

MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX IN SUINI: INDAGINI PRELIMINARI IN PIEMONTE

MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX IN SWINE: PRELIMINARY INVESTIGATIONS IN PIEDMONT REGION

FERRARO G.¹, ZOPPI S.¹, DONDO A.¹, TRON S.², BURZIO G.², GIACOMINO F.²,
GORIA M.¹

¹Istituto Zooprofilattico Prof. del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino;

²Servizio Veterinario ASL TO3, Area B

Parole chiave: *Mycobacterium avium* subspecies *avium*, *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis*, suini

Key words: *Mycobacterium avium* subspecies *avium*, *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis*, swine

RIASSUNTO: L'infezione sostenuta da *M. avium* complex (MAC) nel suino è spesso un problema sottovalutato, che può ripercuotersi sulla produzione, causando consistenti perdite economiche.

Il presente lavoro si è posto come obiettivo, attraverso l'isolamento, l'identificazione e la caratterizzazione dei ceppi di *M. avium* a partire da campioni provenienti da un macello piemontese di suini nel periodo 2008-2012, di fornire un contributo alla comprensione sia dell'eziologia della tubercolosi da MAC nel suino sia del ruolo di questo animale come serbatoio e potenziale vettore di zoonosi nella realtà suinicola piemontese.

A partire da 94 campioni di linfonodi e organi di suini prelevati al macello, sono stati isolati 35 ceppi che, con il supporto di tecniche di biologia molecolare, sono stati identificati come *M. avium*: di questi 24 sono stati caratterizzati come *M. avium* subsp. *avium* e 11 come *M. avium* subsp. *hominissuis*.

Il ricorso a tecniche di caratterizzazione biomolecolare dei ceppi rende più accurata la diagnosi di laboratorio al fine di valutare l'impatto delle infezioni da *M. avium* negli allevamenti suini in Piemonte per porre le basi per uno studio epidemiologico più approfondito.

ABSTRACT: In swine *M. avium complex* (MAC) infection can lead to severe economic losses for retention at slaughter and nevertheless this infection is often underestimated.

This work is aimed to make a preliminary evaluation of the impact of MAC infection in pig livestock in Piedmont, in order to sketch out, through the isolation, identification and characterization of *M. avium* strains isolated from 2008 to 2012, the pig role as a reservoir and potential zoonosis vector.

Ninety-four samples of lymph nodes and organs collected from pigs at slaughter were analysed. In total, 35 strains were isolated and identified as *M. avium* by mean of biomolecular techniques: 24 of them were characterized as *M. avium* subsp. *avium* and 11 as *M. avium* subsp. *hominissuis*.

Biomolecular characterization techniques are important diagnostic tools that makes more accurate the laboratory diagnosis when the impact of infections by *M. avium* pig farms is assessing and, in the observed context, it could lay the foundations for further studies to better define aetiology and epidemiology of MAC infection in pigs in Piedmont region.

Nell'eziologia della tubercolosi nel suino rientrano frequentemente MAC e soprattutto negli ultimi anni in Europa è stato registrato un aumento di prevalenza di lesioni sostenute da *M. avium* nei suini regolarmente macellati (Domingos *et al.*, 2009).

L'infezione da MAC nell'allevamento suino è fortemente correlata ad un risvolto di tipo economico a causa delle perdite dovute allo scarto di organi o della carcassa *in toto* durante le fasi di macellazione (Matlova L. *et al.*, 2005; Alvarez J. *et al.*, 2011).

Di recente è stato attribuito un ruolo attivo di questi microrganismi come causa di aborto (Eisenberg *et al.*, 2012) e come agenti di potenziale zoonosi, in quanto è stata riconosciuta una loro correlazione con i ceppi isolati da forme morbose in pazienti umani immunocompromessi (Tirkkonen *et al.*, 2010; Falkinham J.O. III, 2009).

Il ciclo dell'infezione è in prevalenza di tipo oro-fecale: i soggetti infetti sono in grado di eliminare i batteri con le feci dopo 20 – 30 giorni dal contagio, mentre le lesioni linfonodali, localizzate in sede faringea, cervicale e mesenterica, compaiono tre o quattro mesi dopo l'infezione (Thorel *et al.*, 2001).

