FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE
BRESCIA

MICOBATTERI ATIPICI

PATOGENI DEL FUTURO?

Maurizio Zavanella

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA

89

MICOBATTERI ATIPICI
Patogeni del futuro?

Nella stessa collana sono stati pubblicati i seguenti volumi:

1 - 1979 Infezioni respiratorie del bovino
2 - 1980 L'oggi e il domani della sulfamidoterapia veterinaria
3 - 1980 Ormoni della riproduzione e Medicina Veterinaria
4 - 1980 Gli antibiotici nella pratica veterinaria
5 - 1981 La leucosi bovina enzootica
6 - 1981 La «Scuola per la Ricerca Scientifica» di Brescia
7 - 1982 Gli indicatori di Sanità Veterinaria nel Servizio Sanitario Nazionale
8 - 1982 Le elmintiasi nell'allevamento intensivo del bovino
9 - 1983 Zoonosi ed animali da compagnia
10 - 1983 Le infezioni da Escherichia coli degli animali
11 - 1983 Immunogenetica animale e immunopatologia veterinaria
12 - 1984 5° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
13 - 1984 Il controllo delle affezioni respiratorie del cavallo
14 - 1984 1° Simposio Internazionale di Medicina veterinaria sul cavallo da competizione
15 - 1985 La malattia di Aujeszky. Attualità e prospettive di profilassi nell'allevamento suino
16 - 1986 Immunologia comparata della malattia neoplastica
17 - 1986 6° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
18 - 1987 Embryo transfer oggi: problemi biologici e tecnici aperti e prospettive
19 - 1987 Coniglicoltura: tecniche di gestione, ecopatologia e *marketing*
20 - 1988 Trentennale della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1956-1986
21 - 1989 Le infezioni erpetiche del bovino e del suino
22 - 1989 Nuove frontiere della diagnostica nelle scienze veterinarie
23 - 1989 La rabbia silvestre: risultati e prospettive della vaccinazione orale in Europa
24 - 1989 Chick Anemia ed infezioni enteriche virali nei volatili
25 - 1990 Mappaggio del genoma bovino
26 - 1990 Riproduzione nella specie suina
27 - 1990 La nube di Chernobyl sul territorio bresciano
28 - 1991 Le immunodeficienze da retrovirus e le encefalopatie spongiformi
29 - 1991 La sindrome chetosica nel bovino
30 - 1991 Atti del convegno annuale del gruppo di lavoro delle regioni alpine per la profilassi delle mastiti
31 - 1991 Allevamento delle piccole specie
32 - 1992 Gestione e protezione del patrimonio faunistico
33 - 1992 Allevamento e malattie del visone
34 - 1993 Atti del XIX Meeting annuale della S.I.P.A.S., e del Convegno su Malattie dismetaboliche del suino
35 - 1993 Stato dell'arte delle ricerche italiane nel settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche - Atti 1a conferenza nazionale
36 - 1993 Argomenti di patologia veterinaria
37 - 1994 Stato dell'arte delle ricerche italiane sul settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche
38 - 1995 Atti del XIX corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
39 - 1995 Quale bioetica in campo animale? Le frontiere dell'ingegneria genetica
40 - 1996 Principi e metodi di tossicologia in vitro
41 - 1996 Diagnostica istologica dei tumori degli animali
42 - 1998 Umanesimo ed animalismo
43 - 1998 Atti del Convegno scientifico sulle enteropatie del coniglio
44 - 1998 Lezioni di citologia diagnostica veterinaria
45 - 2000 Metodi di analisi microbiologica degli alimenti
46 - 2000 Animali, terapia dell'anima
47 - 2001 Quarantacinquesimo della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1955-2000

