

STUDIO EPIDEMIOLOGICO SULL'INFEZIONE DA *MYCOBACTERIUM SPP.* NEI CINGHIALI DELLA REGIONE PIEMONTE

EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF *MYCOBACTERIUM SPP.* INFECTION IN WILD BOAR OF PIEDMONT REGION

FRINE ELEONORA SCAGLIONE*, DAVIDE GRANDE*, SERENA ROBOTTO**,
RICCARDO ORUSA**, EZIO FERROGLIO*, ENRICO BOLLO*

* *Università degli Studi di Torino, Facoltà di Medicina Veterinaria*

** *Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta*

Parole chiave: Tubercolosi, cinghiale, *Mycobacterium spp.*

Key words: Tuberculosis, wild boar, *Mycobacterium spp.*

Riassunto. Negli anni 2007-2008 sono state eseguite le necropsie di n°168 cinghiali pervenuti alla Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Torino.

Tra questi soggetti ne sono stati selezionati 63 dei quali sono stati prelevati i linfonodi sottomandibolari. I campioni con lesioni-simil tubercolari all'esame anatomico patologico sono stati inviati all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (IZS) per la ricerca di *Mycobacterium spp.*

Quattro campioni sono risultati positivi all'isolamento e all'identificazione su base genetica di *Mycobacterium spp.*, di questi solamente due sono risultati positivi per la ricerca di DNA di *Mycobacterium tuberculosis complex* mediante Heminsted-PCR. L'identificazione su base genetica ha dato esito positivo per *Mycobacterium spp.* per tutti e quattro i casi. Un solo campione è risultato positivo per *Mycobacterium avium*.

Scopo di questo contributo è di fornire un aggiornamento per gli anni 2007-2008 sull'incidenza della tubercolosi del cinghiale nella Regione Piemonte.

Abstract. A survey in the years 2007-2008 in Piedmont Region was carried out to evaluate the spread of the infection of *Mycobacterium spp.* in wild boar (*Sus scrofa*).

One hundred sixty-eight wild boar were necropsied and gross tuberculous-like lesions were detected in 9 subjects.

Histopathological findings in 4 cases showed the typical tuberculous lesions characterized by a necrotic core, surrounded by a mixed population of inflammatory cells and separated from the normal parenchyma by a peripheral fibrous capsule.

All the samples with gross lesions were analysed. Isolates were obtained from 4 samples for *Mycobacterium spp.* culture and identification. Only 2 cases were positive in Heminsted-PCR for *Mycobacterium tuberculosis complex*. Only one case was positive for *Mycobacterium avium*.

INTRODUZIONE

La tubercolosi, malattia ubiquitaria, è stata segnalata per la prima volta nel cinghiale all'inizio degli anni '30 del secolo scorso in Germania (Kindinger, 1934). Successivi studi hanno confermato la presenza dell'infezione anche nell'ex URSS (Starodinova, 1974), Bosnia-Erzego-

vina (Ivetic e Sudaric, 1987), Slovacchia (Kalenski, 1992), Germania (Kurtze, 1961; Schultz *et al.*, 1992), Australia (Letts, 1964; Corner *et al.*, 1981; McInerney *et al.*, 1995), Nuova Zelanda (Ekdhal *et al.*, 1970; Collins *et al.*, 1988), Hawaii (Essey *et al.*, 1983), California (Allison, 1967) ed Italia (Mignone *et al.*, 1991; Biolatti *et al.*, 1992; Mignone *et al.*, 1996; Ferroglio e Rossi, 1996).

Il monitoraggio della tubercolosi negli animali selvatici è importante sia per i potenziali effetti che può avere su alcune popolazioni di animali selvatici, sia per le conseguenze che i serbatoi selvatici di micobatteri possono avere nei confronti degli animali allevati e dell'uomo.

Lo studio della diffusione della tubercolosi nel cinghiale è pertanto utile in quanto tale specie può svolgere il ruolo di reservoir e quindi di possibile fonte di contagio per i bovini al pascolo.

Scopo di questo contributo è di fornire un aggiornamento per gli anni 2007-2008 sulla diffusione della tubercolosi del cinghiale nella Regione Piemonte.

