

STUDI SULLA PRESENZA DELLA PARATUBERCOLOSI IN CERVI DEL PARCO NATURALE GRAN BOSCO DI SALBERTRAND

Nebbia P., Ferroglio E., Robino P., Rosati S., Rossi L. & Meneguz G.

Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Via L. Da Vinci, 44 10095 - Grugliasco (TO)

Riassunto - E' stata applicata una tecnica di Polymerase Chain Reaction (PCR) per la diagnosi di paratubercolosi in cervi provenienti dal Parco Naturale Gran Bosco di Salbertrand e da aree limitrofe dell'Alta Val Susa (Alpi Cozie, Torino). Sono stati esaminati campioni di linfonodi appartenenti a 15 soggetti, di cui 11 sani e 4 con paratubercolosi clinicamente manifesta. Tutti i soggetti sono risultati positivi alla PCR. Su 10 cervi esaminati con test sierologici (AGID ed ELISA), 9 sono risultati negativi mentre un soggetto con sintomatologia in atto era positivo ad entrambi i test. Da quest'ultimo soggetto è stato isolato un ceppo di *M. (avium) paratuberculosis*. In precedenti ricerche, bovini all'alpeggio nella stessa area di studio erano risultati AGID-positivi per paratubercolosi. Con il proseguimento delle ricerche sarà possibile valutare il ruolo del cervo come eventuale fonte d'infezione per altri ruminanti domestici e selvatici.

Abstract - Presence of paratuberculosis in red deer from the Gran Bosco Park of Salbertrand. Mycobacterium (*avium*) paratuberculosis infection was detected, using Polymerase Chain Reaction (PCR), in 15 red deer coming from the Parco Naturale Gran Bosco di Salbertrand and the surrounding areas of the high Susa Valley (Cozie Alps, Turin). A *M. (avium) paratuberculosis* strain was isolated from mesenteric lymph nodes of a deer with clinical signs. AGID and ELISA tests failed to reveal specific antibodies in 9 out of 10 deer tested. In a previous survey, cattle herds from the same area tested positive to AGID. The role of red deer as a source of infection for other sympatric wild and domestic ruminants is under investigation.

J. Mt. Ecol., 7 (Suppl.): 257- 260

1. Introduzione

La paratubercolosi è un'infezione cronica che colpisce ruminanti domestici e selvatici; fra questi ultimi i cervidi risultano essere particolarmente sensibili (Riemann *et al.*, 1979; Power *et al.*, 1993; Pacetti *et al.*, 1994; De Lisle e Collins, 1995; Stehman, 1996).

Questi, in genere, si ammalano entro i primi due anni di età con scadimento delle condizioni generali, diminuzione di peso e in qualche caso diarrea. Gli adulti raramente presentano una sintomatologia conclamata, anche se risultano sierologicamente positivi e/o presentano lesioni anatomo-patologiche (Pacetti *et al.*, 1994).

Gli animali infetti, a seconda di vari fattori, possono comportarsi da eliminatori o da non-eliminatori. Gli esami colturali (da feci e da tessuti intestinali) richiedono tempi di esecuzione estremamente lunghi (12-16 settimane) a fronte di una sensibilità non molto elevata. Anche i rilievi istopatologici possono essere indistinguibili da quelli causati da altri micobatteri (De Lisle e Collins, 1995).

I problemi legati alla diagnosi di questa malattia hanno sicuramente ostacolato le ricerche epidemiologiche volte sia a rilevare la diffusione dell'infezione nei selvatici sia a studiare le possibilità di cross-trasmissione di *Mycobacterium (avium) paratuberculosis* fra questi e i ruminanti domestici.

L'impiego di tecniche di biologia molecolare permette tuttavia di superare alcuni dei problemi accennati grazie all'impiego di primers che amplificano la sequenza di inserzione IS900 specifica di *M. (avium) paratuberculosis*.

