

EPIDEMIOLOGIA DELLE MICOBATTERIOSI NEL CINGHIALE IN LIGURIA

Dini V.*, Ferroglio E.**, Serraino***, Mignone W.°, Sanguinetti V.***, Bollo E.°, Rossi L.**

*USL 2 Savonese. Savona

**Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia. Università di Torino

***Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale. Università di Bologna

°Istituto Zooprofilattico del Piemonte Liguria e Val d'Aosta. Sez. di Imperia

°°Dipartimento di Patologia Animale. Università di Torino.

Riassunto - Al fine di chiarire l'epidemiologia della tubercolosi nel cinghiale sono stati esaminati i linfonodi sottomandibolari e retrofaringei di 2488 capi abbattuti durante il 1995 nelle province di Imperia e Savona. Lesioni riconducibili ad infezione tubercolare sono state individuate in 300 animali (12.1%). Inoltre, 113 campioni su 257 analizzati con una sonda DNA (Gen-Probe *Mycobacterium tuberculosis* complex Test) sono risultati positivi per micobatteri appartenenti al *M. tuberculosis* complex. L'isolamento in coltura è stato tentato dai linfonodi di 125 cinghiali esaminati nel periodo 1993/95 e da 16 bovini provenienti dall'area di studio. Isolati sono stati ottenuti in 27 casi dal cinghiale (16 *M.bovis*, 6 *M.avium*, 1 *M.tuberculosis* e 4 ceppi di micobatteri a rapida crescita) ed in 15 casi dai bovini (tutti *M.bovis*). Gli isolati sono stati analizzati con la metodica dello spoligotyping che ha permesso di evidenziare come un unico spoligotipo prevalga nella maggior parte dei cinghiali e dei bovini esaminati. Sulla base dei dati raccolti (localizzazione delle lesioni, limitate ai linfonodi della testa; quadro istopatologico; risultati dell'isolamento e dello spoligotyping; situazione sanitaria del bestiame domestico), il cinghiale non sembra avere un ruolo importante nel mantenimento dell'infezione da *M.bovis* nell'area di studio.

Abstract - Epidemiology of Mycobacteriosis in wild boar in Liguria (Northern Italy). During the 1995 hunting season, submandibular and retropharyngeal lymph nodes of 2488 wild boars (*Sus scrofa*) were examined for tubercular lesions and these were found in 300 animals (12.1%). A macroscopic and histologic description of TB lesions was given for 261 and 179 animals respectively. *Mycobacterium tuberculosis* complex and *M. avium* complex tests, performed on 246 lesioned lymph nodes, reacted positively in 112 (43.6%) and 11 (4.3%) cases respectively. Isolates were obtained from 27 wild boars and 16 cows slaughtered because of positivity at the tuberculin skin test. All cow and 16 wild boar isolates were classified as *M. bovis*. Isolates were analyzed with Spoligotyping. Results show that one strain is most common in both wild boars and cows. Based on the macroscopic and microscopic aspect of lesions, their localization, isolation and spoligotyping results and the sanitary situation of livestock, wild boars do not seem to be important in maintaining and spreading *M.bovis* in the study area.

J. Mt. Ecol., 7 (Suppl.): 145 - 153

1. Introduzione

Riportata per la prima volta all'inizio degli anni '30 in Germania (Kindinger, 1934), la tubercolosi nel cinghiale, includendo nel termine "cinghiale" anche le varie popolazioni di "feral pigs" (Briedermann, 1986), è stata successivamente segnalata in UdSSR (Starodinova, 1974), Bosnia-Erzegovina (Ivetic & 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, 1970; Collins, 1988), Hawaii (Essey *et al.*, 1983), California (Allison, 1967; Smith, 1997) ed Italia (Mignone *et al.*, 1991; Biolatti *et al.*, 1992; Mignone *et al.*, 1996; Ferroglio e Rossi, 1996). Mentre alcune segnalazioni riguardano casi sporadici (Kindinger, 1934; Kurtze, 1961; Ivetic & Sudaric, 1987; Kalenski, 1992; McInerney *et al.*, 1995), spesso non supportati dall'isolamento

dell'agente eziologico (Kurtze, 1961; Ivetic & Sudaric, 1987), altre si riferiscono a situazioni in cui la patologia, caratterizzata da prevalenze talora superiori al 10%, pare essere endemica nelle popolazioni di cinghiali (Letts, 1964; Corner *et al.*, 1981; Essey *et al.*, 1983; Schultz *et al.*, 1992; Mignone *et al.*, 1996; Smith, *com. pers.* 1997). È questo il caso verificatosi in Liguria dove la prevalenza della tubercolosi nel cinghiale pare assestata su valori piuttosto elevati (15% circa) anche in aree in cui è in fase di eradicazione nei domestici e non paiono esservi altri serbatoi dell'infezione (Mignone *et al.*, 1991; Biolatti *et al.*, 1992; Mignone *et al.*, 1996).

Scopo di questo contributo è fornire una sintesi delle esperienze da noi maturate, a partire dal 1995, sull'eziologia ed epidemiologia della tubercolosi nei cinghiali delle province di Savona ed Imperia.

