

La tubercolosi da *Mycobacterium bovis* negli animali selvatici

Introduzione

La tubercolosi (TBC) è una malattia causata da batteri del complesso *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 1) e da *Mycobacterium bovis*, agenti responsabili rispettivamente della tubercolosi nell'uomo e negli animali. Si stima che ogni anno nel mondo si abbiano circa 8,8 milioni di nuovi casi di TBC nell'uomo, pari a 122 casi ogni 100.000 abitanti, con 1,5 milioni di decessi nel 2010 (WHO, 2011). Il 58% dei casi mondiali di tubercolosi è in Asia, ed in particolare in India e in Cina si conta il più alto numero assoluto di diagnosi pari, rispettivamente, al 26% e 12% dei casi totali.

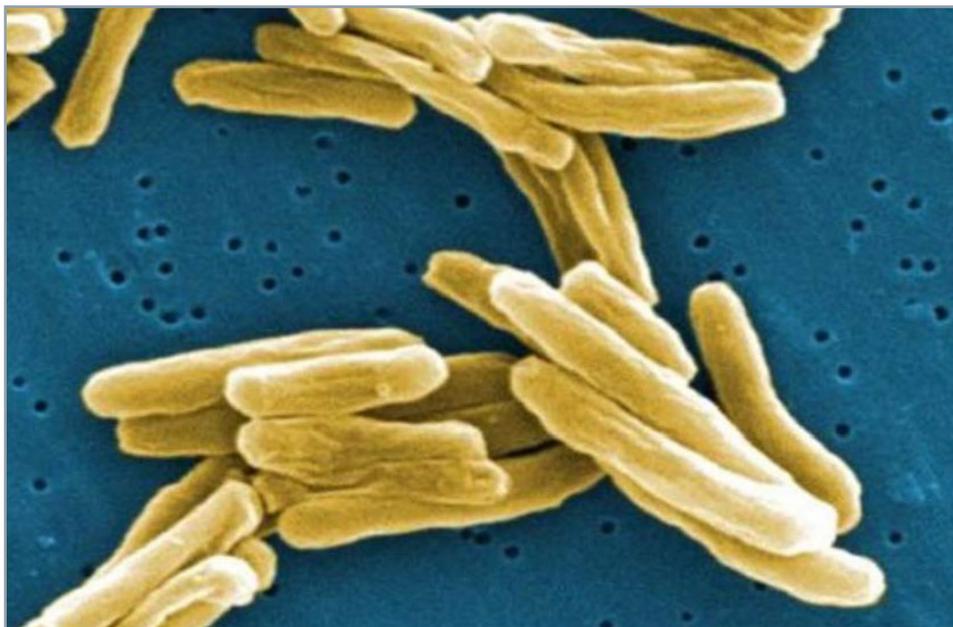


Figura 1.
Bacillo *M. tuberculosis*

Negli ultimi decenni, nonostante i significativi progressi verso il controllo e/o eradicazione della tubercolosi nei paesi industrializzati, questa malattia rimane tra le principali malattie infettive negli esseri umani e negli animali domestici in diversi paesi del mondo (WHO 2011).

Il genere *Mycobacterium* comprende più di 190 specie, alcune delle quali patogene per l'uomo e per gli animali. I micobatteri patogeni che possono infettare l'uomo e/o gli animali domestici o selvatici comprendono le seguenti specie: *M. tuberculosis*, *M. leprae* (responsabile della lebbra nell'uomo), *M. bovis*, *M. africanum*, *M. pinnipedii*, *M. bovis subsp. caprae*, e *M. microti*.

La TBC causata da *M. bovis* è una zoonosi (Perez-Lago et al., 2014) e l'uomo si può infettare sia per via respiratoria, attraverso il contatto stretto con animali infetti, sia per via alimentare tramite il consumo di carne, altri alimenti e bevande contaminati. Il latte crudo, non pastorizzato, e proveniente da animali infetti rappresenta una importante fonte di infezione per l'uomo. A livello globale, una significativa percentuale dei casi di tubercolosi sono causati da *M. bovis* e i bovini rappresentano il principale serbatoio di tale infezione (Müller et al., 2013).