In questo lavoro si è inteso valutare la presenza dell'infezione nei cervi presenti in un'area dell'Alta Val Susa dove, negli anni precedenti, i bovini alpeggianti presentavano positività anticorpali nei riguardi dell'infezione paratubercolare.

2. Materiali e metodi

Area di studio

I cervi (*Cervus elaphus hyppelaphus*) in esame provengono dal Parco Naturale Gran Bosco di Salbertrand e da zone limitrofe situate in Alta Val Susa (To). Estinto nell'area verso il 1700, il cervo è stato reintrodotta nella prima metà degli anni '60. I soggetti fondatori (14) provenivano dalla Slovenia e da un giardino zoologico. Dal momento della reintroduzione la popolazione in oggetto non ha avuto contatti con cervi provenienti da altre aree e attualmente ammonta a circa 1100 capi. Nell'area sono presenti altri ungulati quali il camoscio alpino (*Rupicapra rupicapra*), il cinghiale (*Suis scrofa*), il capriolo (*Capreolus capreolus*) e lo stambecco (*Capra ibex*). Nel periodo dell'alpeggio (giugno-settembre) 4800 bovini e circa 6000 ovi-

Tab. 1 - Risultati delle prove di laboratorio effettuate sul siero e sui linfonodi di 15 cervi provenienti dall'Alta Val Susa per la ricerca di positività a *M. (avium) paratuberculosis*.

Campione	Sintomi	Coltura	PCR	AGID	ELISA
1	-	n.e.	+	-	-
2	-	n.e.	+	-	-
3	-	n.e.	+	-	-
4	-	n.e.	+	-	-
5	-	n.e.	+	-	-
6	-	n.e.	+	-	-
7	-	cont.	+	-	-
8	-	n.e.	+	-	-
9	-	cont.	+	-	-
10	-	-	+	n.e.	n.e.
11	+	cont.	+	n.e.	n.e.
12	+	-	+	n.e.	n.e.
13	+	-	+	n.e.	n.e.
14	+	+	+	+	+
15	+	cont.	+	n.e.	n.e.

n.e = non eseguito

cont. = contaminazione da flora microbica

caprini condividono gli stessi pascoli dei ruminanti selvatici.

Animali

Nel complesso sono stati esaminati i linfonodi di 15 cervi (vedi tabella 1) catturati durante le stagioni venatorie dal 1995 al 1998, di cui 10 clinicamente sani e 5 con sintomatologia conclamata (4 trovati morti e 1 soppresso a scopo eutanasico).

Da ciascun animale sono stati prelevati i linfonodi meseraici e per 10 soggetti è stato possibile ottenere anche il siero di sangue. Tutti i campioni sono stati stoccati a -20°C fino al momento dell'uso.

Esame colturale

Porzioni di linfonodi sono state omogeneizzate mediante Stomacher e decontaminate con Cloruro di benzalconio (*Sigma Chemical Co.*) allo 0.75% per una notte. Tre aliquote di ciascun campione sono state seminate su terreno Herrold's Egg Yolk addizionato e non con il fattore di crescita Mycobactin J (*Allied Monitor Inc.*) e con sodio piruvato (*Sigma Chemical Co.*) (Belletti e Zavanella, 1987). Le sospensioni sono state incubate a 37°C per 16 settimane.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Dai linfonodi sono stati prelevati sterilmente 50 mg di tessuto midollare che è stato sottoposto a doppio trattamento con proteinasi K. Per l'estrazione del DNA batterico si è proceduto

seguendo il protocollo del Quiamp Tissue Kit (*Quiagen-Hilden*). I campioni di DNA sono stati analizzati mediante PCR usando primers specifici per amplificare la porzione di 229 bp interna alla sequenza di inserzione IS900.

Esami sierologici

AGID – i sieri sono stati testati secondo la metodica di Sherman et al. (1984), utilizzando come antigene *M. avium paratuberculosis* strain 18 (*Allied Monitor Inc.*). La lettura è stata effettuata dopo 24 e 48 ore.

