khinsoe C, Pryce T, Christiansen K. Use of a multiplex PCR to detect and identify *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* in blood culture fluids of AIDS patients. *J Clin Microbiol* 1995;33:668-74.
- Langmuir AD. Epidemiology of airborne infection. *Bacteriology Review* 1961;25:173-81.
- Lantos A, Niemann S, Mezosi L, Sos E, Erdelyi K, David S, Parsons LM, Kubica T, Rüsç-Gerdes S, Somoskovi A. Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in captive Siberian tiger. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1462-4.
- Lau HD. *Teste intradérmico no diagnóstico da tuberculose em búfalos*. Belem-PA: Embrapa Amazonia Oriental; 2006. Disponibile all'indirizzo: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/37707/1/Doc250.pdf>; ultima consultazione 27/4/18.
- Lauzi S. Evaluation of the specificity of the gamma-interferon test in bovine tuberculosis-free herds. *Vet J* 2000;160:17-24.
- Lee JJ, Suo J, Lin CB, Wang JD, Lin TY, Tsai YC. Comparative evaluation of the BACTEC MGIT 960 system with solid medium for isolation of mycobacteria. *Int J Tuberc Lung D* 2003;6:569-74.
- Lefleche P, Fabre M, Denoend F, Koeck JK, and Vergnaud G. High resolution, on-line identification of strains from *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing. *BMC Microbiol* 2002;2:37.
- Leitritz L, Schubert S, Bucherl B, Masch A, Heesemann J, Roggenkamp A. Evaluation of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460TB systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens of a university hospital with low incidence of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2001;39:3764-7.
- Lesslie IW. Tuberculosis in attested herds caused by the human type tubercle bacillus. *Veterinary Record* 1960;72:218-24.
- Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, Sherman DR Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation *The J of Infect Dis* 2003;187:117-23.
- Liébana E, Aranaz A, Aldwell FE, McNair J, Neill SD, Smyth AJ, Pollock JM. Cellular interactions in bovine tuberculosis: release of active mycobacteria from infected macrophages by antigen-stimulated T cells. *Immunology* 2000;99:23-9.
- Liébana E, Aranaz A, Welsh M, Neill SD, Pollock JM. *In vitro* T-cell activation of monocyte-derived macrophages by soluble messengers or cell-to-cell contact in bovine tuberculosis. *Immunology* 2000;100:194-202.
- Liébana E, Girvin RM, Welsh M, Neill SD, Pollock JM. Generation of CD8(+) T cell responses to *Mycobacterium bovis* and mycobacterial antigen in experimental bovine tuberculosis. *Infection and Immunity* 1999;67:1034-44.
- Lightbody KA, McNair J, Neill SD, Pollock JM. IgG isotype antibody responses to epitopes of the *Mycobacterium bovis* protein MPB70 in immunised and in tuberculin skin test-reactor cattle. *Vet Microbiol* 2000;31:75(2):177-88.
- Lightbody KA, Skuce RA, Neill SD, Pollock JM. Mycobacterial antigen-specific antibody responses in bovine tuberculosis: an ELISA with potential to confirm disease status. *Vet Rec* 1998;142:295-300.
- Lilenbaum W, Schettini JC, Souza GN, Ribeiro ER, Moreira EC, Fonseca LS. Comparison between a gamma-IFN assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. J of Vet Med Series B* 1999;46:353-8.
- Lomme JR, Thoen CO, Himes EM, Vinson JW, King RE. *Mycobacterium tuberculosis* infection in two East African oryxes. *J of the American Vet Med Association* 1976;169:912-4.
- Lyashchenko K., Greenwald R, Esfandiari J, Chambers MA, Vicente J, Gortazar C, Santos N, Correia-Neves M, Buddle BM, Jackson R, O'Brien DJ, Schmitt S, Palmer MV, Delahay RJ, Waters WR.