2. Materiali e metodi

2.1. Raccolta campioni

La raccolta dei campioni ha interessato capi prelevati durante l'attività venatoria nella stagione 1995; per la tipizzazione dei micobatteri, tuttavia, sono stati utilizzati anche campioni raccolti nelle annate 1993 e 1994 (3 campioni per annata). I campioni sono stati prelevati in parte presso punti di controllo della selvaggina (qui erano disponibili sia la carcassa che i visceri) e in parte presso altre strutture, quali i presidi sanitari di Savona, Carcare, Imperia e Pieve di Teco e l'Istituto Zooprofilattico di Imperia (dove venivano presentate le sole teste).

Considerato che nel cinghiale, come in altre specie selvatiche, i linfonodi della testa rappresentano la sede di più facile riscontro delle lesioni da micobatteri (Itoh *et al.*, 1992; Griffin & Buchan, 1994; Nolan & Wilesmith, 1994; Lugton *et al.*, 1997; Smith, 1997), si è sempre provveduto ad un esame ispettivo dei linfonodi retrofaringei e sottomandibolari. In caso di rinvenimento di una lesione sospetta il linfonodo veniva suddiviso in due aliquote di cui una, destinata alla diagnosi mediante sonde genetiche, veniva congelata e l'altra, destinata all'istopatologia, veniva posta in formalina tampognata al 10%. Il linfonodo controlaterale non veniva aperto, onde evitare problemi di cross-contaminazione, ma stoccato e impiegato per l'isolamento. Quando possibile, per ogni capo che presentava lesioni sospette venivano registrate la provenienza, il sesso e l'età secondo Briedermann (1986).

2.2. Istopatologia

Per quanto riguarda l'indagine istopatologica, i campioni di tessuto, fissati in formalina tampognata al 10%, sono stati inclusi in paraffina. Per ogni campione sono state eseguite almeno 4 microsezioni, che sono state colorate con ematossilina-eosina ed esaminate al microscopio ottico. I tessuti mineralizzati, reperto non infrequente vista la patologia, sono stati decalcificati in acido cloridrico. In base alle caratteristiche istopatologiche le lesioni sono state classificate nelle seguenti categorie:

nodulo tubercolare sclero-caseoso = T;
 nodulo tubercolare sclero-caseo-calcifico = TC;
 nodulo tubercolare sclero-caseo-calcifico con fibrosi = TCF;
 nodulo tubercolare sclero-caseoso con fibrosi = TF.

2.3. Sonde genetiche

Sono stati utilizzati due test: il *Mycobacterium*

tuberculosis complex Direct Test – MTD, in grado di evidenziare la presenza di micobatteri del *Mycobacterium tuberculosis* complex e l'Accuprobe *Mycobacterium avium* complex Test, in grado di evidenziare la presenza di micobatteri del *Mycobacterium avium* complex. Diversi studi clinici confermano l'alta sensibilità (93%) e specificità (98%) dei test sia per quanto riguarda l'MTD, 93% e 98% rispettivamente (Abe *et al.*, 1993; Jonas *et al.*, 1993; LoRocco *et al.*, 1993; Bodmar *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1994; Pfyffer *et al.*, 1994), sia per l'Accuprobe *Mycobacterium avium* complex Test (Drake *et al.*, 1987; Gonzales e Hanna, 1987; Kiehn e Edwards, 1987; Musial *et al.*, 1988; Salto *et al.*, 1989).

Sebbene questi kit siano nati per l'identificazione rapida dei micobatteri partendo dalle colture, l'MTD si è rivelato valido anche per la ricerca dei micobatteri in campioni di tessuto (Ehlers *et al.*, 1993; Bollo *et al.*, 1998).

Per l'esecuzione delle prove con sonde genetiche, dai campioni scongelati è stata prelevata una porzione di circa 2 g di tessuto lesionato. Questa aliquota, triturrata in una capsula Petri, è stata trasferita in un sacchetto con eguale volume di acqua distillata e omogeneizzata per 120 sec. (Stomacher 80 Laboratory Blender, Seward Medical, London, U.K.). Il fluido risultante, raccolto in tubi Falcon da 15ml, è stato decontaminato con NaOH/SDS, centrifugato a 2500 rpm, ed il sedimento ripreso con acqua distillata sterile. In una provetta di lisi si aggiungono a 50 µl del sedimento ripreso 200 µl Specimen Dilution Buffer e si sonica a 65 °C per 15 minuti. 50 ml del lisato vengono poi incubati a 95 °C per 15 minuti con 25 µl dell'Amplification Reagent, e successivamente per 2 ore a 42 °C con 25 µl dell'Enzyme reagent (questo passaggio permette di amplificare uno specifico segmento di RNA). Al termine delle 2 ore la reazione viene bloccata con il Terminator Reagent lasciato agire per 10 minuti alla stessa temperatura. A questo punto si aggiungono 100 µl del Probe reagent (la sonda-DNA legata con composto chemiluminescente), e si incuba per 15 minuti a 60 °C; successivamente si aggiungono 300 µl di Selection reagent (in grado di legarsi alle sonde-DNA non ibridizzate) e dopo 10 minuti a 60°C si passa alla lettura al chemiluminometro.