Generalmente l'infezione nel suino è caratterizzata dall'assenza di sintomi clinici specifici per cui l'unico supporto diagnostico valido è rappresentato dagli esami *post mortem*. Solitamente le lesioni rilevabili sono limitate ai linfonodi retrofaringei, cervicali e mesenterici: appaiono di aspetto variabile, di colore bianco - giallastro, con dimensioni che possono essere ridotte (Agdestein *et al.* 2012) fino ad includere l'intero linfonodo; possono manifestarsi una o più aree caseose con margini non completamente definiti, può essere presente fibrosi diffusa, mentre raramente si osservano calcificazione e formazione di una capsula.

La generalizzazione dell'infezione è poco frequente nei suini e si osserva principalmente in soggetti di 4 – 8 settimane di età: in tal caso si rilevano lesioni miliari disseminate in sede epatica con eventuale coinvolgimento di milza e polmone; in alcuni casi si osservano lesioni in sede renale (Thorel 1998; Varello *et al.*, 2012).

A livello polmonare sono possibili lesioni miliari, traslucide, di pochi millimetri come, nel caso di infezioni da *M. avium* sierotipo 2, lesioni di tipo caseoso simil-tubercolari.

Nell'ambito di *M. avium* complex (MAC) sono incluse due specie geneticamente distinte: *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare* (Legrand *et al.*, 2000) i quali non sono differenziabili sotto il profilo morfologico, culturale, biochimico e perciò sono riunite in un unico "complex", che comprende 28 sierotipi.

I sierotipi da 1 a 6, da 8 a 11 e 21 sono attribuiti a *M. avium* ed i sierotipi 7, da 12 a 20 e da 22 a 28 sono classificati come *M. intracellulare* (Pate *et al.*, 2005).

Grazie all'ausilio della biologia molecolare è stato possibile dimostrare la grande variabilità dei ceppi prima considerati sierotipi di *M. avium* e riclassificarli come sottospecie: *M. avium* subsp. *sylvaticum* (MAS), *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), *M. avium* subsp. *avium* (MAA) e *M. avium* subsp. *hominissuis* (MAH) (Pate *et al.*, 2009; Turenne *et al.*, 2007).

MAA agente causale della tubercolosi aviaria, è un patogeno stretto dei volatili, di difficile riscontro al di fuori dell'organismo ospitante ma, pur trovando nei volatili gli ospiti di elezione, può infettare altre specie, tra cui suino e uomo. Solitamente l'infezione in specie diverse dai volatili si manifesta con lesioni a carico di singoli distretti linfonodali principalmente afferenti al tratto digerente ed è solitamente a carattere autolimitante (Hibiya K. *et al.*, 2008).

I ceppi MAA isolati dai volatili sono attribuiti ai sierotipi 1, 2, 3 (Pate M. *et al.*, 2005).

MAH è un patogeno opportunista con larga diffusione ambientale. Ha un ampio spettro d'ospite ed è frequentemente causa di infezione per i suini, portando ad una significativa perdita economica negli allevamenti (Radomski *et al.*, 2010; Matlova *et al.*, 2005) in quanto causa di aborti ed infezioni urogenitali (Eisenberg T. *et al.*, 2012; Wellenberg *et al.*, 2010).

Gli stipiti appartenenti a MAH denotano una notevole variabilità dal punto di vista molecolare

e sono di più frequente riscontro nelle patologie dell'uomo e del suino rispetto a MAA (Pavlik *et al.*, 2008; Pate *et al.*, 2009). Nell'uomo le infezioni si verificano in persone HIV immunocompromesse, persone immunocompetenti con subalterne patologie polmonari, ed in bambini con fibrosi cistica (Shin *et al.*, 2010; Alvarez *et al.*, 2008; Field 2006; Henry *et al.*, 2004).

I sierotipi attribuiti a MAH sono: 4-6, 8-11 e 21 (Pate *et al.* 2005).

La discriminazione delle sottospecie MAA e MAH è di fondamentale importanza per un'accurata diagnosi e per le indagini epidemiologiche.

Tale differenziazione si basa sull'identificazione differenziale, mediante metodiche di biologia molecolare, di elementi di inserzione specifici, quali *IS901* e *IS1245*, presenti nel genoma (Kunze *et al.* 1992; Guerrero *et al.*, 1995).

In MAA sono presenti entrambi gli elementi di inserzione (*IS1245* presente in singola copia, *IS901* presente da 2 a 17 copie). MAH non possiede l'elemento di inserzione *IS901*, ma al contrario *IS1245* è presente in numerose copie (7-27) (Slana *et al.*, 2010).