- Animal-side serologic assay for rapid detection of *Mycobacterium bovis* infection in multiple species of free-ranging wildlife. *Vet Microbiol* 2008;132:283-92.
- Lyashchenko KP, Pollock JM, Colangeli R, and Gennaro ML. Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Infect Immun* 1998;66:5344-9.
- Lyashchenko KP, Singh M, Colangeli R, and Gennaro ML. A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases. *J Immunol Meth* 2000;242:91-100.
- Machackova M, Matlova L, Lamka J, Smolik J, Melicharek I, Hanzlikova M, Docekal J, Cvetnik Z, Nagy G, Lipiec M, Ocepek M, Pavlik I. Wild boar (*Sus scrofa*) as a possible vector of mycobacterial infections: review of literature and critical analysis of data from Central Europe between 1983 to 2001. *Veterinárni medicína* 2003;48:51-65.
- Mackay CR, Hein WR. A large proportion of bovine T cells express the $\gamma\delta$ T cell receptor and show a distinct tissue distribution and surface phenotype. *International Immunology* 1989;1:540-5.
- Marais BJ, Brittle W, Painczyk K, Hesseling AC, Beyers N, Wasserman E, van Soolingen D, Warren RM. Use of light-emitting diode fluorescence microscopy to detect acid-fast bacilli in sputum. *Clin Infect Dis* 2008;47(2):203-7.
- Marianelli C, Cifani N, Capucchio MT, Fiasconaro M, Russo M, La Mancusa F, Pasquali P, Di Marco V. A case of generalized bovine tuberculosis in a sheep. *J Vet Diagn Invest* 2010;22(3):445-8.
- Martinez LR, Harris B, Black WC 4th, Meyer RM, Brennan PJ, Vissa VD, Jones RL. Genotyping North American animal *Mycobacterium bovis* isolates using multilocus variable number tandem repeat analysis. *J Vet Diagn Invest* 2008;20:707-15.
- Martín-Hernando MP, Höfle U, Vicente J, Ruiz-Fons F, Vidal D, Barral M, Garrido JM, de la Fuente J, Gortazar C. Lesions associated with *Mycobacterium tuberculosis* complex infection in the European wild boar. *Tuberculosis (Edinb)* 2007;87(4):360-7.
- McLoughlin KE, Nalpas NC, Rue-Albrecht K, Browne JA, Magee DA, Killick KE. Profiling of peripheral blood leukocytes from cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Front Immunology* 2014;5:396.
- McNair J, Welsh MD, Pollock JM. The immunology of bovine tuberculosis and progression toward improved disease control strategies. *Vaccine* 2007;26(30):5504-11.
- Melo D, Queiroz JC, Galvão TB. Reações positivas à prova de tuberculina em búfalos, *Bubalus bubalis*, var. *Bubalis* (Linnaeus 1758). *Revue de Medecine Veterinaire* 1965;1:115-6.
- Michel AL, Hlokwé TM, Coetzee ML, Mare L, Connaway L, Rutten VP, Kremer K. High *Mycobacterium bovis* genetic diversity in low prevalence setting. *Vet Microbiol* 2008;126:151-9.
- Milian-Suazo F, Harris B, Arriaga-Diaz C, Romero-Torres C, Stuber T, Alvarez Ojeda G. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*: usefulness in international trade. *Prev Vet Med* 2008;87:261-71.
- Miltgen J, Morillon M, Koeck JL, Varnerot A, Briant JF, Nguyen G, Verrot D, Bonnet D, Vincent V. Two cases of pulmonary tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *canetti*. *Emerg Infect Dis* 2002;8:1350-2.
- Monies RJ, Haed JCS. Bovine tuberculosis in houses calves (Letter). *Veterinary Record* 1999;145:743.
- Morrison WI, Bourne FJ, Cox DR, Donnelly CA, Gettinby G, McInerney JP, Woodroffe R. Pathogenesis and diagnosis of infections with *Mycobacterium bovis* in cattle. *Veterinary Record* 2000;146:236-42.
- Mostowy S, Inwald J, Gordon S, Martín C, Warren R, Kremer K, Cousins D, Behr MA. Revisiting the evolution of *Mycobacterium bovis*. *Journal of Bacteriology* 2005;187:6386-95.
- Muñoz-Mendoza M, Romero B, Del Cerro A, Gortázar C, García-Marín JF, Menéndez S, Mourelo J, de Juan L, Sáez JL, Delahay RJ, Balseiro A. Sheep as a potential source of bovine TB:

- epidemiology, pathology and evaluation of diagnostic techniques. *Transbound Emerg Dis* 2016;63(6):635-46.
- Munroe FA, Dohoo IR, McNab WB. Estimates of within-herd incidence rates of *Mycobacterium bovis* in Canadian cattle and cervids between 1985 and 1994. *Preventive Veterinary Medicine* 2000;45:247-56.
- Mycobacterium bovis tuberculosis* in animals and humans. *CDR Weekly* 1994;4(3).
- Namouchi A, Didelot X, Schöck U, Gicquel B, Rocha EP. After the bottleneck: Genome-wide diversification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by mutation, recombination, and natural selection. *Gen Res* 2012;22:721-34.
- Napp S, Allepuz A, Mercader I, Nofrarías M, López-Soria S, Domingo M, Romero B, Bezos J, Pérez de Val B. Evidence of goats acting as domestic reservoirs of bovine tuberculosis. *Vet Rec* 2013;172(25):663.
- Naranjo V, Gortazar C, Vicente J, de la Fuente J. Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Review. *Vet Microbiol* 2008;127(1-2):1-9.
- Neill SD, Cassidy J, Hanna J, Mackie DP, Pollock JM, Clements A, Walton E, Bryson DG. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *Veterinary Record* 1994;135:134-135.
- Neill SD, Hanna J, O'Brien JJ, McCracken RM. Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. *Veterinary Record* 1988;123:340-3.
- Neill SD, O'Brien JJ, Hanna J. A mathematical model for *Mycobacterium bovis* excretion from tuberculous cattle. *Veterinary Microbiology* 1991;28:103-9.
- Neill SD, Pollock JM, Bryson DB, Hanna J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology* 1994;40:41-52.
- Newport M, Levin M. Genetic susceptibility to tuberculosis. *Journal of Infection* 1999;39:117-21.
- Niemann S, Richter E, Dalügge-Tamm H, Schlesinger H, Graupner D, Königstein B, Gurath G, Greinert U, Rüscher-Gerdes S. Two cases of *Mycobacterium microti* derived tuberculosis in HIV-negative immunocompetent patients. *Emerg Infect Dis* 2000;6:539-42.
- Niemann S, Richter E, Rüscher-Gerdes S. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (approved lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. *Int J of Syst and Evol Microbiol* 2002;52:433-6.
- Noredhoek GT, van Embden JDA and Kolk AHJ. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *J Clin Microbiol* 1996;34:2522-5.
- North RJ, Medina E. How important is *Nram1* in tuberculosis? *Trends in Microbiology* 1999;6:441-443.
- Nozaki Y, Hasegawa Y, Ichiyama S, Nakashima I, Shimokata K. Mechanism of nitric oxide-dependent killing of *Mycobacterium bovis* BCG in human alveolar macrophages. *Infection and Immunity* 1997;65:3644-7.
- Nugent G, Gortazar C, Knowles G. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* in wild deer and feral pigs and their roles in the establishment and spread of bovine tuberculosis in New Zealand wildlife. *N Z Vet J* 2015;63(1):54-67.
- O'Nuallain EM. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle using an immunoassay for bovine soluble interleukin-2 receptor- α (sIL-2R- α) produced by peripheral blood T-lymphocytes following incubation with tuberculin PPD. *Vet Immunol Immunopath* 1997;56:65-76.