48 - 2001 Atti III Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria
49 - 2001 Tipizzare le salmonelle
50 - 2002 Atti della giornata di studio in cardiologia veterinaria
51 - 2002 La valutazione del benessere nella specie bovina
52 - 2003 La ipofertilità della bovina da latte
53 - 2003 Il benessere dei suini e delle bovine da latte: punti critici e valutazione in allevamento
54 - 2003 Proceedings of the 37th international congress of the ISAE
55 - 2004 Riproduzione e benessere in coniglicoltura: recenti acquisizioni scientifiche e trasferibilità in campo
56 - 2004 Guida alla diagnosi necroscopica in patologia suina
57 - 2004 Atti del XXVII corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
58 - 2005 Piccola storia della Medicina Veterinaria raccontata dai francobolli
59 - 2005 IV Congresso Italiano di Storia della Medicina Veterinaria
60 - 2005 Atti del XXVIII corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
61 - 2006 Atlante di patologia cardiovascolare degli animali da reddito
62 - 2006 50° Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1955-2005
63 - 2006 Guida alla diagnosi necroscopica in patologia del coniglio
64 - 2006 Atti del XXIX corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
65 - 2006 Proceedings of the 2nd International Equitation Science Symposium
66 - 2007 Piccola storia della Medicina Veterinaria raccontata dai francobolli - II edizione
67 - 2007 Il benessere degli animali da reddito: quale e come valutarlo
68 - 2007 Proceedings of the 6th International Veterinary Behaviour Meeting
69 - 2007 Atti del XXX corso in patologia suina
70 - 2007 Microbi e alimenti
71 - 2008 V Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria
72 - 2008 Proceedings of the 9th world rabbit congress
73 - 2008 Atti Corso Introduttivo alla Medicina non Convenzionale Veterinaria
74 - 2009 La biosicurezza in veterinaria
75 - 2009 Atlante di patologia suina I
76 - 2009 Escherichia Coli
77 - 2010 Attività di mediazione con l'asino
78 - 2010 Allevamento animale e riflessi ambientali
79 - 2010 Atlante di patologia suina II Prima Parte
80 - 2010 Atlante di patologia suina II Seconda Parte
81 - 2011 Esercitazioni di microbiologia
82 - 2011 Latte di asina
83 - 2011 Animali d'affezione
84 - 2011 La salvaguardia della biodiversità zootecnica
85 - 2011 Atti I Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria
86 - 2011 Atti II Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria
87 - 2011 Atlante di patologia suina III
88 - 2012 Atti delle Giornate di Coniglicoltura ASIC 2011

FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE
- BRESCIA -

Direttore scientifico: Prof. E. LODETTI

MICOBATTERI ATIPICI

Patogeni del futuro?

MAURIZIO ZAVANELLA

Collaboratori:

GABRIELE PINSI
GIULIO BERTOLONI
RENZO ZANONI
NORMA ARRIGONI
SALVATORE CATANIA
GIANLUCA BELLETTI
GIUSEPPE IDOTTA
SILVIA TAGLIABUE
MARIO D'INCAU
CRISTIAN SALOGNI
MARIA GRAZIA ZANONI
MARIA PACCIARINI

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA
Via Istria, 3/b - 25125 Brescia

ISBN 978-88-97562-03-0

© Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia, gennaio 2012

Tipografia Camuna - Brescia 2012

NOTE BIOGRAFICHE DEGLI AUTORI

MAURIZIO ZAVANELLA - Laureato in Scienze Biologiche a Padova nel 1965 con una tesi sperimentale sui micobatteri tubercolari e atipici che isolava da pazienti dell'Ospedale Tisiatrico "Villa Imperiale" di Galliera Veneta (Padova), ha lavorato dal 1966 al 1998 presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna. Dirigente del Dipartimento di Batteriologia della Seda Centrale di Brescia, ha continuato ad occuparsi della diagnostica dei micobatteri e della produzione industriale di tubercoline.

GABRIELE PINSI - Dirigente Medico dell'Unità Operativa di Microbiologia e Virologia degli Spedali Civili di Brescia. Si occupa, da circa vent'anni, della diagnostica di laboratorio della tubercolosi e delle micobatteriosi in generale.

GIULIO BERTOLONI - Professore del Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche dell'Università di Padova.

RENZO ZANONI - In qualità di tecnico, ha lavorato dal 1963 al 1977 nel Laboratorio di Istologia dell' Istituto di Patologia Generale dell' Università di Padova (Facoltà di Medicina e Chirurgia), operando soprattutto su biopsie effettuate a scopo diagnostico e di ricerca.

NORMA ARRIGONI - Dirigente Veterinario presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZLER) nella sezione di Piacenza, sede del Centro Nazionale di Referenza per la Paratubercolosi.

SALVATORE CATANIA - Dirigente Veterinario nella Struttura Complessa Territoriale per l'area diagnostica di Padova presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – sede centrale di Legnaro (Padova) – esperto in avicoltura.