Questo studio è stato condotto per determinare la diffusione di MAC per quanto riguarda le due sottospecie di interesse, MAA e MAH, in suini regolarmente macellati fare valutazioni preliminari dal punto di vista della sanità pubblica.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Il campionamento è stato eseguito presso un grande macello piemontese di suini nel periodo compreso tra il 2008 e il 2012.

A seguire la visita ispettiva ordinaria *post mortem*, sulle carcasse in cui erano presenti lesioni granulomatose riconducibili a micobatteriosi, veniva predisposto il prelievo dei campioni di linfonodi da sottoporre agli accertamenti di laboratorio. Nei casi in cui le lesioni erano generalizzate e pertanto presenti su altri organi oltre alla più comune localizzazione a carico dei linfonodi della testa, veniva predisposto un campionamento supplementare sugli organi sede di lesione.

Nel presente lavoro sono stati prelevati e analizzati complessivamente 94 linfonodi retrofaringei e sottomandibolari di suini regolarmente macellati e provenienti da 42 aziende dislocate sul territorio piemontese, come rappresentato in tabella n. 1.

I campioni venivano successivamente inviati refrigerati ai laboratori diagnostici dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta della Sede di Torino.

Esame anatomico-patologico

Gli organi prelevati in sede di macellazione sono stati sottoposti in laboratorio ad esame anatomico-patologico per valutare la presenza di lesioni tubercolari ed appurarne tipologia, estensione e localizzazione.

Esame culturale per Micobatteri

Porzioni degli organi e/o dei linfonodi, previa eliminazione di tessuto adiposo e connettivale, sono stati sminuzzati e omogeneizzati mediante Stomacher® (VWR-Pbi, Milano); l'omogenato è stato quindi suddiviso in due aliquote sottoposte rispettivamente a due differenti metodi di decontaminazione con NaOH 2% e HPC 1.5%. Dalle aliquote decontaminate e centrifugate a 3000 g per 20 minuti è stato recuperato il pellet. La semina del campione è avvenuta su una batteria di terreni selettivi, composta da Stonebrink, Lowenstein Jensen Medium, Lowenstein Jensen senza glicerina. I terreni inoculati sono stati incubati in termostato per un periodo di 10 giorni in atmosfera arricchita con 5% CO₂ a 37°C e per i

successivi 50 giorni a 37°C in aerofilia.

In presenza di colonie sospette a partire dalla seconda-terza settimana di incubazione, si è proceduto alla colorazione di Ziehl-Neelsen e in caso di positività, queste sono state sottoposte a identificazione per via molecolare.

Identificazione molecolare mediante Multiplex PCR

Il DNA delle colonie isolate è stato estratto mediante trattamento termico e poi sottoposto a Multiplex PCR, variazione “in house” del metodo descritto da Kulski *et al.* (1995) e da Sinclair *et al.* (1995), per l’identificazione molecolare differenziale di diverse specie di micobatteri (*Mycobacterium spp.*, *M. tb complex*, *M. tuberculosis* ed *M. avium*). La multiplex PCR utilizzata si basa sull’amplificazione simultanea di quattro differenti bersagli molecolari: il 16S rRNA, in una zona di 1030 paia di basi specifica per *Mycobacterium spp.*, l’elemento di inserzione IS986, in una porzione di 245 paia di basi caratteristica dei micobatteri appartenenti al *M. tb complex*, il gene mtp40, specifico per il *M. tuberculosis*, in una regione di 396 paia di basi, e una porzione di circa 180 paia di basi dell’rRNA 16S, distintiva per *M. avium*.

Caratterizzazione molecolare mediante amplificazione dell’elemento IS901 e IS1245

Le colonie identificate come *M. avium* sono state successivamente sottoposte ad analisi per la presenza della regione IS901 (143 paia di basi) e della regione IS1245 (472 paia di basi) al fine della differenziazione di sottospecie in *M. avium* subsp. *avium* e *M. avium* subsp. *hominissuis*.

Sono state così allestite due simplex PCR mediate rispettivamente dai primers IS901se (5’-GTGATCAAGCACCTTCGGAA-3’) e IS901pe (5’-GCTGCGAGTAGCTTGATGAG-3’) secondo quanto descritto da Slana I. *et al.* (2010) e dai primers IS1245 P1 (5’-GCCGCCGAAACGATCTAC-3’) e IS1245 P2 (5’-AGGTGCCGTCGAGGAAGAC-3’) secondo quanto descritto da Guerrero *et al.* (1995). I risultati dell’amplificazione sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2%.