- OIE. Bovine tuberculosis. In: *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*. Paris: World Organisation for Animal Health; 2015. Chapter 2.4.6
- Orme IM. Characteristics and specificity of acquired immunologic memory to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of Immunology* 1988;140:3589-93.
- Pai M, Denkinger CM, Kik SV, Rangaka MX, Zwerling A, Oxlade O, Metcalfe JZ, Cattamanchi A, Dowdy DW, Dheda K, Banaei N. Gamma interferon release assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Microbiol Rev* 2014;27(1):3-20.
- Palmer MV, Waters WR, Thacker TC. Lesion development and immunoistochemical changes in granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Pathol* 2007;44:863-74.
- Palmer MV, Whipple DL, Rhyan JC, Bolin CA, Saari DA. Granuloma development in cattle after intratonsillar inoculation with *Mycobacterium bovis*. *American Journal of Veterinary Research* 1999;60:310-15.
- Parrish NM, Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microbiology* 1998;6:107-112.
- Parsons LM, Brosch R, Cole ST, Somoskovi A, Loder A, Bretzel G, van SD, Hale YM, Salfinger M. Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. *J of Clinic Microbiol* 2002;40:2339-45.
- Pate M, Svava T, Gombac M, Paller T, Zolnir-Dovc M, Emersic I, Prodinger WM, Bartos M, Zdovc I, Krt B, Pavlik I, Cvetnic Z, Pogacnik M, Ocepek M. Outbreak of tuberculosis caused by *Mycobacterium caprae* in a zoological garden. *Journal of Veterinary Medicine Series B Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 2006;53:387-92.
- Patel JB, Leonard DG, Pan X, Musser JM, Berman RE, Nachamkin I. Sequence-based identification of *Mycobacterium* species using the Microseq 500 16S rRNA bacterial identification system. *J Clin Microbiol* 2000;38:246-51.
- Pavlik I, Jahn P, Dvorska L, Bartos M, Novotny L, Halouzka R. Mycobacterial infections in horses: a review of the literature. *Veterinarni Medicina – UZPI* 2004;49:427-40.
- Pepperell CS, Casto AM, Kitchen A, Granka JM, Cornejo OE, Holmes EC, Birren B, Galagan J, Feldman MW. The role of selection in shaping diversity of natural *M. tuberculosis* populations. *PLoS Pathogens* 2013;9:e1003543.
- Pérez de Pedro I, Bermúdez P, Artero I, Jiménez MS. Orquiepididimitis por *Mycobacterium africanum*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2008;26:600-2.
- Pesciaroli M, Alvarez J, Boniotti MB, Cagiola M, Di Marco V, Marianelli C, Pacciarini M, Pasquali P. Tuberculosis in domestic animal species. *Res Vet Sci* 2014;97:S78-85.
- Pesciaroli M, Russo M, Mazzone P, Aronica V, Fiasconaro M, Boniotti MB. Evaluation of the interferon-gamma (IFN- γ) assay to diagnose *Mycobacterium bovis* infection in pigs. *Vet Immunol and Immunopath* 2012;148, 369-72.
- Pfyffer GE, Auckenthaler R, van Embden JD, van SD. *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. *Emerg Infect Dis* 1998;4:631-4.
- Plackett P, Ripper J, Corner LA, Small K, de Witte K, Melville L. An ELISA for the detection of anergic tuberculous cattle. *Aust Vet Journal* 1989;66(1):15-9.
- Pollock JM, Andersen P. The potential of the ESAT-6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis. *J Infect Dis* 1997;175(5):1251-4.
- Pollock JM, McNair J, Welsh MD, Girvin RM, Kennedy HE, Mackie DP, Neill SD. Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 2001;81:103-7.