I risultati, espressi in RLU (Relative Light Units), vengono considerati positivi se superano il valore soglia di 30.000 RLU.

Per quanto riguarda l'esecuzione dell'Accuprobe test, che per ragioni economiche è stato

effettuato solo su campioni negativi al MTD test, la procedura si presenta ridotta in quanto non è presente la fase di amplificazione. Per questa prova il processo di decontaminazione è simile a quello descritto per il test MTD. A 100 ml del campione decontaminato vengono aggiunti, 100 µl di Lysis reagent e 100 µl di Hybridization buffer, dopodiché le provette vengono sonicate per 15 minuti a 65 °C e incubate a 95°C per 10 minuti. Terminata questa fase (il cui scopo è liberare l'RNA batterico), 100 µl della soluzione vengono pipettati nelle provette in cui è presente la sonda DNA liofilizzata e si incuba per 15 minuti a 95 °C. Successivamente si aggiungono 300 µl di Selection reagent e dopo 5 minuti di incubazione a 60 °C si passa alla lettura al chemiluminometro. Come per il test precedente i risultati, espressi in RLU (Relative Light Units), vengono considerati positivi se superano il valore soglia di 30.000 RLU.

2.4. Isolamento

Sono stati messi in coltura 124 linfonodi di cinghiali, di cui 8 campioni prelevati nel 1993 e nel 1994 nella sola Provincia di Imperia, e i rimanenti prelevati nel 1995 sull'intera zona di studio. Inoltre sono stati esaminati linfonodi mediastinici provenienti da 16 bovini allevati in provincia di Imperia, inviati alla macellazione coatta in quanto positivi alla intradermoreazione per TB.

I campioni sono stati omogeneizzati con mortaio, sottoposti a procedura di decontaminazione con NaOH e centrifugati. Il surnatante è stato utilizzato sia per l'esecuzione dell'esame microscopico con la colorazione di Ziehl-Nielsen sia per l'esame colturale. Per l'esecuzione dell'esame microscopico un'ansata da 10 µl è stata stemperata su un vetrino portaoggetti, fissata a fiamma, colorata con la procedura standard per la colorazione di Ziehl-Nielsen. I vetrini sono stati successivamente esaminati osservando 100 campi per vetrino o fino al rinvenimento di microrganismi alcool-acido resistenti, con il microscopio ottico a 1000X.

Per l'esame colturale si è provveduto alla semina di 2 tubi per ognuno dei terreni di coltura utilizzati. In particolare, un'ansata di surnatante (10 µl) è stata seminata su 7H10 modificato mediante la sostituzione del glicerolo con piruvato di sodio (12g/l), su Lowenstein-Jensen e su Stonebrink. I tubi sono stati incubati a 37°C e controllati settimanalmente per 6 mesi, trascorsi i quali i campioni in cui non si era evidenziata alcuna crescita sono stati considerati

negativi. Le colonie cresciute nel frattempo sono state sottoposte a conferme tramite colorazione di Ziehl-Nielsen e quindi identificate seguendo le procedure standard.

2.5. Spoligotyping

Lo Spoligotyping (da spacer oligotyping) è una metodica di rilevamento e tipizzazione dei micobatteri del *M.tuberculosis* complex, basata sul polimorfismo del DNA presente in particolare tratto del cromosoma detto "Direct Repeat" (DR). Nel *M.bovis* BCG la regione DR consiste di sequenze ripetute di 36 paia di basi, intervallate da tratti di DNA non ripetitivo di 35-41 paia di basi. Il numero di copie della sequenza DR nel *M.bovis* BCG è di 49, ma esistono variazioni tra i vari strains appartenenti al *M.tuberculosis* complex.

Comparando le regioni DR di strains diversi, si osserva l'inserzione o la mancanza di sequenze ripetitive e non, e questo permette di caratterizzare lo strain in questione. Questo avviene attraverso l'amplificazione della regione con PCR, e la successiva ibridizzazione dei prodotti ottenuti con oligonucleotidi precedentemente legati in linee parallele su una membrana attivata di Biodyne C (reversed line blot). La perossidasi presente nella streptavidina catalizza una reazione con emissione di luce che viene evidenziata tramite autoradiografia della membrana.

Per le procedure operative della metodica si rimanda al protocollo di cui in Buschotzen *et al.* (1996).

Lo spoligotyping è stato condotto su 15 isolati di *M.bovis*, di cui 9 relativi a campioni prelevati nel 1995 e 6 relativi a campioni prelevati nel 1993 e nel 1994. E' stato inoltre condotto su 15 isolati di *M.bovis*, ottenuti da bovini allevati in provincia di Imperia. I patterns di ibridizzazione ottenuti sono stati comparati con il Gel Compare Software (Ver. 3.1).

3. Risultati

Per motivi di ordine contingente non tutti i campioni sono stati sottoposti alla totalità delle indagini. In Tabella 1 è riportato il numero di campioni analizzati con ciascuna delle metodiche adottate.