RISULTATI

Tutti i campioni esaminati (n. 94) presentavano lesioni caseo-calcifiche a carico dei linfonodi della testa, ad eccezione di 24 casi in cui erano presenti principalmente lesioni caseose generalizzate a carico di polmoni, fegato e linfonodi associati (n=22) e a carico dei reni (n=2). In 35 casi si è ottenuto l’isolamento di colonie riconducibili a *Mycobacterium spp.*

L’identificazione molecolare dei ceppi isolati nel presente lavoro è riportata in tabella 2.

Provincia	Comune	ID AZIENDA	Campioni prelevati
TORINO	BALDISSERO TORINESE (TO)	6	2
	CAMBIANO (TO)	9	3
	FRASSINETO PO (TO)	15	1
	PINEROLO (TO)	42	2
	RIVA PRESSO CHIERI (TO)	36	1
	VIGONE (TO)	41	3
ASTI	VALFENERA (AT)	21	1
BIELLA	CERRIONE (BI)	5	2
NOVARA	NOVARA (NO)	20	1
	SAN PIETRO MOZZO (NO)	23	1
VERCELLI	BORGIO D'ALE (VC)	4	1
CUNEO	BARGE (CN)	1	1
		2	2
		3	5
	BUSCA (CN)	7	1
	CARAGLIO (CN)	8	4
	CAVALLERLEONE (CN)	10	2
	CENTALLO (CN)	11	1
		12	2
	CEVA (CN)	13	4
	CHERASCO (CN)	14	4
	FAULE (CN)	16	3
	FOSSANO (CN)	17	2
		18	1
		19	3
	MONDOVI' (CN)	22	1
	MOROZZO (CN)	24	2
	MURELLO (CN)	25	1
		26	3
	RACCONIGI (CN)	27	5
		28	4
		29	6
		30	2
	ROCCA DE' BALDI (CN)	31	3
	SALUZZO (CN)	32	2
		33	2
	SAVIGLIANO (CN)	34	3
		35	1
	SCALENGHE (CN)	40	1
	SCARNAFIGI (CN)	37	3
		38	1
VOTTIGNASCO (CN)	39	1	
Totali			94

TABELLA 1: Distribuzione dei campioni esaminati secondo provincia e comune di provenienza dell'allevamento

TABLE 1: Distribution of examined samples, grouped for site (province /town) and herds

Provincia	Comune	ID AZIENDA	Campioni prelevati	MAH	MAA	NEG
TORINO	BALDISSERO TORINESE (TO)	6	2			2
	CAMBIANO (TO)	9	3			3
	FRASSINETO PO (TO)	15	1			1
	PINEROLO (TO)	42	2			2
	RIVA PRESSO CHIERI (TO)	36	1	1		
	VIGONE (TO)	41	3	3		
ASTI	VALFENERA (AT)	21	1			1
BIELLA	CERRIONE (BI)	5	2	1		1
NOVARA	NOVARA (NO)	20	1			1
	SAN PIETRO MOSEZZO (NO)	23	1			1
VERCELLI	BORGO D'ALE (VC)	4	1	1		
CUNEO	BARGE (CN)	1	1			1
		2	2			2
		3	5			5
	BUSCA (CN)	7	1	1		
	CARAGLIO (CN)	8	4			4
	CAVALLERLEONE (CN)	10	2			2
	CENTALLO (CN)	11	1			1
		12	2			2
	CEVA (CN)	13	4			4
	CHERASCO (CN)	14	4		3	1
	FAULE (CN)	16	3	3		
	FOSSANO (CN)	17	2			2
		18	1			1
		19	3			3
	MONDOVI' (CN)	22	1			1
	MOROZZO (CN)	24	2			2
	MURELLO (CN)	25	1		1	
		26	3			3
	RACCONIGI (CN)	27	5		4	1
		28	4		4	
		29	6		6	
		30	2		2	
	ROCCA DE' BALDI (CN)	31	3			3
	SALUZZO (CN)	32	2			2
		33	2			2
	SAVIGLIANO (CN)	34	3			3
		35	1	1		
	SCALENGHE (CN)	40	1			1
	SCARNAFIGI (CN)	37	3		3	
		38	1		1	
VOTTIGNASCO (CN)	39	1			1	
Totali			94	11	24	59

TABELLA 2: rappresentazione dei risultati di campionamento, isolamento e identificazione molecolare dei ceppi suddivisi per provincia, comune e allevamento di origine.

TABLE 2: representation of the results of sampling, isolation and molecular identification of strains grouped by site (province / town) and herd.