- Pollock JM, Neill SD. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet J* 2002;163:115-27.
- Potgieter LND. Immunosuppression in cattle as a result of bovine diarrhoea virus infection. *Agri-Practice* 1998;9:7-14.
- Prodinger WM. Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by Mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *J Clinical Microbiol* 2005;43:4984-92.
- Pun MP, Prasai TP, Dhakal M, Jha VK, Shrestha KB, Jha VC. Single intradermal tuberculin tests of milking buffaloes and cows in Nepal. *The Vet Rec* 2004;24:124.
- Rahim Z, Möllers M, te Koppele-Vije A, de BJ, Zaman K, Matin MA, Kamal M, Raquib R, van SD, Baqi MA, Heilmann FG, van der Zanden AG. Characterization of *Mycobacterium africanum* subtype I among cows in a dairy farm in Bangladesh using spoligotyping. *The Southeast Asian J of Trop Med and Pub Health* 2007;38:706-13.
- Ratcliffe HL. Tuberculosis induced by droplet nuclei infection. *American Journal of Hygiene* 1952;55:36-48.
- Rhodes SG, Buddle BM, Hewinson RG, Vordermeier HM. Bovine tuberculosis: immune responses in the peripheral blood and at the site of active disease. *Immunology* 2000;99:195-202.
- Rhodes SG, Gruffydd-Jones T, Gunn-Moore D, Keith Jahans K. Adaptation of IFN-gamma ELISA and ELISPOT tests for feline tuberculosis. *Vet Immunol and Immunopath* 2008;124:379-84.
- Rhodes SG, Gunn-Moore D, Boschirolu ML, Schiller I, Esfandiari J, Greenwald R. Comparative study of IFN- γ and antibody tests for feline tuberculosis. *Vet Immunol and Immunopath* 2011;144:129-34.
- Richomme C, Boschirolu ML, Hars J, Casabianca F, Ducrot C. Bovine tuberculosis in livestock and wild boar on the Mediterranean island, Corsica. *J Wild Diseases* 2010;46:627-31.
- Richter E, Weizenegger M, Fahr AM, Rüscher-Gerdes S. Usefulness of the GenoType MTBC assay for differentiating species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in cultures obtained from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2004;42(9):4303-6.
- Riley RL, Mills CC, Nyka W, Weinstock N, Storey PB, Sultan LU, Riley MC, Wells WF. Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis. *American Journal of Hygiene* 1959;70:185-96.
- Ritelli M. Combined use of the g-interferon and interleukin-2 receptor assays for diagnosis of bovine tuberculosis. *Online J Vet Res* 2004;8:16-21.
- Robbe-Austerman SD, Bravo M, Harris B. Comparison of the MGIT 960, BACTEC 460 TB and solid media for isolation of *Mycobacterium bovis* in United States veterinary specimens. *BMC Vet Res* 2013;9:74.
- Rodriguez S, Romero B, Bezos J, de Juan L, Álvarez J, Castellanos E, Moya N, Lozano F, González S, Sáez-Llorente JL, Mateos A, Domínguez L, Aranaz A. High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: Clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. *Vet Microbiol* 2010;141:89-95.
- Rodriguez-Campos S, Navarro Y, Romero B, de Juan L, Bezos J, Mateos A, Golby P, Smith NH, Hewinson GR, Dominguez L, Garcia-de-Viedma D, Aranaz A. Splitting of a prevalent *Mycobacterium bovis* spoligotype by variable number of tandem repeat typing reveals high heterogeneity in an evolving clonal group. *J Clin Microbiol* 2013;51:3658-3665.
- Rodriguez-Campos S, Smith NH, Boniotti MB, Aranaz A. Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci* 2014;97:S5-19.
- Romero B, Aranaz A, Sandoval A, Alvarez J, De Juan L, Bezos J. Persistence and molecular evolution of *Mycobacterium bovis* population from cattle and wildlife in Donana National Park revealed by genotype variation. *Vet Microbiol* 2008;132:87-95.

- Romero B, Rodriguez S, Bezos J, Diaz R, Copano MF, Merediz I, Minguez O, Marques S, Palacios JJ, Garcia dV, Saez JL, Mateos A, Aranaz A, Dominguez L, de Juan L. Humans as source of *Mycobacterium tuberculosis* infection in cattle, Spain. *Emerg Infect Dis* 2011;17:2393-2395.
- Rook GA, Hernandez-Pando R. The pathogenesis of tuberculosis. *Annual Review of Microbiology* 1996;50:259-84.
- Roring S, Hughes MS, Skuce RA, Neill SD. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium bovis* directly from bovine tissue specimens by spoligotyping. *Vet Microbiol* 2000;74:227-36.
- Roring S, Scott A, Brittain D, Walker I, Hewinson G, Neill S, and Skuce R. Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2002;40:2126-33.
- Roxo E, Amaral X. Surto de tuberculose em bufalos no Estado de Sao Paulo. *Inst Biol Lab de tuberculose Centro de Sanidade Animal* 1998;65:92.
- Rua-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. Ante mortem diagnosis of *tuberculosis* in cattle. A review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res in Vet Science* 2006;81:190-210.
- Rue-Albrecht K, Magee DA, Killick KE, Nalpas NC, Gordon SV, MacHugh DE. Comparative functional genomics and the bovine macrophage response to strains of the *Mycobacterium* genus. *Front Immunol* 2014;5:536.
- Sahraoui N, Müller B, Guetarni D, Boulahbal F, Yala D, Ouzrout R, Berg S, Smith NH, Zinsstag J. Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at two abattoirs in Algeria. *BMC Vet Res* 2009;5:4.
- Salfinger M, Hale YM, Driscoll JR. Diagnostic tools in *tuberculosis*. Present and future. *Respiration* 1998;65:163-70.
- Sankar S, Mageshbabu R, Balaji N, Sridharan G. 2011. An appraisal of PCR-based technology in the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Diagn Ther* 2011;15:1-11.
- Scarparo C, Piccoli P, Rigon A, Ruggiero G, Ricordi P, Piersimoni C. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 in comparison with BACTEC 460 TB for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Disease* 2002;44:157-61.
- Schiavo L, Pourquier P, Martucciello A, Olagnon L, Gioia D, Viscito A, Cozza D, De Carlo E. Comparison between two gamma-IFN assays and intradermal tuberculin test for the diagnosis of *tuberculosis* in water buffalo (*bubalus bubalis*). In: *Proceedings X World Buffalo Congress and VII Asian Buffalo Congress, Phuket (Thailandia)* 2013;269.
- Schiller I, Oesch B, Vordermeier HM, Palmer MV, Harris BN, Orloski KA, Buddle BM, Thacker TC, Lyashchenko KP, Waters WR. Bovine *tuberculosis*. A review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transb and Emerg Dis* 2010;57:205-20.
- Schiller I, Vordermeier HM, Waters WR, Palmer M, Thacker T, Whelan A, Hardegger R, Marg-Haufe B, Raeber A, Oesch B. Assessment of *Mycobacterium tuberculosis* OmpATb as a novel antigen for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Clinic and Vaccine Immunol* 2009;16:1314-21.
- Schlesinger LS. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *Journal of Immunology* 1993;150:2920-2930.
- Schmidt V, Schneider S, Schlömer J, Krautwald-Junghanns ME, Richter E. Transmission of tuberculosis between men and pet birds: a case report. *Avian Pathology* 2008;37:589-592.
- Schorey JS, Carroll MC, Brown EJ. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science* 1997;277:1091-3.