3.1. Anatomopatologia, Istopatologia, Sonde genetiche

Nel 1995, lesioni macroscopiche sono state osservate in 300 su 2488 capi controllati nelle province di Savona e Imperia. La prevalenza era del 12% (137 positivi su 1141 capi esaminati) in provincia di Imperia e del 12.1% (163

positivi su 1347 capi esaminati) in provincia di Savona. Per 261 dei 300 campioni è stata effettuata una classificazione macroscopica delle lesioni, risultate essere come da Tabella 2.

Per quanto riguarda la correlazione esistente tra prevalenza di lesioni, sesso ed età dei soggetti, i dati mostrano una correlazione significativa ($p < 0.0005$, $\chi^2 = 121.698$, g.l.=1) tra età dell'animale e presenza di lesioni, mentre non esiste alcuna differenza tra le prevalenze osservate nei maschi e nelle femmine (Tabella 3).

L'analisi con il test MTD è stata effettuata su 260 campioni, di cui 113 (43.5%) sono risultati positivi al *M.tuberculosis* complex. Per contro, solamente 11 dei 115 campioni analizzati con l'Accuprobe test sono risultati positivi per il *M.avium* complex (4.2%). Va ricordato come l'assenza di una fase di amplificazione renda questo test molto meno sensibile dell'MTD soprattutto su tessuto. A causa del numero limitato di positività, non è stata effettuata alcuna correlazione tra risultati dell'Accuprobe test e l'aspetto macroscopico ed istologico delle lesioni. Sono risultati positivi all'MTD il 59.6% dei campioni provenienti da Imperia ed il 25.8% di quelli provenienti da Savona. Questo porta ad una prevalenza nelle due aree di studio rispettivamente del 7.2% e 3.1%. Dette prevalenze appaiono significativamente diverse ($\chi^2 = 21.59$ $p < 0.00005$).

In Tabella 4 viene riportato il confronto tra aspetto macroscopico della lesione e positività al test MTD mentre il confronto tra aspetto istopatologico delle lesioni e positività al test MTD è

riportato in Tabella 5.

Per quanto riguarda la relazione esistente tra tipo di lesione istologica e positività al test MTD è stata rilevata una correlazione positiva tra positività al test MTD e progressione della lesione da nodulo tubercolare sclero-calcifico, a tubercolo necrotico-calcificato, a tubercolo fibro-necrotico, a tubercolo necrotico ($\chi^2 = 9.550$, $p < 0.05$, g.l = 3, OD = 1.00-0.39-0.30-0.14).

3.2. Isolamento

Dai 125 campioni di cinghiale sottoposti a coltura sono stati isolati 16 ceppi di *M.bovis*, 6 ceppi di *M.avium*, un ceppo di *M.tuberculosis* e 4 ceppi a rapida crescita, mentre in 15 dei 16 campioni bovini è stato isolato *M.bovis*.

Il tempo medio di isolamento di *M.bovis* è stato significativamente più alto nel cinghiale (80gg; con un range di 28-124 gg) rispetto al bovino (27 gg; con un range di 6-45 gg) ($t = 5.732$, g.l.= 29, $p < 0.0001$).

Per quanto riguarda la correlazione tra esami colturali e test MTD, in 8 casi entrambe le metodiche hanno dato esito positivo, in due casi l'isolamento è stato positivo e il test MTD negativo, in 34 casi l'isolamento è stato negativo e il test MTD positivo, ed in 40 casi entrambe le metodiche hanno dato esito negativo.

3.3. Spoligotyping

Dallo spoligotyping dei 15 campioni provenienti da cinghiale è emersa l'esistenza di 5 spoligotipi diversi, mentre dai 15 campioni provenienti da bovini sono stati identificati 4 spo-

Tab. 1 - Campioni analizzati con le varie metodiche

Capi esaminati	Capi con lesioni	Capi con descrizione macroscopica	Capi con descrizione istologica	Capi esaminati al test MTD	Capi esaminati al test Accuprobe
2488	300	261	179	260	115

Tab. 2 - Aspetto macroscopico delle lesioni linfonodali in 261 cinghiali abbattuti nelle province di Imperia e Savona. Le percentuali vengono riportate in parentesi.

	Purulento	Simil sarcomatoso	Caseoso necrotico	Calcificato	Totale
Nodulo singolo	0	1 (0.4%)	21 (8.0%)	29 (11.1%)	51 (19.5%)
Noduli multipli	4 (1.5%)	4 (1.5%)	30 (11.5%)	172 (65.9%)	210 (80.5%)
Totale	300 (1.5%)	261 (1.9%)	179 (19.5%)	260 (77.0%)	115

Tab. 3 - Frequenza delle lesioni tubercolari nelle diverse fasce di età.

Maschi			Classi di età	Femmine		
Esaminati	Positivi	Prevalenza		Esaminati	Positivi	Prevalenza
192	7	3.64%	< 1 anno	207	10	4.83%
174	31	17.81%	1-2 anni	227	42	18.50%
293	92	31.39%	>2 anni	294	101	34.35%
659	130	19.72%	Totale	728	153	21.01%

Tab. 4 - Confronto tra positività al test MTD e aspetto macroscopico delle lesioni (positivi /esaminati e percentuale) in 228 cinghiali delle province di Imperia e Savona.