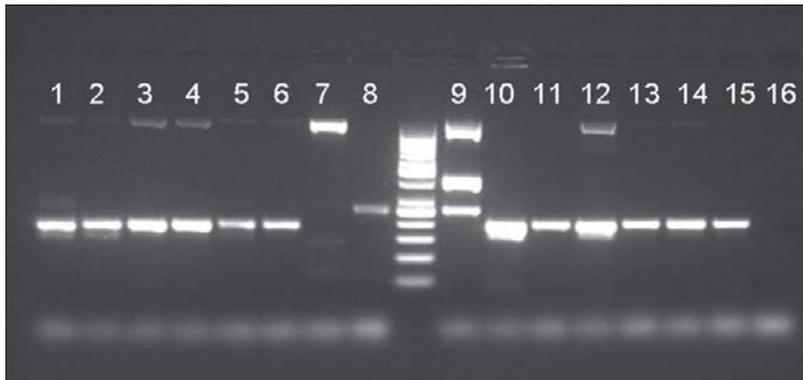


FIGURA 1: MULTIPLEX PCR. In posizione 1-6, 11-15: ceppi identificati come *M. avium*; in posizione 7-10 ceppi di riferimento (controlli positivi): in posizione 7 *M. spp*; in posizione 8 *M. Tb cx*, in posizione 9 *M. tuberculosis*, in posizione 10 *M. avium*. Marker di peso molecolare 50-1000 bp

FIGURE 1: MULTIPLEX PCR. Lane 1-6, 11-15: isolated strains identified as *M. avium*; lane 7-10 reference strains (Positive controls): lane 7 *M. spp*; lane 8 *M. Tb cx*, lane 9 *M. tuberculosis*, lane 10 *M. avium*. Molecular size marker 50-1000 bp.

I ceppi identificati come *M. avium* sono stati sottoposti ad ulteriori analisi mediante simplex PCR per la differenziazione delle sottospecie.

La caratterizzazione molecolare ha evidenziato la presenza di 24 ceppi *M. avium* subsp. *avium*, caratterizzati dalla presenza di entrambi gli elementi di inserzione *IS1245*, *IS901*; mentre 11 colonie sono state identificate come *M. avium* subsp. *hominissuis*, caratterizzate dall'assenza dell'elemento di inserzione *IS901* e dalla presenza della sequenza *IS1245*.

Nelle figure 2a-b viene rappresentato l'esito della simplex PCR per *IS901* e *IS1245* di alcuni dei ceppi isolati nel corso del presente studio.

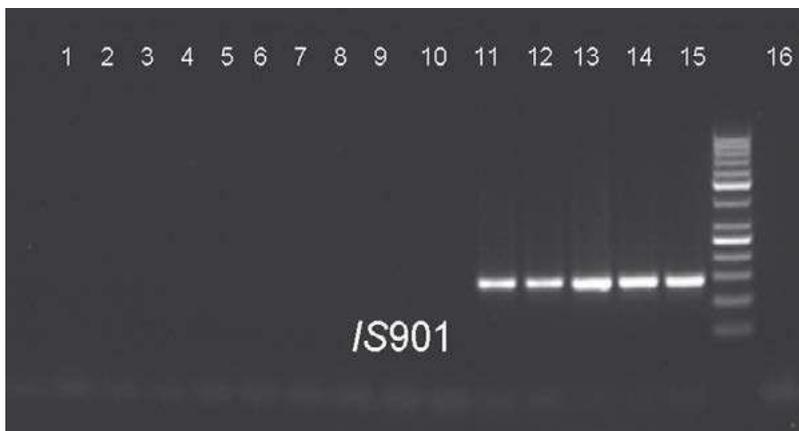


FIGURA 2A: SIMPLEX PCR IS901. In posizione 1-9, 12-15 ceppi isolati in esame per la caratterizzazione di sottospecie su base molecolare; in posizione 10 ceppo di riferimento

M. avium subsp. *hominissuis* (Controllo positivo); in posizione 11 ceppo di riferimento *M. avium* subsp. *avium* (Controllo positivo); in posizione 16 controllo reagenti negativo (Acqua ultrapura sterile). Marker di peso molecolare 50-1000 bp.

FIGURE 2A: SIMPLEX PCR IS901. Lane 1-9, 12-15 isolated strains under investigation for molecular subspecies identification; lane 10 *M. avium* subsp. *hominissuis* reference strain (Positive control); lane 11 *M. avium* subsp. *avium* reference strain (Positive control); lane 16 control reagents negative (sterile ultrapure water). Molecular size marker 50-1000 bp.