Anche nel caso degli animali le principali vie di infezione sono tramite la via respiratoria o per ingestione di tessuti o substrati ambientali contaminati da animali infetti (Palmer, 2013). Particolare il caso dell'infezione da parte dei cinghiali attraverso l'alimentazione su carcasse di cervi malati, via di trasmissione identificata in alcune aree della Spagna (Gortazar et al., 2012). Il *M. bovis* è eliminato da parte degli animali infetti anche attraverso secrezione ed escrezioni, urina e feci (Barasona et al., 2015).

Si sospetta che le caratteristiche del suolo, la tipologia di terreno e il pH possano

avere un ruolo nella persistenza nell'ambiente di *M. bovis*, ma ulteriori studi sono necessari per chiarire tali relazioni (Barbier *et al.*, 2017).

Studi sperimentali su diversi substrati ambientali hanno dimostrato che *M. bovis* può sopravvivere anche per un lungo periodo fuori dall'ospite: fino a 12 mesi in terreni sterili incubati

in condizioni controllate di laboratorio (Ghodbane *et al.*, 2014), e fino a 88 giorni in condizioni meteorologiche naturali nel Michigan (USA) (Fine *et al.*, 2011) a basse temperature (4°C) (Barbier *et al.*, 2017) e protetti contro le radiazioni solari (ultravioletti), come ad esempio nelle feci (Tanner *et al.*, 1999) nel mais, nel fieno, nell'acqua o nel terreno fresco e umido in inverno/primavera (Fine *et al.*, 2011; Jackson *et al.*, 1995; Barbier *et al.*, 2017).

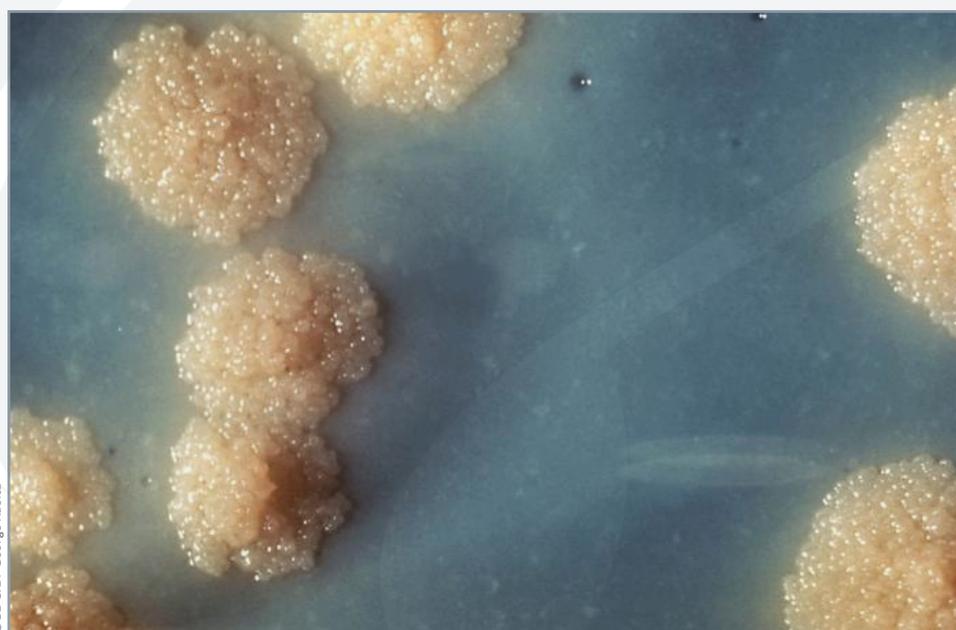
Una ampia gamma di animali domestici e selvatici possono contrarre l'infezione (Biet *et al.*, 2005), e sebbene il bestiame domestico è considerato l'ospite principale di *M. bovis*, tra le specie selvatiche vi sono alcuni serbatoi riconosciuti quali il tasso europeo (*Meles meles*) in Gran Bretagna e Irlanda, il cervo (*Cervus elaphus*) e il tricosuro volpino (*Trichosurus vulpecula*) in Nuova Zelanda, il bufalo africano (*Syncerus caffer*) in Sudafrica, il cinghiale (*Sus scrofa*) nella penisola iberica e i cervi dalla coda bianca (*Odocoileus virginianus*) nel Michigan, USA (Palmer, 2013; Naranjo *et al.*, 2008).