	Nodulo singolo	Noduli multipli
Purulento	/	(25%)
Simil sarcomatoso	/	2/4 (50%)
Caseoso necrotico	2/16 (12.5%)	7/17 (41.2%)
Calcificato	5/15 (33.3%)	79/172 (45.9%)
Totale	7/31 (22.6%)	89/197 (45.2%)

Tab. 5 - Confronto tra positività al test MTD e aspetto istopatologico delle lesioni in 179 cinghiali delle province di Imperia e Savona.

	T	TF	TC	TCF	Totale
MTD +	20	5	35	26	86
MTD -	8	14	36	35	93
% casi +	71.4%	26.3%	49.3%	42.6%	179

T= nodulo tubercolare sclero-caseoso; TF= nodulo tubercolare sclero-caseoso con fibrosi;

TC= nodulo tubercolare sclero-caseo-calcifico; TCF= nodulo tubercolare sclero-caseo-calcifico con fibrosi.

ligotipi. Due terzi dei casi erano imputabili allo stesso spoligotipo presente sia nei bovini che nei cinghiali (11 e 9 casi rispettivamente), mentre per i restanti spoligotipi questi erano presenti o nei domestici o nel cinghiale. La variabilità di spoligotipi osservata lascia ipotizzare una ripetuta immissione di ceppi diversi di *M.bovis* nel tempo. Resta da chiarire se questo sia imputabile ad una circolazione di ceppi diversi di micobatteri all'interno della popolazione di cinghiali, a spostamenti di cinghiali infettatisi in aree esterne all'area di studio o ancora all'immissione di micobatteri da parte di bovini infetti con ceppi diversi.

4. Discussione

I risultati indicano, per l'area di studio, una prevalenza dell'infezione tubercolare del 5.2% in base al test MTD e del 12.1% in base al

reperto di lesioni macroscopiche. Analoghe discrepanze sono riportate in letteratura e, nel complesso, la conferma di infezione tubercolare sembra avvenire in meno (Letts, 1964; Schulz et al., 1992) o anche molto meno della metà dei cinghiali portatori di lesioni linfonodali (Corner et al., 1981, Essey et al., 1983; McInerney et al., 1995).

Anche nei suini domestici, la presenza di micobatteri appartenenti al *M.tuberculosis* complex è confermata solo in parte dei casi che presentano lesioni macroscopiche (Luke, 1958; Vasenius, 1965; Lesslie et al., 1968; Kleeberg & Nel, 1969; Thoen, 1975; Dey, 1986).

Nonostante il riscontro di focolai dovuti a *M.bovis* (Fichandler & Osborne., 1966) e a *M.africanum* (Alfredsen & Saxegaard, 1992) la maggior parte delle segnalazioni nel suino riguardano infezioni dovute a micobatteri

ambientali o appartenenti al MAIS complex (Lesslie *et al.*, 1968; Jorgensen *et al.*, 1972a, Jorgensen *et al.*, 1972b; Mitchell *et al.*, 1975; Thoen *et al.*, 1975; Thoen *et al.*, 1976; Songer *et al.*, 1980). Nei suini sarebbe quindi più corretto utilizzare il termine micobatteriosi in sostituzione di tubercolosi (Dey & Parham, 1993). Nel caso del presente contributo, la bassa sensibilità su tessuto del test Accuprobe ed il limitato numero di isolamenti non permettono né di valutare il significato di altri micobatteri, né di fare un confronto tra la tipologia delle lesioni causate da *M.bovis* e quelle dovute a micobatteri appartenenti al MAIS complex. Tuttavia, i dati bibliografici disponibili per il suino concordano nel giudicare macroscopicamente indifferenziabili le lesioni causate da *M. bovis* da quelle dovute ad altri micobatteri (Kleeberg & Nel, 1969; Ray, 1972; Dey, 1986).

Relativamente ad altri focolai noti di tubercolosi nel cinghiale, si riportano prevalenze che vanno dall'84% di lesioni e 31.1% di infezione riscontrate in Australia negli anni '60 (Letts, 1964) all'1.4% e 0.8% rispettivamente rilevati in Germania (Schulz *et al.*, 1992).

I nostri dati sono relativamente simili a quelli segnalati nelle Hawaii (Essey *et al.*, 1983) ed in Australia (Corner *et al.*, 1981). In particolare, i valori segnalati in quest'ultimo Paese, lesioni nel 23% dei capi e prevalenza dell'infezione del 4.9% (Corner *et al.*, 1981), appaiono assai prossimi a quanto rilevato in questa ricerca.