GIANLUCA BELLETTI - Già Direttore della Sezione Diagnostica di Piacenza dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZLER). Nella sua carriera si è occupato attivamente di malattie dei bovini.

GIUSEPPE IDOTTA - Medico, Direttore dell'Unità Operativa Complessa (UOC) di Pneumologia e Direttore dell' Unità di Terapia Intensiva Respiratoria (UTIR) dell'Ospedale di Cittadella (Padova), già in servizio presso l'Ospedale Tisiatrico "Villa Imperiale" di Galliera Veneta (Padova).

SILVIA TAGLIABUE - Dirigente Biologa presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna di Brescia nel Reparto di Batteriologia, Centro di Referenza Nazionale per la tubercolosi da *M. bovis*.

MARIO D' INCAU - Veterinario dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna nel Reparto di Batteriologia della sede centrale di Brescia, Centro di Referenza Nazionale per la tubercolosi da *M. bovis*. Ha lavorato presso l'Unità Locale Socio-Sanitaria (ULSS) di Chioggia (Venezia).

CRISTIAN SALOGNI - Veterinario dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna. Lavora presso la Sezione Diagnostica della sede centrale di Brescia. È specializzato in ittiopatologia.

MARIA GRAZIA ZANONI - Veterinaria dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna. Lavora presso la Sezione Diagnostica della sede centrale di Brescia.

MARIA PACCIARINI - Dirigente Biologa presso il Reparto di Genomica - Laboratorio di Diagnostica Molecolare dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna di Brescia (IZSLER) - Responsabile del Centro di Referenza Nazionale per la tubercolosi da *M. bovis*.

PREFAZIONE

Un nuovo quaderno di argomento microbiologico si aggiunge ai precedenti, questa volta su un tema che può evocare giustamente qualche preoccupazione. Si tratta di malattie infettive ritenute risolte e superate, che viceversa, per il cosiddetto fenomeno dei "corsi e ricorsi" della storia, stanno ripresentandosi nelle nostre zone. E, come spesso avviene quando si parla di infezioni, i problemi dimostrano di avere origini e relazioni molto strette fra l'ambiente, gli animali e l'uomo.

La Fondazione, attenta a quanto accade nel mondo della zootecnia e, di converso, della sanità in generale (quindi, l'uomo), vuole insistere su questi aspetti, sollecitando stavolta la curiosità di quanti hanno sentito ancora il termine "Micobatteri atipici" e lo hanno collegato (a buon diritto) alla tubercolosi.

Riteniamo perciò che gli addetti ai lavori (soprattutto i giovani futuri medici, veterinari, biologi) potranno apprezzare l'opportunità di migliorare le conoscenze sull'argomento, in particolare sugli aspetti clinici, epidemiologici e diagnostici, che parecchio, tra l'altro, si basano sull' opera degli specialisti di laboratorio.

Il Segretario Generale
dr. Stefano Capretti

PREMESSA

Era una piaga che ora si riaffaccia anche nel nostro paese, dove era stata sconfitta. La tubercolosi, tornata in maniera preoccupante, richiama l'attenzione sul rischio delle infezioni da micobatteri.

Gli "atipici", oggetto della presente rassegna, assomigliano per molti versi al bacillo tubercolare classico di Koch e possono diventare patogeni in condizioni di immunodeficienza come, ad esempio, negli anziani, nei diabetici e negli ammalati di AIDS.

Ampiamente diffusi in natura, sono in grado di provocare varie patologie nell'uomo e negli animali, con l'aggravante di essere spesso resistenti ai farmaci.

La loro pericolosità, forse sottostimata, merita di essere maggiormente conosciuta e attentamente valutata.

INDICE

Parte Prima

CAPITOLO I - *Caratteristiche generali dei micobatteri atipici*

Cenni storici 3
Collocazione tassonomica del genere *Mycobacterium* 4
Caratteri comuni e caratteri differenziali verso i micobatteri classici 5
Struttura dei micobatteri atipici 7
Biochimica di laboratorio degli atipici 8
Meccanismi di patogenesi e di resistenza all'infezione 11
Resistenza ai disinfettanti 11
Antibiotici e farmaco-resistenza 12
Terapia 13
Proprietà utilizzate in farmaceutica 14

CAPITOLO II - *Distribuzione dei micobatteri in natura*

Micobatteri atipici nell'uomo 15
- micobatteriosi polmonari 17
- micobatteriosi extra-polmonari 19