MATERIALI E METODI

Negli anni 2007-2008 sono state eseguite le necrosopie di n°168 cinghiali pervenuti alla Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Torino nell'ambito della convenzione attuata con la Regione Piemonte per la razionalizzazione ed integrazione delle attività di raccolta e smaltimento degli animali selvatici morti o oggetto di interventi di contenimento. Gli animali esaminati avevano un'età compresa tra 2 mesi e 5 anni. L'80% dei cinghiali è pervenuto alla Facoltà di Medicina Veterinaria in seguito ad investimento stradale, l'1% a causa di sequestri giudiziari per bracconaggio, la restante parte per ritrovamento casuale da parte del personale di vigilanza sul territorio piemontese.

Gli animali provenivano dalle province di Torino (n°60), Alessandria (n°48), Novara (n°11), Biella (n°6) e Cuneo (n°6). 37 soggetti sono invece giunti non accompagnati da verbali e pertanto non è stato possibile risalire al luogo di ritrovamento (Fig.1).

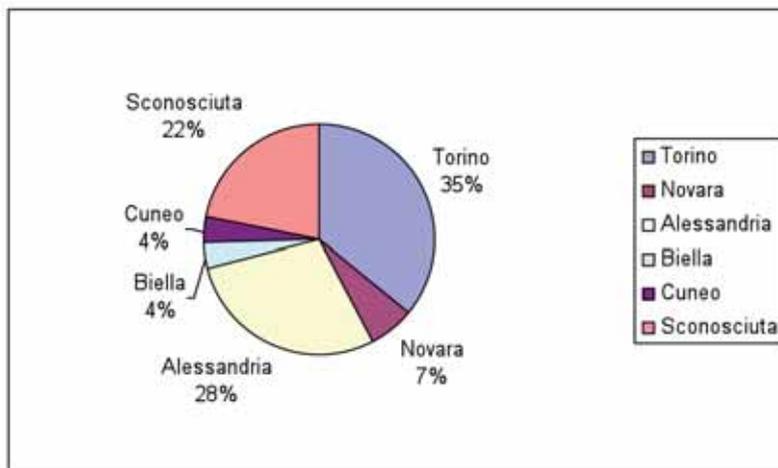


Fig. 1: Province di provenienza dei cinghiali.

Fig. 1: District of origin of wild boar.

Tra questi soggetti ne sono stati selezionati 63 (pari al 37,5%) dai quali sono stati prelevati i linfonodi sottomandibolari. I campioni con lesioni-simil tubercolari all'esame anatomico patologico sono stati inviati all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (IZS) per la ricerca di *Mycobacterium* spp.

Il campionamento è stato eseguito in maniera casuale in 54 soggetti. Nei restanti 9 soggetti erano invece state riscontrate lesioni simil-tubercolari a carico dei linfonodi stessi, dei polmoni e, in un caso, a livello paravertebrale cervicale.

I linfonodi sottomandibolari con assenza di lesioni sono stati prelevati ed immediatamente congelati per l'invio all'IZS.

Presso l'IZS sono state eseguite prove di isolamento ed identificazione, di ricerca di DNA di *Mycobacterium tuberculosis* complex mediante Heminsted-PCR e l'identificazione su base genetica di *Mycobacterium*.

Nei 9 casi in cui è stato possibile individuare lesioni riferibili a tubercolosi è stata prelevata anche un'aliquota che è stata fissata in formalina tamponata al 10%.

I tessuti sono poi stati disidratati con una serie di passaggi in soluzioni di etanolo a concentrazioni crescenti fino all'etanolo 100% e quindi in xilolo. In seguito ad inclusione in paraffina, da ciascun campione sono state tagliate al microtomo a slitta (Leica Microsystems, Wetzlar, Germania) sezioni dello spessore di 4-5µm. Le sezioni, per la successiva colorazione, sono state sparaffinate, colorate con Ematossilina-Eosina ed esaminate al microscopio ottico. E' stata inoltre eseguita la colorazione *Ziehl-Nielsen* per microorganismi acido-alcol resistenti.

RISULTATI

Quattro dei nove campioni inviati all'IZS per la presenza di lesioni simil-tubercolari sono risultati positivi all'isolamento e all'identificazione di *Mycobacterium* spp; di questi solamente due sono risultati positivi per la ricerca di DNA di *Mycobacterium tuberculosis* complex mediante Heminsted-PCR. L'identificazione su base genetica ha dato esito positivo per tutti e quattro i casi per *Mycobacterium* spp. Un solo caso è risultato positivo per *Mycobacterium avium*.