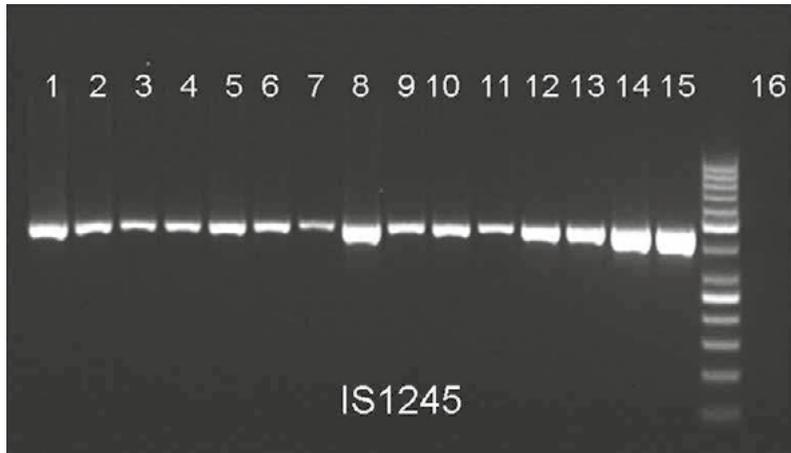


FIGURA 2B: SIMPLEX PCR IS1245: In posizione 1-9, 12-15 ceppi isolati in esame per la caratterizzazione di sottospecie su base molecolare; in posizione 10 ceppo di riferimento *M. avium* subsp. *hominissuis* (Controllo positivo); in posizione 11 ceppo di riferimento *M. avium* subsp. *avium* (Controllo positivo); in posizione 16 controllo reagenti negativo (Acqua ultrapura sterile). Marker di peso molecolare 50-1000 bp. Sulla base del pattern di presenza dei due marcatori *IS901* e *IS1245* i ceppi rappresentati in foto 2a e 2b sono stati classificati come appartenenti a *M. avium* subsp. *homonissuis* (Posizione 1-9) e appartenenti a *M. avium* subsp. *avium* (Posizione 12-15).

FIGURE 2B: SIMPLEX PCR IS1245. Lane 1-9, 12-15 isolated strains under investigation for molecular subspecies identification; lane 10 reference strain *M. avium* subsp. *hominissuis* (Positive control); lane 11 reference strain *M. avium* subsp. *avium* (Positive control); lane 16 control reagents negative (sterile ultrapure water). Molecular size marker 50-1000 bp. According to the pattern of presence of the two markers *IS901* and *IS1245*, the strains represented in pictures 2a and 2b have been classified respectively as belonging to *M. avium* subsp. *homonissuis* (Lane 1-9), *M. avium* subsp. *avium* (Lane 12-15).

DISCUSSIONE

Ad oggi la situazione degli allevamenti suini in Italia nei confronti dell'infezione da MAC non è del tutto nota.

Lo studio preliminare condotto sui ceppi di *M. avium* isolati negli allevamenti suini in Piemonte, permette di pianificare future indagini epidemiologiche, utili a ricostruire le dinamiche di diffusione dell'infezione da MAC negli allevamenti piemontesi, e finalizzata al monitoraggio di questa malattia spesso sottovalutata ma che può provocare perdite

economiche e limitazioni nel commercio con Paesi extraeuropei.

Le metodiche di biologia molecolare hanno consentito l'identificazione di ceppi di MAC isolati nel periodo 2008-2012.

Dall'analisi dei dati raccolti risulta evidente la diffusione dei ceppi appartenenti a MAC negli allevamenti suini del territorio piemontese correlate principalmente a lesioni confinate a livello dei linfonodi della testa. Questo rilievo è però da riferire, nella nostra casistica, principalmente a *M. avium* subsp. *hominissuis*.

A differenza di quanto osservato in altri studi (Pavlik *et al.*, 2005; Pate *et al.*, 2009), in particolare è emerso nella nostra realtà un cluster d'infezione da *M. avium* subsp. *avium*, caratterizzato da lesioni generalizzate e alta frequenza di scarti alla macellazione.

Questo lavoro evidenzia l'importanza nel ricorrere alle tecniche di biologia molecolare quale supporto alle tradizionali tecniche di isolamento e identificazione dell'agente eziologico MAC e per le successive indagini epidemiologiche che spesso permettono di individuare e monitorare in tempi estremamente ridotti la diffusione dei ceppi nei territori.