La frequenza delle lesioni macroscopiche è positivamente correlata all'età dei soggetti esaminati; al contrario, il numero dei soggetti positivi all'infezione tende a diminuire nella fascia di età dei soggetti maturi, tanto che 15 dei 16 ceppi di *M.bovis* isolati da cinghiali sono stati ottenuti da soggetti di età inferiore a 12 mesi. Questi risultati concordano con quelli ottenuti in precedenza da altri ricercatori, che hanno osservato come con l'aumento dell'età dei soggetti esaminati (lesioni sono già individuabili in soggetti di 4 mesi) aumentasse anche la prevalenza di animali con lesioni macroscopiche e diminuisse, allo stesso tempo, la frequenza di isolamenti colturali (Corner *et al.*, 1981). Il fatto che con il crescere dell'età aumentino le probabilità di contrarre l'infezione, sembra indicare che i cinghiali dell'area di studio sono continuamente esposti ai micobatteri. Studi recenti hanno mostrato la scarsa sopravvivenza dei micobatteri nell'ambiente (Jackson *et al.*, 1995) ma, in quelle circostanze, i micobatteri erano stati depositati sulla super-

ficie del terreno. Ben maggiore – fino a 2 anni – è la sopravvivenza dei micobatteri che, per varie cause, si trovano nel terreno a maggior profondità (Wray, 1975). Considerando che buona parte dell'alimentazione del cinghiale è data da componenti che vivono al di sotto del livello del suolo (Briedermann, 1986), si può immaginare come questa specie possa, durante il grufolamento, venire facilmente a contatto con micobatteri "sepolti" nel terreno.

Quanto alle modalità di circolazione di *M.bovis*, sembra poco sostenibile l'ipotesi di una sua trasmissione pseudo-verticale nell'ambito della popolazione di cinghiali. Se questa via fosse importante, dovremmo infatti attenderci una maggior frequenza di lesioni nei giovani al di sotto di 12 mesi. Anche l'eventualità di una trasmissione orizzontale appare poco probabile. Va infatti considerato che le femmine vivono in gruppi matriarcali fin dalla nascita, mentre i maschi vengono scacciati dal gruppo materno ad un anno e successivamente conducono vita solitaria (Briedermann, 1986). Supponendo una trasmissione orizzontale, si dovrebbe osservare una diversa prevalenza delle lesioni in maschi e femmine adulte, mentre invece le prevalenze osservate non differiscono significativamente fra i due sessi.

La drastica diminuzione degli isolamenti di micobatteri con il progredire dell'età dei cinghiali, fa supporre la capacità della specie di contrastare l'infezione e neutralizzare i micobatteri nelle lesioni (Corner *et al.*, 1981). A sostegno di questa ipotesi vi sarebbero i dati sperimentali forniti da studi condotti sul suino domestico che hanno mostrato come, in caso di infezione da *M.bovis* e da *M.avium*, questo ospite sia in grado di autosterilizzarsi (Luke, 1958; Ray *et al.*, 1972; Jorgensen, 1978; Dey, 1986). Anche la diminuzione di positività al test MTD nei tubercoli calcificati e con fibrosi (Tab.5) potrebbe ricondursi a processi di autosterilizzazione, che sono appunto caratterizzati dalla progressiva fibrosi delle lesioni (Ray *et al.*, 1972). L'assoluta rarità di quadri generalizzati (Mignone, com. pers.) conferma ulteriormente la resistenza di questa specie verso l'infezione da micobatteri (Corner *et al.*, 1981; McInerney *et al.*, 1995).

Alla differente prevalenza dell'infezione nei cinghiali delle due province oggetto di monitoraggio, corrisponde una diversa presenza dell'infezione nei bovini. Infatti, se l'eradicazione è ormai prossima in provincia di Savona (Dini, com. pers.), i dati relativi alla provincia di Imperia lasciano intendere una proporzione

tuttora rilevante di capi infetti (Famà, 1997). Lo stretto legame fra infezione tubercolare nei bovini e nei cinghiali risulta dall'analisi storica di dati pubblicati da ricercatori australiani. Emerge come, dagli anni '60 ad oggi, al controllo della tubercolosi nei bovini e nei bufali abbia fatto riscontro una diminuzione netta della patologia nei suidi selvatici. In questi suidi, si è infatti passati da una prevalenza iniziale del 31.1% (Letts, 1964) al 4.9% degli anni '70 (Corner et al., 1981) e allo 0.2% attuale (McInerney et al., 1995). Sull'importanza di fonti esterne per il mantenimento dell'infezione nei cinghiali concordano anche altri autori che si sono occupati del problema (Essey et al., 1983; Smith, 1997). Nel caso della nostra area di studio, l'esistenza di fonti di infezioni esterne alla popolazione di cinghiali sembra suggerita (anche se non dimostrata), dalla variabilità degli spoligotipi di *M. bovis* incontrati. Per quanto riguarda l'infezione da *M. tuberculosis* l'unica spiegazione plausibile parrebbe essere il contatto con materiale umano infetto, con il tramite eventuale di reflui fognatizi non trattati. Nel complesso, e in analogia con le conclusioni altri autori (Corner et al., 1981; McInerney et al., 1995; Smith, 1997), appare poco probabile l'ipotesi che il cinghiale rappresenti un reservoir silvestre dell'infezione tubercolare nell'area di studio. Maggiore è l'interesse che questo ospite merita come indicatore sensibile del livello di contaminazione ambientale da parte di micobatteri.

5. Ringraziamenti

Questa ricerca è stata eseguita con fondi della Regione Liguria, Assessorato alla Sanità e con fondi Interreg II.