- Schröder KH. Vorkommen von *Mycobacterium africanum* in der Bundesrepublik Deutschland. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale A, *Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie* 1982;251:341-344.
- Serbina NV, Liu CC, Scanga CA, Flynn JL. CD8+ CTL from lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice express perforin *in vivo* and lyse infected macrophages. *Journal of Immunology* 2000;165:353-363.
- Serraino A, Marchetti G, Sanguinetti V, Rossi MC, Zanoni RG, Catozzi L, Bandera A, Dini W, Mignone W, Franzetti F, Gori A. Monitoring of transmission of *tuberculosis* between wild boars and cattle: genotypical analysis of strains by molecular epidemiology techniques. *J Clin Microbiol* 1999;37(9):2766-71.
- Sgarangella F, Marongiu D, Bitti G. Gestione della tubercolosi bovina in un'area dell'ASL di Sassari. *L'Osservatorio* 2009; 12(6):11-5.
- Sharpe AE, Brady CP, Johnson AJ, Byrne W, Kenny K, Costello E. Concurrent outbreak of *tuberculosis* and caseous lymphadenitis in a goat herd. *Vet Rec* 2010;166(19):591-2.
- Sidders B, Pirson C, Hogarth PJ, Hewinson RG, Stoker NG, Vordermeier HM, Ewer K. Screening of highly expressed mycobacterial genes identifies Rv3615c as a useful differential diagnostic antigen for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect and Immun* 2008;76:3932-9.
- Skamene E. The Bcg gene story. *Immunobiology* 1994;191:451-460.
- Skinner MA, Wedlock DN, Buddle BM. Vaccination of animals against *Mycobacterium bovis*. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties* 2001;20:112-32.
- Skuce RA, McCorry TP, Mc Carroll JF, Roring SM, Scott AN, Brittain D, Hughes SI, Hewinson RG, and Neill SD. 2002. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiol* 2002;148:519-528.
- Skuce RA, McDowell SW, Mallon TR, Luke B, Breadon EL, Lagan PL, McCormick CM, McBride SH, Pollock JM. Discrimination of isolates of *Mycobacterium bovis* in Northern Ireland on the basis of variable number of tandem repeats (VNTRs). *Vet Rec* 2005;157:501-4.
- Small KJ, Thomson D. The efficacy of bovine PPD tuberculin in the single caudal fold test to detect *tuberculosis* in water buffalo. *Buffalo bull* 1986;5:62-4.
- Smith N. Animal pathogenicity of the "Dassie bacillus". *Tubercle* 1965;46:58-64.
- Smith N. The 'Dassie' bacillus. *Tubercle* 1960;41:203-12.
- Smith NH, Crawshaw T, Parry J, Birtles RJ. *Mycobacterium microti*: More diverse than previously thought. *J of Clinic Microbiol* 2009;47:2551-2559.
- Smith NH, Dale J, Inwald J, Palmer S, Gordon SV, Hewinson RG, Smith JM. The population structure of *Mycobacterium bovis* in Great Britain: clonal expansion. *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.* 2003;100:15271-5.
- Smith NH, Hewinson RG, Kremer K, Brosch R, Gordon SV. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Rev in Microbiol* 2009;7:537-44.
- Smith NH. The global distribution and phylogeography of *Mycobacterium bovis* clonal complexes. *Infect Gen and Evol* 2012;12:857-65.
- Smith T. A comparative study of bovine tubercle bacilli and of human bacilli from sputum. *J of Exp Med* 1898;3:451-511.
- Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fox AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russel DG. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 1994;263:678-81.
- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V,

- Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Loch C, van Soolingen D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006;44:4498-510.
- Supply P, Marceau M, Mangenot S, Roche D, Rouanet C, Khanna V, Majlessi L, Criscuolo A, Tap J, Pawlik A, Fiette L, Orgeur M, Fabre M, Parmentier C, Frigui W, Simeone R, Boritsch EC, Debrie AS, Willery E, Walker D, Quail MA, Ma L, Bouchier C, Salvignol G, Sayes F, Cascioferro A, Seemann T, Barbe V, Loch C, Gutierrez MC, Leclerc C, Bentley SD, Stinear TP, Brisse S, Medigue C, Parkhill J, Cruveiller S, Brosch R. Genomic analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Genetics* 2013;45:172-9.
- Tameni S. Quality controls and *in vitro* diagnostic efficiency of bovine PPD tuberculins. *Biologicals* 1998;26:225-35.
- Task Force Bovine Tuberculosis Subgroup. *Working document on eradication of bovine tuberculosis in the EU accepted by the Bovine tuberculosis subgroup of the Task Force on monitoring animal disease eradication*. Brussels: European Commission; 2006. (SANCO/10200/2006). http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/eradication/tb_workingdoc2006_en.pdf; ultima consultazione 27/4/18.
- Taylor GM, Worth DR, Palmer S, Jahans K, Hewinson RG. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Vet Res* 2007;13:3-12.
- Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993;31:175-8.
- Thacker TC, Harris B, Palmer MV, Waters WR. Improved specificity for detection of *Mycobacterium bovis* in fresh tissues using IS6110 real-time PCR. *BMC Vet Res* 2011;25:7-50.
- Therese KL, Bartell J, Deepa P, Mangaiyarkarasi S, Ward D, Dajcs J, Madhavan HN, Stroman D. DNA sequencing by Microseq kit targeting 16S rRNA gene for species level identification of mycobacteria. *Indian J Med Res* 2009;129:176-81.
- Thoen A, LoBue p, de Kantor I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet Microbiol* 2006;112:339-45.
- Thoen CO, Himes EM. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infections. *Progress in Veterinary Microbiology and Immunology* 1986;2:189-214.
- Thorel MF, Huchzermeyer H, Michel AL. *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* infection in mammals. Review. *Science and Technology Office Internationale des Epizooties* 2001;20:204-18.
- Toossi Z, Ellner JJ. Pathogenesis of tuberculosis. In: Friedman LN (Ed.). *Tuberculosis: current concepts and treatment*. 2nd Ed. Boca Raton: CRC Press; 2000. p.19-47.
- Tortoli E, Cichero P, Piersimoni C, Simonetti MT, Gesu G, Nista D. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study. *J Clin Microbiol* 1999;37:3578-82.
- Valente C, Cuteri V, Ausili E, Piersimoni C. Evaluation of the Abbott LCx *Mycobacterium tuberculosis* and for direct detection of *Mycobacterium bovis* in bovine tissue samples. *Vet Res Commun* 2002;26:21-7.
- van der Burgt GM, Crawshaw T, Foster AP, Denny DJ, Schock A. *Mycobacterium bovis* infection in dogs. *Vet Rec* 2009;165(21):634.
- van der Burgt GM, Drummond F, Crawshaw T, Morris S. An outbreak of tuberculosis in Lleyn sheep in the UK associated with clinical signs. *Vet Rec* 2013;19;172(3):69.
- van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans PWM, Martin C, Mc. Adam R, Shinnick TM, Small PM. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by

- DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993;31:406-9.
- van Embden JDA, Schouls LM, van Soolingen D. Molecular techniques: applications in epidemiologic studies. In: Thoen CO and Steele JH (Ed.). *Mycobacterium bovis infection in animals and humans*. Iowa: State University Press, Ames; 1995. p. 15-27.
- van Helden PD, Parsons SD, Gey van Pittius NC. 'Emerging' mycobacteria in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association* 2009;80:210-4.
- van Ingen J, Rahim Z, Mulder A, Boeree MJ, Simeone R, Brosch R, van Soolingen D. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerg Infect Dis* 2012;18:653-655.
- van Pinxteren LA, Ravn P, Agger EM, Pollock J, Andersen P. Diagnosis of *tuberculosis* based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7(2):155-60.
- van Soolingen D, de Haas PE, Haagsma J, Eger T, Hermans PW, Ritacco V, Alito A, van Embden JD. Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *J of Clinic Microbiol* 1994;32:2425-33.
- van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PE, Hermans PW, Koedam MA, Teppema KS, Brennan, PJ, Besra GS, Portaels F, Top J, Schouls LM, van Embden JD. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Internat J of Syst Bacteriol* 1997;47:1236-45.
- van Soolingen D, van der Zanden AG, de Haas PE, Noordhoek GT, Kiers A, Foudraine NA, Portaels F, Kolk AH, Kremer K, van Embden JD. Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. *J of Clinic Microbiol* 1998;36:1840-5.
- Vicente J, Höfle U, Garrido JM, Fernández-De-Mera IG, Juste R, Barral M, Gortazar C. Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain. *Vet Res* 2006;37(1):107-19.
- Vordermeier HM, Whelan A, Cockle PJ, Farrant L, Palmer N, Hewinson RG. Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine *tuberculosis* in cattle. *Clinic and Diagnos Labor Immunol* 2001;8:571-8.
- Vordermeier M, Gordon SV, Hewinson RG. *Mycobacterium bovis* antigens for the differential diagnosis of vaccinated and infected cattle. *Vet Microbiol* 2011;5,151(1-2):8-13.
- Wagner JC, Buchanan G, Bokkenheuser V, Levisseur S. An acid-fast bacillus isolated from the lungs of the Cape hyrax, *Procavia capensis* (Pallas). *Nature* 1958;181:284-5.
- Waqas A, Javed MT, Ashfaq K, Mehwish Q. An abattoir based study on Brucellosis, Bovine *Tuberculosis* and *Paratuberculosis* in buffaloes and cattle at Faisalabad, Pakistan. *Int J Vet Health Sci & Res* 2015:2332-748.
- Wards BJ, Collins DM, de Lisle GW. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1995;43:227-240.
- Warren RM, Gey Van Pittus NC, Barnard M, Hesseling A, Engelke E, de Kock M, Gutierrez MC, Chege GK, Victor TC, Hoal EG, van Helden PD. *Int J Tuberc Lung D* 2006;10:818-22.
- Waters WR, Palmer MV, Pesch BA, Olsen SC, Wannemuehler MJ, Whipple DL. MHC class II-restricted, CD4+ T cell proliferative responses of peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium bovis*-infected white-tailed deer. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2000;76:215-229.
- Waters WR, Palmer MV, Thacker TC, Bannantine JP, Vordermeier HM, Hewinson RG, Greenwald R, Esfandiari J, McNair J, Pollock JM, Andersen P, Lyashchenko KP. Early antibody responses to experimental *Mycobacterium bovis* infection of cattle. *Clinical and Vaccine Immunology* 2006;13:648-54.