L'esistenza di serbatoi di infezione nella fauna selvatica può limitare l'efficacia di programmi di eradicazione nel bestiame, soprattutto nelle aree dove l'infezione è stata sensibilmente ridotta o azzerata negli animali domestici (Aranaz *et al.*, 2004; Gortázar *et al.*, 2007).

Occorre però considerare che l'instaurarsi di meccanismi di persistenza dell'infezione nelle popolazioni selvatiche è un fenomeno complesso che risulta dalla combinazione di vari fattori quali la densità delle specie selvatiche, le interazioni sociali tra gli individui, la biologia e le abitudini alimentari degli animali, la persistenza dei batteri vitali nell'ambiente, l'interazione con animali domestici potenzialmente infetti e l'influenza dell'uomo, attraverso le pratiche venatorie, la messa a disposizione di risorse trofiche per gli animali e la modifica degli habitat, quali ad esempio la costruzione di recinti ed ostacoli, o l'abbandono di terreni agricoli. Un esempio di tale complessità, che coinvolge più specie animali è rappresentato dai meccanismi di mantenimento dell'infezione in alcune aree della Spagna tra le popolazioni di cinghiali e di cervi, con possibile passaggio dell'infezione ai bovini allevati (Gortázar *et al.*, 2012).

Occasioni di trasmissione dell'infezione tra gli animali selvatici e domestici sono rappresentate da aree comuni di foraggiamento o di abbeverata (Kaneene *et al.*, 2002). Nella Penisola Iberica, ad esempio, la più alta prevalenza di tubercolosi in cervi e cinghiali è stata rilevata nell'area sud-ovest, dove sono presenti zone naturali protette. Le condizioni che si ritiene influenzino localmente la trasmissione e la persistenza della TBC sono: (1) l'elevata densità dei selvatici (2) la concentrazione degli animali attorno

Figura 2.
Coltura in vitro del *Mycobacterium tuberculosis* nella quale si nota la morfologia della colonia



©CDC/Dr. George Kubica

a punti di alimentazione e di abbeverata, e (3) un clima mediterraneo, con estati calde e asciutte, che promuove una maggiore aggregazione degli animali attorno ai punti di abbeverata (Palmer, 2013).

È quindi fondamentale comprendere che la tubercolosi deve essere monitorata in tutte le specie animali coinvolte, domestiche e selvatiche, coinvolgendo tutte le parti interessate: amministratori, allevatori, cacciatori, ambientalisti e studiosi. In Spagna la tubercolosi è presente specialmente in ambienti dove c'è promiscuità di pascoli tra animali domestici (bovini e caprini, ovini e suini anche a livello locale) e selvatici (cinghiale, cervi e daini, tassi). Il tasso, inoltre, è fortemente sospetto di avere un ruolo nella trasmissione della TBC nel Nord della Spagna (Gortázar *et al.*, 2012). In Francia vi sono segnalazioni della presenza dell'infezione nel cinghiale e sono stati osservati possibili associazioni tra la presenza di tassi e allevamenti bovini con TBC (Payne *et al.*, 2012).

Il cinghiale eurasiatico (*Sus scrofa*) è sempre più considerato come un attore rilevante nell'epidemiologia della tubercolosi. In Spagna, il cinghiale eurasiatico è considerato il serbatoio principale per la persistenza della TBC nella fauna selvatica; i tassi di prevalenza dell'infezione in questa specie animale sono oltre il 50% (Vicente *et al.*, 2013), con un terzo dei suinetti che possono infettarsi durante i primi 6 mesi di vita (Che' Amat *et al.*, 2015).

Il monitoraggio della tubercolosi in questa specie animale, pertanto, diventa uno strumento fondamentale per meglio comprendere i possibili meccanismi di persistenza dell'infezione in taluni territori. Per stimare l'esposizione dei cinghiali selvatici al complesso *M. tuberculosis* (MTC) in Francia, sono stati dal 2000 sono stati testati 2.080 campioni di siero archiviati di animali cacciati in 58 "dipartimenti" francesi, utilizzando l'ELISA come primo strumento di screening. Dal lavoro si evince che l'esposizione di cinghiali a MTC è coerente con focolai di tubercolosi nei bovini: la distanza media tra un cinghiale sieropositivo e il bestiame è di 13 km, compatibile con la capacità di movimento quotidiana di un cinghiale (un maschio può arrivare a coprire fino a 38 km) (Richomme *et al.*, 2013).