Bibliografia

ABE C., HIRANO K., WADA M., KAZUMI Y., TAKAHASHI M., FUKASAWA Y., YOSHIMURA T., MIYAGI C. & GOTO S. (1993) - Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by PCR and Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 3270-3274

ALFREDSEN S. & SAXEGAARD F. (1992) - An outbreak of tuberculosis in pigs and cattle caused by *Mycobacterium africanum* *The Veterinary Record*, 131: 51-53.

ALLISON, M.M. (1967) - *Annual report*, Calif. District U.S. Bur. Sport Fish. Wildl. Div. 24 pp.

BIOLATTI B., BOLLO E., MIGNONE W., CARAMELLI M. & SCHRÖDER C. (1992) - Tuberculosis in wild boars (*Sus scrofa*) in Liguria (Italy) *Erkrankungen der Zootiere. Verhandlungsbericht des 34 Internationalen Symposium über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere, Santander-Spain 1992*, 55-59

BODMER T., GURTNER A., SCHOPFER K. & MATTER L. (1994) - Screening of respiratory tract specimens for the presence of *Mycobacterium tuberculosis* by using the Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 1483-1487

BOLLO E., GUARDA F., CAPUCCHIO M.T. & GALIETTI F. (1998) - Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *M. avium* complex in tissue specimens from cattle through identification of specific rRNA sequences. *Journal of Veterinary Medicine. B*, 45: 395-400.

BRIEDERMANN L. (1986) - *Schwarzwild*. Neumann-Neudamm ed. Berlin. 539 pp

BUNSCHOZEN A., MOLHUIZEN H., SCHOOLS L., VAN SOOLINGEN D. & VAN EMBDEN J. (1996) - "Spoligotyping", a method to detect and type. *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria *Research Laboratory for infectious diseases National Institute of Public Health and the Environment The Netherlands*, pp.16

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

DEY B.P. (1986) - Mycobacterioses in swine and their significance to public health. *United States Department of Agriculture Bibliographies and Literature of Agriculture* 49, pp.92.

DEY B. P. & PARHAM G. L. (1993) - Incidence and economics of tuberculosis in swine slaughtered from 1976 to 1988. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 203: 516-519.

DRAKE T.A., HINDER J.A., BERLIN O.G.W. & BRUCKNER D.A. (1987) - Rapid identification of *Mycobacterium avium* complex in culture using DNA probes *Journal of Clinical Microbiology* 25: 1442-1445.

EHLERS S., PIRMANN M., ZAKI W. & HAHN H. (1993) - Evaluation of a commercial rRNA target amplification assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *Diagnostic Microbiological Infectious Diseases*, 21: 827-829

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

FAMÀ N. (1997) - A rischio di epidemia. Casi di bestiame morti per tubercolosi. Formulata una nuova ipotesi di reato. *Il Secolo XIX* 16 Aprile, 13.

FERROGLIO E.M. & ROSSI L. (1996) - Brevi note informative sulla tubercolosi nel cinghiale ed in altri mammiferi selvatici. *Medicina Veterinaria Preventiva*, 12: 8-9..