- Waters WR, Whelan AO, Lyashchenko KP, Greenwald R, Palmer MV, Harris BN, Hewinson RG, Vordermeier HM. Immune responses in cattle inoculated with *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, or *Mycobacterium kansasii*. *Clinic and Vaccine Immunol* 2010;17:247-52.
- Weldingh K, Hansen A, Jacobsen S, Andersen P. High resolution electroelution of polyacrylamide gels for the purification of single proteins from *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate. *Scandinavian J Immunol* 2000;51:79-86.
- Wells AQ. *The murine type of tubercle bacillus (the vole acid-fast bacillus)*. Oxford, UK: Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford; 1946.
- Wells AQ. Vaccination with the murine type of tubercle bacillus (vole bacillus). *Lancet* 1949;2:53-5.
- Welsh MD. *Effects of bovine viral diarrhoea virus/mucosal disease virus on the functional properties of bovine mononuclear cells*. Ph.D. Thesis. Belfast: Queen's University; 1995.
- Whelan C, Shuralev E, O'Keeffe G, Hyland P, Kwok HF, Snoddy P, O'Brien A, Connolly M, Quinn P, Groll M, Watterson T, Call S, Kenny K, Duignan A, Hamilton MJ, Buddle BM, Johnston JA, Davis WC, Olwill SA, Clarke J. Multiplex immunoassay for serological diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Clinic Vaccine Immunol* 2008;15:1834-8.
- Whelan C, Whelan AO, Shuralev E, Kwok HF, Hewinson G, Clarke J. Performance of the enferplex TB assay with cattle in great britain and assessment of its suitability as a test to distinguish infected and vaccinated animals. *Clinic Vaccine Immunol* 2010;17(5):813-7.
- Whipple DL, Bolin CA, Miller JM. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations* 1996;8:351-4.
- Wilton S, Cousins D. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. *PCR Methods and Applications* 1992;1:269-73.
- Wood PR, Corner LA, Plackett P. Development of a simple, rapid *in vitro* cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. *Res Vet Sci* 1990;49(1):46-9.
- Wood PR, Jones SL. BOVIGAM: an *in vitro* cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2001;81(1-2):147-55.
- Wood PR, Rothel JS. *In vitro* immunodiagnostic assay for bovine tuberculosis. *Vet Microbiol* 1994;40:125-35.
- Wood PR. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Vet Microbiol* 1991;31:71-79.
- Woods R, Cousins DV, Kirkwood R, Obendorf DL. Tuberculosis in a wild Australian fur seal (*Arctocephalus pusillus doriferus*) from Tasmania. *J of Wildl Dis* 1995;31:83-6.
- World Health Organisation. *Global tuberculosis control*. Geneva: WHO; 2012.
- Xavier Emmanuel F, Seagar AL, Doig C, Rayner A, Claxton P, Laurenson I. Human and animal infections with *Mycobacterium microti*, Scotland. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1924-7.
- Yoneda T, Ellner JJ. CD4(+) T cell and natural killer cell-dependent killing of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1998;158:395-403.
- Zanardi G, Boniotti B, Costanzi C, Chin F, Moresco A, Pacciarini ML. Origin and diffusion of Tuberculosis breakdowns by *Mycobacterium caprae* in cattle herds in an officially free Province of Italy". *Proceedings of International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (IMED)*, Vienna, February 4-7,2011. p. 156.
- Zanardi G, Boniotti MB, Gaffuri A, Casto B, Zanoni M, Pacciarini ML. Tuberculosis transmission by *Mycobacterium bovis* in a mixed cattle and goat herd. *Res Vet Sci* 2013;95(2):430-3.

- Zanardi G, Zanoni MG, Gaffuri A, Boniotti B, Pacciarini ML, Alborali L. *Tuberculosis* transmission by *Mycobacterium bovis* in goats. *Proceedings of M. bovis. V Conference, Wellington 25-28 August 2009*,134.
- Zanolari P, Robert N, Lyashchenko KP, Pfyffer GE, Greenwald R, Esfandiari J, Meylan M. *Tuberculosis* caused by *Mycobacterium microti* in South American camelids. *J of Vet Inter Med* 2009;23:1266-72.
- Zarden CFO, Marassi CD. A complementary diagnosis of naturally occurring tuberculosis in water buffaloes (*bubalus bubalis*) in Rio de Janeiro using a MPB70-Elisa. *Trop Anim Health Prod* 2013;45:1203-6.
- Zimmerli S, Edward S, Ernst JD. Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1996;15:760-770.

Normativa

- Europa. Direttiva del Consiglio del 26 giugno 1964 relativa a problemi di polizia sanitaria in materia di scambi intracomunitari di animali delle specie bovina e suina (64/432/CEE). *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 121, 29/7/1964.
- Europa. Direttiva del Consiglio del 17 maggio 1977 che instaura un'azione della Comunità per l'eradicazione della brucellosi, della tubercolosi e della leucosi dei bovini (77/391/CEE). *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 145, 13/6/1977.
- Europa. Regolamento (CE) n. 1760/2000 del Parlamento europeo e del Consiglio del 17 luglio 2000 che istituisce un sistema di identificazione e di registrazione dei bovini e relativo all'etichettatura delle carni bovine e dei prodotti a base di carni bovine, e che abroga il regolamento (CE) n. 820/97 del Consiglio. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 204, 11/8/2000.
- Europa. Regolamento (CE) n. 1226/2002 della Commissione, dell'8 luglio 2002, che modifica l'allegato B della direttiva 64/432/CEE del Consiglio. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 179, 9/7/2002.
- Europa. Regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 139, 30/4/2004.
- Europa. Regolamento (CE) n. 854/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 139, 30/4/2004.
- Europa. Regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 165, 30/4/2004.
- Europa. Regolamento (CE) n. 737/2008 della Commissione, del 28 luglio 2008, che designa i laboratori comunitari di riferimento per le malattie dei crostacei, la rabbia e la tubercolosi bovina, che stabilisce responsabilità e compiti supplementari dei laboratori comunitari di riferimento per la rabbia e la tubercolosi bovina e che modifica l'allegato VII del regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 201, 30/7/2008.
- Europa. Decisione di esecuzione della Commissione del 30 novembre 2011 recante approvazione dei programmi annuali e pluriennali di eradicazione, lotta e sorveglianza di talune malattie animali e zoonosi presentati dagli Stati Membri per il 2012 e gli anni successivi, nonché del contributo finanziario dell'Unione a detti programmi (2011/807/UE). *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 322, 6/12/2011.