Fig. 2: Granuloma tubercolare in sede paravertebrale cervicale.
Fig. 2: Cervical paravertebral granuloma caused by *Mycobacterium* spp.

Tra i soggetti positivi uno aveva una età di 6-8 mesi, due soggetti 15-18 mesi ed un soggetto un'età superiore a 3 anni. Di questi, 3 provenivano dalla provincia di Torino e uno dalla provincia di Novara.

All'esame macroscopico va rilevato l'interessante riscontro di un granuloma tubercolare in sede paravertebrale cervicale (Fig. 2)

All'esame istologico sono stati osservati quadri compatibili con tubercolosi: lesioni granulomatose caratterizzate da necrosi, calcificazione e reazione epitelioidica con presenza di cellule giganti.

La colorazione *Ziehl-Nielsen* non ha permesso di evidenziare la presenza dei micobatteri.

Una lesione simil-tubercolare, negativa alla ricerca per micobatteri, è risultata positiva per *Burkholderia cepacia*.

DISCUSSIONE

Su 168 cinghiali, solo 9 (pari al 5,4%) presentavano lesioni simil-tubercolari e di questi solo 4 casi (2,4%) sono risultati positivi per *Mycobacterium* spp.

Le lesioni riscontrabili nei suini e nei suidi selvatici possono avere localizzazioni diverse a seconda della porta d'ingresso del microorganismo. La maggior parte di tali lesioni si osserva a livello dei linfonodi mandibolari e retro-faringei (a seguito di infezione per via digerente), meno frequenti sono quelle dei linfonodi bronchiali e mediastinici (infezione per via respiratoria). Granulomi tubercolari a livello delle ossa, ed in particolar modo a livello vertebrale, sono invece relativamente frequenti durante la fase della generalizzazione ematogena. (Marcato, 2002)

Paragonando i metodi di indagine utilizzati è importante sottolineare che l'osservazione in sede necroscopica delle lesioni riveste un ruolo importante per individuare soggetti potenzialmente affetti da tubercolosi. La colorazione di *Ziehl-Nielsen*, sebbene poco costosa, (Zanella *et al.*, 2008) è poco sensibile, mentre la ricerca del DNA di *Mycobacterium tuberculosis* complex mediante Heminsted-PCR è una metodica sensibile e specifica, sebbene più costosa. Nonostante ciò, Hènault *et al.* (2006) hanno dimostrato che la metodica PCR per la ricerca di tubercolosi negli animali selvatici è del 18,5% meno sensibile rispetto all'esame colturale e all'isolamento.

Sebbene le percentuali di positività per *Mycobacterium* spp. siano molto basse in Regione Piemonte, continua ad essere importante il monitoraggio degli animali selvatici per chiarirne la diffusione, monitorare il trend della malattia nel tempo nei cinghiali e per chiarire il loro ruolo epidemiologico nei confronti degli altri animali selvatici, degli animali allevati e dell'uomo (Zanella *et al.*, 2008).

Studi condotti in Spagna hanno dimostrato l'importanza della ricerca di tubercolosi nei cinghiali poiché capaci di mantenere l'infezione e pertanto in grado di trasmettere la malattia ad altre specie, svolgendo quindi il ruolo di reservoir selvatico. Appare pertanto evidente la necessità di un accurato controllo della presenza di tale infezione nelle popolazioni di cinghiali nel quadro delle misure di profilassi ed eradicazione della malattia (Naranjo, 2008)