Le metodiche biomolecolari possono essere anche utilizzate con successo nello studio di episodi di trasmissione dell'agente infettivo tra animale e uomo e viceversa, eventi molto rari ma comunque possibili per la natura zoonotica dell'agente eziologico MAC, in particolare di MAH.

Per una più efficace applicazione in campo epidemiologico, potrebbe essere utile implementare il grado di differenziazione all'interno della stessa sottospecie affiancando alle tecniche descritte nel presente lavoro altre tecniche biomolecolari come l'analisi del polimorfismo VNTR.

CONCLUSIONI

L'infezione da micobatteri nell'allevamento suino è segnalato a livello internazionale (Thorel *et al.*, 2001).

Generalmente nei suini le infezioni sostenute da MAC causano patologie localizzate piuttosto che generalizzate, con lesioni ristrette principalmente ai linfonodi della testa, del collo e/o linfonodi mesenterici (Thorel *et al.*, 2001), tuttavia in alcuni casi sono stati segnalati gravi episodi di forme generalizzate (Zoppi *et al.*, 2012).

Dal momento che le carni provenienti da animali con infezioni generalizzate devono essere distrutte, l'infezione da MAC nel suino può causare grandi perdite economiche agli allevatori. Con il presente lavoro è stato possibile porre in evidenza in via preliminare la presenza di MAC negli allevamenti suini del territorio piemontese.

L'isolamento culturale dell'agente eziologico e la successiva caratterizzazione molecolare degli isolati possono agevolare l'iter diagnostico e nel contempo porre le basi per uno studio epidemiologico retrospettivo approfondito, utile per contrastare queste infezioni attraverso l'individuazione dei potenziali fattori di rischio e dell'origine dei focolai.

BIBLIOGRAFIA

- Agdestein A., Johansen T.B., Kolbiornsen O., Jorgensen A., Djonne B., Olsen I. (2012), "A comparative study of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* in experimentally infected pigs". BMC Vet Res. 8-11.
- Alvarez J., Garcia I. G., Aranaz A., Bezos J., Romero. B., Juan, Mateos A., Gomes-Mampaso, Dominguez L. (2008). "Genetic diversity of *Mycobacterium avium* isolates recovered from clinical samples and from environment: molecular characterization for diagnostic purposes". J. Clin. Microbiol. 46, 1246-1251.
- Domingos M., Amado A., Botelho A. (2009) "IS1245 RFLP analysis of strains of

Mycobacterium avium subspecies *hominissuis* isolated from pigs with tuberculosis lymphadenitis in Portugal". *Vet Rec.* 164 (4), 116-120.

– Eisenberg T., Volmer R., Eskens U., Moser I., Nessler A., Sauerwald C., Seeger H., Klewer Fromentin-K., Mobius P. (2012). "Outbreak of reproductive disorders and mycobacteriosis in swine associated with a single strain of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis*". *Vet Microbiol.* 159 (1-2), 69-76.

– Falkinham J.O. III (2009). "Surrounded by *Mycobacteria*: nontuberculous mycobacteria in the human environment". *J Appl Microbiol.* 107, 356-367.

– Field S. K., Cowie R. L. (2006). "Lung disease due to the more common nontuberculous mycobacteria". *Chest.* 129, 1653-1672.

– Guerrero C., Bernasconi C., Burki D., Bodmer T., Telenti A. (1995). "A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness". *J Clin. Microbiol.* 33(2), 304–307.

– Henry M.T., Inamdar L., Riordain D., Schasweiger M., Watson J. P. (2004). "Non tuberculous mycobacteria in non HIV patients: epidemiology, treatment and response". *Eur. Respir J.* 23, 741-746.

– Hibiya K., Kasumi Y., Sugawara I., Fujita J. (2008). "Histopathological classification of systemic *Mycobacterium avium* complex infections in slaughtered domestic pigs". *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases (CIMI).* 31, 347 -366.

– Kulski J.K., Khinsoe C., Pryce T., Christiansen K. (1995). "Use of a Multiplex PCR to detect and identify *M. avium* and *M. intracellulare* in blood culture fluid of AIDS patients" *J Clin Microbiol.* 33(8), 668-674.

– Kunze Z. M., Portaels F., McFadden J. J. (1992). "Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of Insertion Sequence IS901". *Journal of Clinical Microbiology.* 2366-2372.

– Legrand E., Sola C., Rastogi N. (2000). "*Mycobacterium avium*-intracellulare complex: phenotypic and genotypic markers and the molecular basis for interspecies transmission". *Bull. Soc. Pathol Exot.* 93(3), 182-192.