La diagnosi in vita negli animali selvatici è limitata per la difficoltà di catturare ed esaminare su base routinaria gli animali in libertà. La sorveglianza, pertanto, si basa soprattutto sull'analisi *post mortem* di animali cacciati (Santos *et al.*, 2010) o morti per cause accidentali (ad esempio per investimenti da auto).

L'esame colturale di *M. bovis* permette una diagnosi definitiva di tubercolosi. Essa può essere eseguita su tessuti congelati a -20 e su animali vivi dall'aspirato bronchiale, dall'urina o da tamponi (ad esempio fecale, ascessi, ferite). Sull'animale morto, 2 grammi di tessuto raccolto da lesioni negli organi interessati e da linfonodi interessati possono essere sufficienti per una coltura batterica e la successiva caratterizzazione molecolare.

Occorre tenere presente che, come sopra riportato, le condizioni ed i meccanismi che facilitano la permanenza dell'infezione nelle specie selvatiche sono assai varie in dipendenza delle aree geografiche e delle specie coinvolte. Di conseguenza, le misure di controllo devono essere adattate alle circostanze locali. Inoltre, in molte zone dell'Europa le popolazioni di cinghiali e di cervi sono in netta espansione geografica e demografica.

Uno dei metodi di controllo ampiamente utilizzato nel passato è quello del depopolamento, attraverso una intensa attività di caccia, allo scopo di ridurre la densità degli animali selvatici a livelli tali da non permettere più il mantenimento della trasmissione nella popolazione. Tale approccio è stato utilizzato nel Regno Unito nei confronti del tasso con risultati contrastanti. Se da una parte si è rilevata una diminuzione dell'incidenza della TBC nei bovini nelle aree dove tale strategia è stata applicata, dall'altra nelle aree periferiche di tali zone si è assistito, al contrario, ad un aumento dell'infezione. Ciò sarebbe spiegato dalle perturbazioni che la pressione venatoria determina sulla struttura sociale dei tassi, con aumento del home range degli animali e, quindi, della probabilità di contatto tra individui infetti e sani (Palmer, 2013).

Ulteriori mezzi di controllo si basano sulla prevenzione del contatto tra selvatico e domestico, evitando le situazioni di promiscuità legate alla condivisione del pascolo, dei punti di abbeverata e di foraggiamento.

Il metodo di profilassi più promettente, però, è rappresentato dal possibile uso di

vaccini nella popolazione selvatica. Sono stati effettuati studi di vaccinazione con richiamo nel cinghiale, tramite somministrazione con esche orali distribuite due volte ogni estate (Buddle *et al.*, 2003) che hanno prodotto una forte risposta protettiva nei confronti del ceppo di campo (Gortazar *et al.* 2014).

Altri studi sperimentali di vaccinazione orale hanno coinvolto i tassi, nei quali sono stati rilevati livelli elevati di protezione contro l'infezione (Gormley *et al.*, 2017).

Uno studio nel Regno Unito ha indagato se i vaccini inattivati al calore e somministrati alla fauna selvatica per via orale potessero interferire, se accidentalmente ingeriti dai bovini domestici, con le prove tubercoliniche intradermiche, dimostrando l'assenza di interferenze (Jones *et al.*, 2016).

Appendice. Risultati degli esami svolti dal 2010 presso i laboratori dell'IZSAM

In Abruzzo, come in altre regioni italiane, è stato registrato negli ultimi decenni un sensibile incremento della densità e dell'espansione degli areali di distribuzione di alcune specie selvatiche con conseguente crescente sovrapposizione con le attività antropiche. Al fine di comprendere il potenziale coinvolgimento di alcuni ungulati selvatici nel ciclo di trasmissione della tubercolosi bovina, nelle province non ufficialmente indenni dall'infezione è stato elaborato un protocollo di monitoraggio sanitario da applicare in sala necroscopica ed in laboratorio sugli ungulati selvatici conferiti presso l'IZSAM. Per ogni campione è stato richiesto di fornire, mediante la compilazione di un modulo conferimento campioni, un set di metadati utile per successive analisi.