ELISA – il test è stato eseguito secondo il protocollo in uso presso i nostri laboratori (Maglione et al., 1997) impiegando lo stesso antigene usato per il test AGID; come anticorpi marcati sono state usate IgG anti-cervo del commercio (*Kirkegaard and Perry Lab, Inc. MD*). La lettura è stata effettuata a 410 nm.

In entrambe le prove sono stati usati sieri di controllo positivi e negativi.

3. Risultati

I risultati della PCR e degli altri test eseguiti sono mostrati in tabella 1 ed in figura 1.

4. Discussione

Sebbene il basso numero di campioni analizzati non consenta di trarre conclusioni sulla reale diffusione dell'infezione nella popolazione di cervi studiata, il riscontro mediante PCR (Fig.1) di *M. (avium) paratuberculosis* in tutti gli animali esaminati e l'isolamento effettuato a

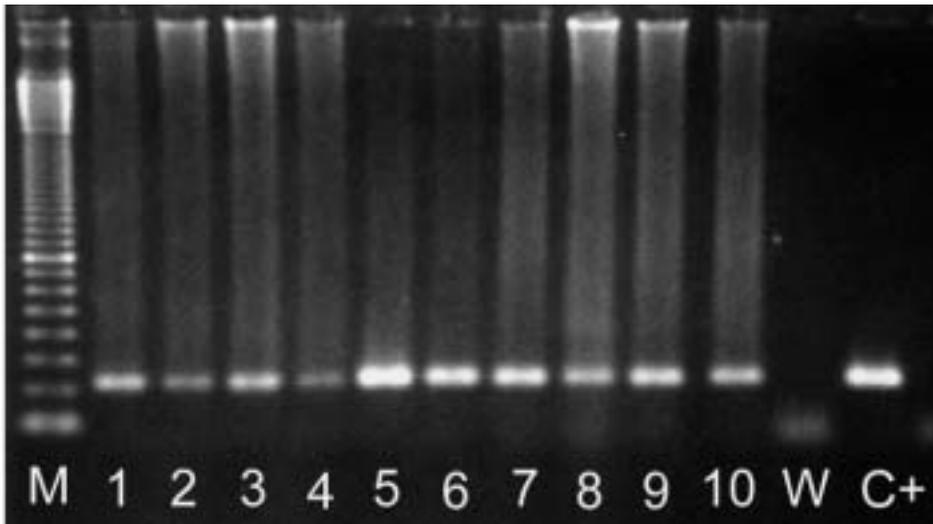


Fig. 1 – Amplificazione del frammento di 229 bp dell'inserzione IS900 di *M. (avium) paratuberculosis* in 10 dei 15 campioni linfonodali di cervo testati (M= marker, 1-10= campioni, W= controllo negativo, C+ = controllo positivo).

partire dai linfonodi di un soggetto, indicano come l'infezione sia presente nei cervi dell'Alta Val Susa.

I risultati degli esami sierologici, negativi in 9 casi esaminati su 10, concordano con Collins et al., (1990) nell'indicare una bassa sensibilità dell'ELISA e dell'AGID in soggetti in cui l'infezione decorre in modo sub-clinico. L'unica siero-positività da noi trovata si riferisce, in effetti ad un caso clinicamente manifesto, caratterizzato da imponenti alterazioni della parete intestinale e dei linfonodi meseraici. Anche Perez et al. (1997) segnalano come la risposta immunitaria sia principalmente di tipo umorale in caso di lesioni diffuse e di tipo cellulo-mediato nelle lesioni localizzate.

La metodica di PCR da noi adottata si è rivelata, rispetto a tecniche più tradizionali, sensibile, specifica e di rapida esecuzione (Vary et al., 1990; Collins et al., 1993; Guillon et al., 1993). Inoltre la possibilità di analizzare anche campioni in non perfetto stato di conservazione si rivela estremamente vantaggiosa nello studio dell'epidemiologia della paratubercolosi nei selvatici.