– Matlova L., Dvorska L., Ayele W.Y., Bartos M., Amemori T., Pavlik I. (2005). "Distribution of *Mycobacterium avium* complex isolates in tissue samples of pigs fed peat naturally contaminated with *Mycobacteria* as a supplement". *Journal of Clinical Microbiology.* 43, 261-1268.

– Pate M., Ocepek M., Zolnir-Dovc M., Krt B. (2005). "Characterization of genetic diversity of animal and human *Mycobacterium avium* strains by IS1245- IS1311 spacer typing". *Vet. Met.* 50 (4), 175-180.

– Pate M., Moravkova M., Krt B., Pavlik I., Ocepek M. (2009). "Genotyping of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* isolates from domestic animals in Slovenia by IS901 RFLP". *Vet. Med.* 54 (6), 270-279.

– Pavlik I., Jahn P., Moravkova M., Matlova L., Trml F., Cizek A., Nesnalova E., Dvorska -Bartosova L., Halouzks R. (2008). "Lung tuberculosis in a horse caused by *Mycobacterium avium* subspecies *avium* of serotype 2: a case report". *Vet. Med.* 53, 111-116.

– Radomski N., Thibault V.C., Karoui C., Cruze K., Cochard T., Gutierrez C., Supply P., Biet F., Boschirolu M.L. (2010). "Determination of genotypic diversity of *Mycobacterium avium* Subspecies from human and animal origins by Mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat and IS1311 Restriction fragment length polymorphism typing methods". *Journal of Clinical Microbiology.* 48 (4), 1026-1034.

– Shin S.J., Lee B. S., Koh W.J., Manning E.J.B., Anklam K., Sreevatsan S., Lambrecht R., Collins M.T. (2010). "Efficient differentiation of *Mycobacterium avium* complex species and

- subspecies by use of five- target multiplex PCR”. *Journal of Clinical Microbiology*. 48 (11), 4057-4062.
- Sinclair K., Challans J.A., Kazwala R.R., Hewinson R.G., Sharp J.M. (1995) “A multiplex polymerase chain reaction for distinguishing *Mycobacterium tuberculosis* from *Mycobacterium tuberculosis* complex” *Mol Cell Probes* 9(5), 291–295.
 - Slana I., Kaevska M., Kralik P., Horvathova A., Pavlik I. (2010). “Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *M. a. hominissuis* in artificially infected pigs studied by culture and IS901 and IS1245 quantitative real time PCR”. *Vet Microbiol.* 144, 437–448.
 - Thorel M. (1998). “Application du debusquement enzymatique a l’isolement des mycobacteries de l’environnement”. *C.R. Acad. Agric. Fr.* 84, 89-100.
 - Thorel M.F., Huchzermeyer H.F., Michel A.L. (2001) “*Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infection in mammals”. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 20 (1), 204-218.
 - Tirkkonen T., Pakarinen J., Rintala E., Ali- Vehmas T., Marttila H., Peltoniemi O., Makinen J. (2010) “Comparison of Variable-Number Tandem-Repeat Markers typing and IS1245 Restriction Fragment length Polymorphism fingerprinting of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* from human and porcine origins”. *Acta Vet Scand.* 52-21.
 - Turenne C. Y., Wallace R. J., Behr M. A. (2007). “*Mycobacterium avium* in the postgenomic era”. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:, 205-229.
 - Varello, K., Dondo, A., Richelmi, G., Bozzetta, E., Perosino, M., D’Errico, V., Gorla, M., Giorgi, I., Zoppi, S. (2012). “Lesioni renali da *Mycobacterium avium* subspecies *avium* nel suino: aspetti anatomo-istopatologicic e significato diagnostico”. XIV Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., Sorrento (NA) 24-26 Ottobre 2012, 506-509.
 - Wellenberg G.J., de Haas P.E., van Ingen J., van Soelingen D., Visser I.J. (2010). “Multiple strains of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* infections associated with aborted fetuses and wasting in pigs”. *Veterinary Record.* 167, 451- 454.
 - Zoppi S., Garrone A., Rossi F., Ferraro G., Sona B., Giorgi I., Gorla M., Tron S., D’Errico V., Alborali G., Zanoni M.G., Dondo A., Baricco G. (2012) “*Mycobacterium avium* subsp. *avium*: forme generalizzate di tubercolosi aviare in un allevamento suino a gestione multi sito”. *Atti Convegno SIPAS.* 38, 142-151.