Dal 2010 ad Agosto 2017 sono stati esaminati per *Mycobacterium spp.*, 815 ungulati selvatici, di cui 431 cinghiali, 253 caprioli, 111 cervi e 20 camosci appenninici. Circa l'80% degli animali esaminati provenivano dalla provincia de L'Aquila. I micobatteri isolati sono stati identificati mediante PCR e PCR-RFLP. Di tutti gli animali testati solo due cinghiali sono risultati positivi, in uno è stato isolato il *Mycobacterium avium* (2017) e nell'altro il *Mycobacterium kumamotoense* (2015).

Bibliografia

1. Aranaz A, de Juan L, Montero N, Sanchez C, Galka M, Delso C, Álvarez J, Romero B, Bezos J, Vela AI, Briones V, Mateos A, Domínguez L: Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *J Clin Microbiol* 2004, 42:2602-2608.
2. Barasona JA, Torres MJ, Aznar J, Gortazar C, Vicente J: DNA detection reveals *Mycobacterium tuberculosis* Complex shedding routes in its wildlife reservoir the Eurasian wild boar. *Transbound Emerg Dis.* 2015
3. Barbier E, Rochelet M, Gal L, Boschioli ML, Hartmann A (2017) Impact of temperature and soil type on *Mycobacterium bovis* survival in the environment. *PLoS ONE* 12(4)
4. Buddle BM, Aldwell FE, Skinner MA, de Lisle GW, Denis M, Vordermeier HM, et al. Effect of oral vaccination of cattle with lipid-formulated BCG on immune responses and protection against bovine tuberculosis. *Vaccine* 2005; 23:3581±9
5. Begun M, Newall AT, Marks GB, Wood JG (2013) Contact Tracing of Tuberculosis: A Systematic Review of Transmission Modelling Studies. *PLoS ONE* 8(9):e72470
6. Che' Amat A, González-Barrío D, Ortiz JA, Díez-Delgado I, Boadella M, Barasona JA, et al. Testing Eurasian wild boar piglets for serum antibodies against *Mycobacterium bovis*. *Prev Vet Med.* 2015;121:93–8
7. Fine AE, Bolin Ca, Gardiner JC, Kaneene JB. A study of the persistence of *Mycobacterium bovis* in the environment under natural weather conditions in Michigan, USA. *Vet Med Int.* 2011; 2011:765430
8. Garrido JM, Sevilla IA, Beltran-Beck B, Minguijon E, Ballesteros C, Galindo RC, et al.: Protection against tuberculosis in Eurasian wild boar vaccinated with heat-inactivated *Mycobacterium bovis*. *PloS one* 2011
9. Ghodbane Ramzi, Mba Medie Felix, Lepidi Hubert, Nappez Claude and Drancourt Michel: Long-term survival of tuberculosis complex mycobacteria in soil. *Microbiology* (2014), 160, 496–501