Bibliografia

- Allison, M.M. (1967) "Annual report", Calif. District U.S. Bur. Sport Fish. Wildl. Div.
- Biolatti B., Bollo E., Mignone W., Caramelli M., Schröder C. (1992) "Tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*) in Liguria (Italy)" In: Erkrankungen der Zootiere. Verhandlungsbericht des 34 Internationalen Symposium über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere, Santander-Spain 1992, 55-59.
- Co D.O., Hogan L.H., Kim S.I., Sandor M. (2004) "*Mycobacterial granulomas*: keys to a long-lasting host-pathogen relationship." Clin. Immunol. 13, 130-6.
- Collins D.M., Gabric D.M., De Lisle G.W. (1988) "*Typing of Mycobacterium bovis* isolates from cattle and other animals in the same locality." New Zealand Veterinary Journal, 36, 45-46.
- Corner L.A., Barrett R.H., Lepper A.W.D., Lewis V., Pearson C.W. (1981) "A survey of mycobacteriosis of feral pigs in the Northern Territory." Australian Veterinary Journal, 57, 537-542.
- Ekdahl M.O., Smith B.L., Money D.F.L. (1970) "Tuberculosis in some wild and feral animals in New Zealand." New Zealand Veterinary Journal, 18, 44-45.
- Essey M.A., Stallknecht D.E., Himes E.M., Harris S.K. (1983) "Follow-up survey of feral swine for *Mycobacterium bovis* infection on the Hawaiian island of Molokai." Proceedings of the U.S. Animal Health Association Meeting, 87, 589-595.
- Ferroglio E.M., Rossi L. (1996) "Brevi note informative sulla tubercolosi nel cinghiale ed in altri mammiferi selvatici." Medicina Veterinaria Preventiva, 12, 8-9.
- Henault S., Karoui C., Boschioli M. L. (2006) "A PCR based method for tuberculosis detection in wildlife." In: Vannier P., Espeseth D. "New diagnostic technology: Applications in animal health biological and controls. Developments in biologicals." Karger, Basel, Switzerland, 123-132.
- Ivetic V., Sudaric F. (1987) "Pearly tuberculosis ("perlsucht") in wild boar" Veterinaria Yugoslavia, 36, 121-125.
- Kalensky P. (1992) "Isolation of Mycobacteria from wild boar" Veterinarstvi, 42, 346-347.
- Kindinger H. (1934) "Tuberculose beim Wild in freier Wildbahn." Vet. Med. Dissertation Giessen.
- Kurtze H. (1961) "Reinfektion tuberkulosefreier Rinderbestände durch tuberkulöses Wild" Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 68, 442-443.
- Letts G.A. (1964) "Feral animals in the Northern Territory." Australian Veterinary Journal, 40, 84-88.

Marcato P.S. (2002) "Sistema respiratorio" In: Marcato P.S. "Patologia sistematica Veterinaria", 1° ed., Bologna, Edagricole, 569-571.

Martín-Hernando M.P., Höfle U., Vicente J., Ruiz-Fons F., Vidal D., Barral M., Garrido J.M., De la Fuente J., Gortazar C. (2007) "Lesions associated with *Mycobacterium tuberculosis* complex infection in the European wild boar." Tuberculosis 87, (4), 360-7.

McInerney J., Small K.J., Caley P. (1995) "Prevalence of *Mycobacterium bovis* infection in feral pigs in the Northern Territory." Australian Veterinary Journal, 72, 448-451.

Mignone W., Ercolini C., Fisichella S., Dondo A. (1991) "Osservazioni preliminari su alcuni episodi di tubercolosi nel cinghiale (*Sus scrofa*)." Selezione Veterinaria, 32, 843-849.

Mignone W., Dini V., Bollo E., Ganduglia S., Ferraro G., Becchi R., Poggi M. (1996) "Monitoraggio della tubercolosi nei cinghiali a vita libera: esperienze in provincia di Imperia e di Savona" In: Atti del Convegno nazionale: Ecopatologia della fauna selvatica (Bologna 15-17 dicembre 1994), Supplemento alle Ricerche di Biologia della Selvaggina, XXIV, 619-629.

Naranjo V., Gortazar C., Vicente J., de la Fuente J. (2008) "Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex." Veterinary Microbiology 127, (1-2), 1-9.

Schultz G., Deuter H., Dedek J. (1992) "Zur Vorkommen von *Mycobacterium bovis* Infektionen beim freilebenden Schwarzwild Erkrankungen der Zootiere". In: Verhandlungsbereich des 34 Internationalen Symposium über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere, Santander-Spain, 51-53.

Starodinova A.K. (1974) "Lokalisation und Erscheinungsformen der Tuberkulose bei Wildschweinen" in: Briedermann L. "Schwarzwild" Neumann-Neudamm, 539.

Zanella G., Durand B., Hars J., Moutou F., Garin-Bastuji B., Duvauchelle A., Fermé M., Karoui C., Boschioli M.L. (2008) "*Mycobacterium bovis* in wildlife in France" Journal of Wildlife Diseases, 44, (1), 99-108.