- Italia. Regio Decreto 9 maggio n. 994. Regolamento sulla vigilanza igienica del latte destinato al consumo diretto. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* n. 146, 24/6/1929.
- Italia. Decreto del Presidente della Repubblica. D.P.R. 8 febbraio 1954, n. 320. Regolamento di polizia veterinaria. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* n. 142, 24/6/1954.
- Italia. Legge 9 giugno 1964 n. 615. Bonifica sanitaria degli allevamenti dalla tubercolosi e dalla brucellosi. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* n. 187, 31/7/1964.
- Italia. Decreto Ministeriale 11 marzo 1965.
- Italia. Legge 23 gennaio 1968 n. 33. Modifiche alla legge 9 giugno 1964, n. 615, sulla bonifica sanitaria degli allevamenti dalla tubercolosi e dalla brucellosi. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* n. 37, 12/2/1968.
- Italia. Decreto Ministeriale 1 giugno 1968. Piano nazionale per la profilassi della tubercolosi bovina. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* n. 233, 13/9/1968.
- Italia. Decreto del Ministro della sanità 14 giugno 1968. Norme per la corresponsione dell'indennità di abbattimento dei bovini infetti prevista dalla legge 23 gennaio 1968, n. 33 concernente la bonifica sanitaria degli allevamenti dalla tubercolosi e dalla brucellosi. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* n. 237, 17/9/1968.
- Italia. Legge del 31 marzo 1976 n. 124. Rifinanziamento delle leggi 9 giugno 1964, n. 615, 23 gennaio 1968, n. 33 e 1 marzo 1972, n. 42, concernenti la bonifica sanitaria degli allevamenti dalla tubercolosi e dalla brucellosi e modifiche al decreto presidenziale 8 febbraio 1954, n. 320.
- Italia. Legge 30 aprile 1976 n. 397. Norme sanitarie sugli scambi di animali tra l'Italia e gli altri Stati Membri della Comunità economica europea. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* n. 153, 11/6/1976.
- Italia. Decreto Ministeriale del 30 giugno 1977, concernente l'obbligo in tutto il territorio nazionale delle operazioni di profilassi e risanamento degli allevamenti bovini dalla tubercolosi. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* n. 179, 2/7/1977.
- Italia. Legge 28 maggio 1981 n. 286.
- Italia. Legge 2 giugno 1988, n. 218. Misure per la lotta contro l'afta epizootica ed altre malattie epizootiche degli animali. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* n. 144, 21/6/1988.
- Italia. Ordinanza 2 gennaio 1993. Norme integrative per l'eradicazione della tubercolosi dagli allevamenti bovini. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* n. 13, 18/1/1993.
- Italia. Decreto ministeriale 15 dicembre 1995 n. 592. Regolamento concernente il piano nazionale per la eradicazione della tubercolosi negli allevamenti bovini e bufalini. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* n. 125, 30/5/1996.
- Italia. Decreto legislativo 22 maggio 1999 n. 196. Attuazione della direttiva 97/12/CE che modifica e aggiorna la direttiva 64/432/CEE relativa ai problemi di polizia sanitaria in materia di scambi intracomunitari di animali delle specie bovina e suina. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* n.146, 24/6/1999.
- Italia. Ordinanza del Ministero della Salute. O.M. 14 novembre 2006. Misure straordinarie di polizia veterinaria in materia di tubercolosi, brucellosi bovina e bufalina, brucellosi ovi-caprina, leucosi in Calabria, Campania, Puglia e Sicilia. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* n. 230, 7/12/2006.
- Italia. Ordinanza del Ministero della Salute. O.M. 9 agosto 2012. Misure straordinarie di polizia veterinaria in materia di tubercolosi, brucellosi bovina e bufalina, brucellosi ovi-caprina, leucosi, nelle regioni Calabria, Campania, Puglia e Sicilia. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* n. 212, 11/9/2012.

- Italia. Ordinanza ministeriale 28 maggio 2015. Misure straordinarie di polizia veterinaria in materia di tubercolosi, brucellosi bovina e bufalina, brucellosi ovi-caprina, leucosi bovina enzootica, *Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana* n. 144, 24/6/2015.
- Italia. Decreto ministeriale del 19 settembre 2016. Determinazione dell'indennità di abbattimento di bovini e bufalini infetti da tubercolosi e da brucellosi, di ovini e caprini infetti da brucellosi e di bovini e bufalini infetti da leucosi bovina enzootica, per l'anno 2016. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* n. 272, 21/11/2016.
- Italia. Decisione di esecuzione (UE) 2017/888 della Commissione del 22 maggio 2017. Modifica la decisione 2003/467/CE per quanto riguarda la qualifica di ufficialmente indenne da tubercolosi della Regione italiana Umbria e la qualifica di ufficialmente indenne da leucosi bovina enzootica della Polonia, la decisione 2004/558/CE per quanto riguarda la qualifica di ufficialmente indenne da rinotracheite bovina infettiva della Germania e la decisione 2008/185/CE per quanto riguarda la qualifica di ufficialmente indenne dalla malattia di Aujeszky di alcune regioni della Polonia e l'approvazione del programma di eradicazione della malattia di Aujeszky per la Regione italiana Veneto. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L135/27 del 24-5-2017

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di marzo 2018*

*Stampato in proprio
Settore Attività Editoriali – Istituto Superiore di Sanità*

Roma, maggio 2018