10. Gormley E, NöÅ Bhuachalla D, O’Keeffe J, Murphy D, Aldwell FE, Fitzsimons T, et al. (2017) Oral Vaccination of Free-Living Badgers (*Melesmeles*) with Bacille Calmette GueÅrin (BCG) Vaccine Confers Protection against Tuberculosis. *PLoS ONE* 12(1).
12. Gortázar C, Ferroglio E, Hofle U, Frolich K, Vicente J: Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective. *Eur J Wildl Res* 2007, 53:241-256
13. Gortazar C, Delahay RJ, Mcdonald RA, Boadella M, Wilson GJ, Gavier-Widen D, et al. The status of tuberculosis in European wild mammals. *Mammal Rev.* 2012;42:193–206
14. Gortazar C, Beltrán-Beck B, Garrido JM, Aranaz A, Sevilla IA, Boadella M, Lyashchenko KP, Galindo RC, Montoro V, Domínguez L, Juste R, and de la Fuent. Oral re-vaccination of Eurasian wild boar with *Mycobacterium bovis* BCG yields a strong protective response against challenge with a field strain. *BMC Veterinary Research* 2014, 10:96
15. Gowtage S, Williams GA, Henderson R, Aylett P, MacMorran D, Palmer S, Robertson A, Lesellier S, Carter SP, Chambers MA. Testing of a palatable bait and compatible vaccine carrier for the oral vaccination of European badgers (*Meles meles*) against tuberculosis. *Vaccine.* 2017 Feb 7;35(6):987-992
16. Jackson R, Lisle GWD, Morris RS. A study of the environmental survival of *Mycobacterium bovis* on a farm in New Zealand. *N Z Vet J.* 1995:346±52
17. Jones GJ, Steinbach S, Sevilla IA, Garrido JM, Juste R, Vordermeier HM: Oral vaccination of cattle with heat inactivated *Mycobacterium bovis* does not compromise bovine TB diagnostic tests. *Vet Immunol Immunopathol.* 2016 Dec;182:85-88
18. Kaneene J. B., Bruning-Fann C. S., Granger L. M., Miller R., and Porter-Spalding B. A., “Environmental and farm management factors associated with tuberculosis on cattle farms in northeastern Michigan,” *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 2002. vol. 221, no. 6, pp. 837–842
19. Keuling O, Baubet E, Duscher A, Ebert C, Fischer C, Monaco A, et al. Mortality rates of wild boar *Sus scrofa* L. in central Europe. *Eur J Wildl Res.* 2013;59:805–14
20. López V, González-Barrío D, Lima-Barbero JF, Ortiz JA, Domínguez L, Juste R, Garrido JM, Sevilla IA, Alberdi P, de la Fuente J, Gortázar C: Oral administration of heat-inactivated *Mycobacterium bovis* reduces the response of farmed red deer to avian and bovine tuberculin. *Vet Immunol Immunopathol.* 2016 Apr;172:21-5
21. Naranjo V, Gortazar C, Vicente J, de la Fuente J: Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Vet Microbiol* 2008, 127:1-9
22. Nol P, Palmer MV, Waters WR, Aldwell FE, Buddle BM, Triantis JM, et al. Efficacy of oral and parenteral routes of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin vaccination against experimental bovine tuberculosis in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): a feasibility study. *J Wild Dis* 2008; 44:247±59
23. Palmer MV. *Mycobacterium bovis*: characteristics of wildlife reservoir hosts. *Transbound Emerg Dis.* 2013; 60:1±13
24. Payne A, Boschioli ML, Gueneau E, Moyen JL, Rambaud T et al. (2012) Bovine tuberculosis in “Eurasian” badgers (*Meles meles*) in France. *Eur J Wildl Res:* 1-9
25. Richomme C, Boadella M, Courcoul A, Durand B, Drapeau A, et al. (2013) Exposure of Wild Boar to *Mycobacterium tuberculosis* Complex in France since 2000 Is Consistent with the Distribution of Bovine Tuberculosis Outbreaks in Cattle. *PLoS ONE* 8(10)
26. Santos N, Galdes M, Afonso A, Almeida V, Correia-Neves M (2010) Diagnosis of Tuberculosis in the Wild Boar (*Sus scrofa*): A Comparison of Methods Applicable to Hunter-Harvested Animals. *PLoS ONE* 5(9): e12663
27. Tait P, Saunders C, Nugent G, Rutherford P. . Valuing conservation benefits of disease control in wildlife: A choice experiment approach to bovine tuberculosis management in New Zealand’s native e forests. 2017] *Environ Manage* Mar 15;189:142-149
28. Tanner M, Michel AL. Investigation of the viability of *M. bovis* under different environmental conditions in the Kruger National Park. *Onderstepoort J Vet Res.* 1999; 66(3):185±90
29. Thakur A., Sharma M., Katoch V.C., Dhar P., Katoch R.C. (2012) Detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* from Cattle: Possible Public Health Relevance *Indian J Microbiol;* 52(2):289–291
30. Vicente J, Barasona JA, Acevedo P, Ruiz-Fons JF, Boadella M, Diez-Delgado I, et al. Temporal trend of tuberculosis in wild ungulates from Mediterranean Spain. *Transbound Emerg Dis.* 2013;60(Suppl 1):92–103
31. Zanetti S, Bua A, Molicotti P, Delogu G, Mura A, Ortu S and Sechi L A:

- Identification of mycobacterial infections in wild boars in northern Sardinia, Italy; *Acta Veterinaria Hungarica* 56 (2), pp. 145–152 (2008)
32. Young Jamie S. , Gormley Eamonn , and Wellington Elizabeth M. H. :Molecular Detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium bovis* BCG (Pasteur) in *SoilAppl Environ Microbiol.* 2005 Apr; 71(4): 1946–1952
 33. World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO Report 2011. Geneva: The Organization; 2011.

--

A cura di:

Antonio Maitino

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"