Non risultando ad oggi segnalazioni di paratubercolosi nella popolazione slovena da cui originano i cervi dell'Alta Val Susa, è probabile che il focolaio in atto derivi dall'utilizzo di pascoli frequentati da bovini infetti. Recenti studi hanno evidenziato, peraltro, come una popolazione di cervi possa mantenere l'infezio-

ne per oltre 10 anni (Cook et al. 1997) in assenza di qualsiasi nuovo contatto con ruminanti domestici infetti.

Gli Autori desiderano ringraziare il personale del PNGBS e Aldo Tolosano per l'aiuto fornito nella raccolta del materiale. Ricerca parzialmente eseguita con fondi Interreg 2 e MURST 40%.

Bibliografia

- BELLETTI G.L., ZAVANELLA M. (1987) - L'esame colturale delle feci per la diagnosi di paratubercolosi. *Selezione Veterinaria*, 28: 891-896.
- COLLINS D.M., GABRIC D.M., DE LISLE G.W. (1990) - Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strain by reaction endonuclease analysis and DNA hybridization. *Journal Clinical Microbiology*, 28: 1591-1596.
- COLLINS D.M., STEPHENS D.M. & DE LISLE G.W. (1993) - Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Veterinary Microbiology*, 36: 289-299.
- COOK W.E., CORNISH T.E., SHIDELER S., LASLEY B. & COLLINS T. (1997) - Radiometric culture of *Mycobacterium avium paratuberculosis* from the feces of tule elk. *Journal of Wildlife Disease*, 33: 635-637.
- DE LISLE G.W. & COLLINS D.M. (1995) - Johne's disease in red deer. *The Veterinary Record*, 137: 336
- GUILLOU J.P., HÉNAULT S., OSTYN A. & THOREL M.F. (1993) - Utilization de la méthode d'amplification enzymatique in vitro pour la detection de *Mycobacterium paratuberculosis* dans les fèces. *Rev. Sci.tech. Off. int. Epiz.*, 12: 605-615.
- MAGLIONE E., NEBBIA P., ROBINO P. & MIGLIETTI E.

- (1997) - Paratubercolosi nel bovino. *Large Animals Review*, 4:29-33.
- PACETTI A., BELLETTI G., FABBI M., MUTINELLI F. & GENCHI C. (1994) - *Paratubercolosi del cervo*. Documenti veterinari, 4:67-70.
- PEREZ V., TELLECHEA J., CORPA J.M. GUTIERREZ M.M., BOLEA R., BADIOLA J.J. & GARCIA MARIN J.F. (1997) - Pathology and diagnostic tests in ovine paratubercolosis. *Proceedings 15th meeting of the European Society of Veterinary Pathology*, 84
- POWER S.B., HAAGSMA J. & SMYTH D.P. (1993) - Paratubercolosis in farmed red deer (*Cervus elaphus*) in Ireland. *The Veterinary Record*, 132: 213-216.
- RIEMANN H., ZAMEN M.R., RUPPANNER R., AALUND O., JORGENSEN J.B., WORSAAE H. & BEHYMER D. (1979) - Paratubercolosis in cattle and free-living exotic deer. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 175: 841-843.
- SHERMANN D.M., HARKHAM J.F. & BATES F. (1984) - Agar Gel Immunodiffusion tests for diagnosis of clinical paratubercolosis in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 185: 179-182.
- STEHMAN S. (1996) - Paratubercolosis in small ruminants, deer, and south american camelids. *Veterinary clinics of north America: Food animal practice*, 12: 441-455.
- VARY P.H., ANDERSEN P.R., GREEN E., HERMON-TAYLOR J. & MC FADDEN J.J. (1990) - Use of highly specific DNA probes and the Polymerase Chain Reaction to detect *Mycobacterium paratubercolosis* in John's disease. *Journal Clinical Microbiology*, 28: 933-937.