FICHANDLER P.D. & OSBORNE A.D. (1966) - Bovine tuber-

- culosis in swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 148: 167-169.
- GONZALEZ R. & HANNA B.A. (1987) - Evaluation of Gen-Probe DNA hybridization systems for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*-intracellulare. *Diagnostic Microbiological Infectious Diseases*, 8: 69-77
- GRIFFIN J.M. & BUCHAN G.S. (1994) - Aetiology, pathogenesis and diagnosis of *Mycobacterium bovis* in deer. *Veterinary Microbiology*, 40: 193-205
- IVETIC V. & SUDARIC F. (1987) - Pearly tuberculosis ("perlsucht") in wild boar. *Veterinaria Yugoslavia*, 36: 121-125 (in Serb.).
- ITOH R., KAGABU Y. & ITOH F. (1992) - *Mycobacterium bovis* Infection in a Herd of Japanese Shika Deer (*Cervus nippon*). *Journal of Veterinary Medical Science*, 54: 803-804.
- JACKSON R., DE LISLE G.W. & MORRIS R.S. (1995) - A study of the environmental survival of *Mycobacterium bovis* on a farm in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 43: 346-352.
- JONAS V., ALDEN M.J., CURRY J.L., KAMISANGO K., KNOTT C.A., LANKFORD R., WOLFE J.M. & MOORE D.F. (1993) - Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 2410-2416.
- JØRGENSEN J.B., HAARBO K., DAM A. & ENGBÆK H.C. (1972A) - An enzootic of pulmonary tuberculosis in pigs caused by *M. avium*. 1. Epidemiological and pathological studies. *Acta veterinaria Scandinavica*, 13: 56-67.
- JØRGENSEN J.B., ENGBÆK H.C. & DAM A. (1972B) - An enzootic of pulmonary tuberculosis in pigs caused by *M. avium*. 2. Bacteriological studies. *Acta veterinaria Scandinavica*, 13: 68-86.
- JØRGENSEN J.B. (1978) - Experimental infection with *Mycobacterium avium*, serotype 2, in pigs. IV. Contact infection from orally inoculated pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 19: 58-72.
- KALENSKY P. (1992) - Isolation of *Mycobacteria* from wild boar. *Veterinarstvi*, 42: 346-347 (in Slov.).
- KIEHN T.E. & EDWARDS F.F. (1987) - Rapid identification using a specific DNA probe of *Mycobacterium avium* complex from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, 25: 1551-1552.
- KINDINGER H. (1934) - Tuberculose beim wild in freier wildbahn. *Vet. Med. Dissertation Giessen*, 50 pp.
- KLEEBERG H.H. & NEL E.E. (1969) - Porcine mycobacterial lymphadenitis. *Journal of the South African Veterinary Medical Association*, 40: 233-250.
- KURTZE H. (1961) - Reinfektion tuberkulosefreier Rinderbestände durch tuberkulöses. *Wild Deutsche Tierärztliche wochenschrift*, 68: 442-443.
- LESSLIE I.W., BIRN K.J., STUART P., O'NEILL P.A.F. & SMITH J. (1968) - Tuberculosis in the pig and the tuberculin test. *The Veterinary Record*, 83: 647-651.
- LETT'S G.A. (1964) - Feral animals in the Northern Territory. *Australian Veterinary Journal*, 40: 84-88.
- LO ROCCO M.T., WANGER A., OCERA H. & MACIAS E. (1993) - Evaluation of a commercial rRNA amplification assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in processed sputum. *Diagnostic Microbiological Infectious Diseases*, 21: 726-731.
- LUGTON I.W., WOBESER G., MORRIS R.S. & CALEY P. (1997) - Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in feral ferrets (*Mustela furo*) in New Zealand: I. Pathology and diagnosis. *New Zealand Veterinary Journal*, 45: 140-150
- LUKE D. (1958) - Tuberculosis in the horse, pig, sheep and goat. *The Veterinary Record*, 70: 529-536
- 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. *Atti del Convegno nazionale: ecopatologia della fauna selvatica (Bologna 15-17 dicembre 1994)*, *Supplemento alle Ricerche di Biologia della Selvaggina*, XXIV, 619-629.
- MILLER N., HERNANDEZ S. & CLEARY T. (1994) - Evaluation of Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct test and PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 393-397.
- MITCHELL M.D., HUFF I.H., THOEN C.O., HIMES E.M. & HOWDER J.W. (1975) - Swine tuberculosis in South Dakota. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 167: 152-153
- MUSIAL C.E., TICE L.S., STOCKMAN L. & ROBERTS D. (1988) - Identification of mycobacteria from culture using Gen-Probe rapid diagnostic system for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Clinical Microbiology*, 26: 2120-2123
- NOLAN A. & WILESMITH J.W. (1994) - Tuberculosis in badgers (*Meles meles*). *Veterinary Microbiology*, 40: 179-191
- PFYFFER G., KISSLING P., WIRTH R. & WEBER R. (1994) - Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens by a target-amplified test system. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 918-923.
- RAY J.A., MALLMANN V.H., MALLMANN W.L. & MORRILL C.C. (1972) - Pathologic and bacteriologic features and hypersensitivity of pigs given *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium*, or group III *Mycobacteria*. *American Journal of Veterinary Research*, 33: 1333-1345.
- SALTO H., TOMIOKA H., SATO K., TASAKA H., TSUKAMURRA M., KUZE F. & ASANO K. (1989) - Identification and partial characterization of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* by using DNA probes. *Journal of Clinical Microbiology*, 27: 994-997.
- SCHULTZ G., DEUTER H. & DEDEK J. (1992) - Zur

- Vorkommen von *Mycobacterium bovis* infektionen beim freilebenden Schwarzwild *Erkrankungen der Zootiere. Verhandlungsbericht des 34 Internationalen Symposium über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere, Santander-Spain 1992, 51-53.*
- SONGER J.G., BICKNELL E.J. & THOEN C.O. (1980) - Epidemiological investigation of swine tuberculosis in Arizona. *Canadian Journal of Comparative Medicine, 44: 115-120.*
- STARODINOVA A.K. (1974) - Lokalisation und Erscheinungsformen der tuberculose bei wildschweinen *cit. in Briedermann L. Schwarzwild Neumann-Neudamm ed. pp539.*
- THOEN C.O., JARNAGIN J.L. & RICHARDS W.D. (1975) - Isolation and identification of Mycobacteria from porcine tissues: a three-year summary. *American Journal of Veterinary Research, 36: 1383-1386.*
- THOEN C.O., HIMES E.M., WEAVER D.E. & SPANGLER G.W. (1976) - Tuberculosis in brood sows and pigs slaughtered in Iowa. *American Journal of Veterinary Research, 37: 775-778.*
- VASENIUS H. (1965) - Tuberculosis-like lesions in slaughter swine in Finland. *Nordisk veterinærmedicin, 17: 17-21.*
- WRAY C. (1975) - Survival and spread of pathogenic bacteria of veterinary importance within the environment. *Commonwealth Bureau of Animal Health, 45: 543-550.*