Micobatteri atipici negli animali 24
- nel bovino 25
- nel suino 35
- negli ovi-caprini 38
- nei volatili 39
- nel cavallo 41
- nel cane e nel gatto 41
- nei pesci 42
- negli animali da esperimento 46
- negli animali selvatici 46

Micobatteri atipici nell'ambiente 48
- nel suolo 49
- nelle acque 49
- nei vegetali 51
- negli alimenti 51
- nei mangimi 52

CAPITOLO III - *Dati statistici sulla presenza dei micobatteri atipici*

Osservazioni su due realtà a confronto (uomo e animali) 53
- dati statistici in umana 53
- dati statistici in veterinaria 55

Esperienze degli anni '60 56

Parte Seconda - Tecnica di laboratorio

CAPITOLO IV - *Trattamento dei campioni e isolamento*

Raccolta e conservazione dei campioni 71
Esame microscopico diretto del materiale in esame 71
Decontaminazione del campione 74
Esame colturale 80
Isolamento con sistemi automatizzati o semi-automatici 87
Prova biologica 87

CAPITOLO V - *Prove di identificazione di specie*

Identificazione attraverso prove biochimiche 89
Identificazione attraverso metodi alternativi 104
Identificazione attraverso prove immunologiche *in vitro* 107

CAPITOLO VI - *Altri tipi di esame*

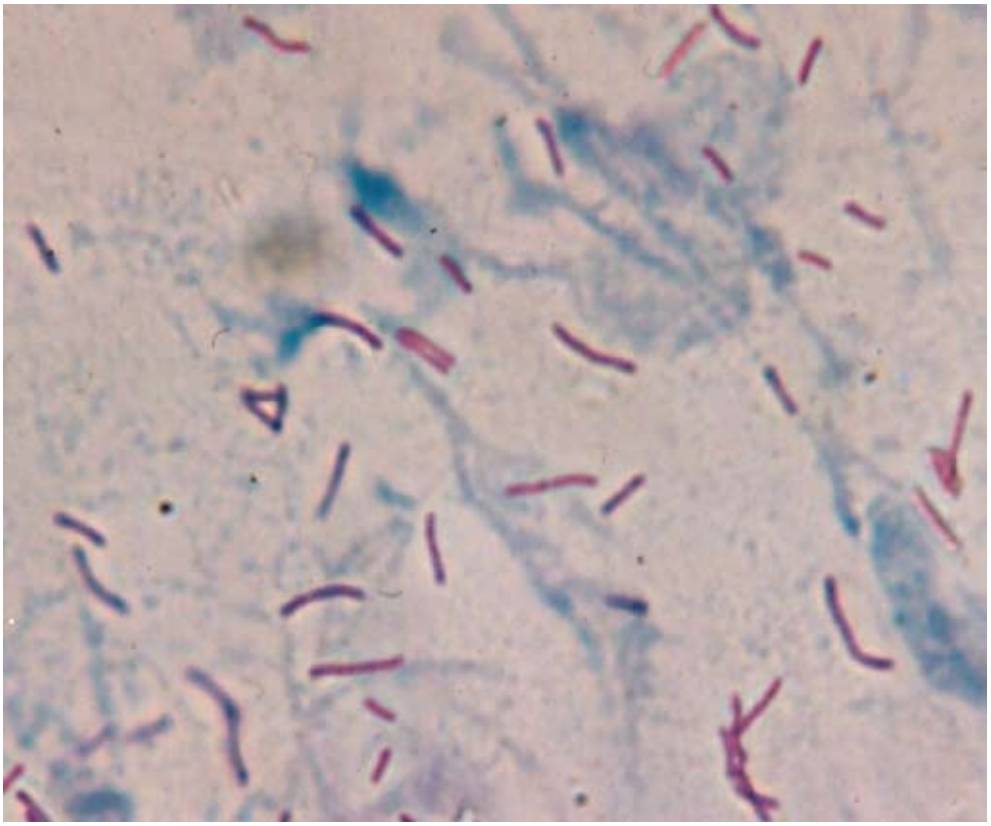
Prove allergiche 113
Prove di sensibilità ad antibiotici 117
Esami istologici 118
Un problema specifico: la diagnosi di paratubercolosi 120

Appendice

Norme specifiche di sicurezza in laboratorio 129
Terreni e reagenti 129

Bibliografia

PARTE PRIMA



Bacilli alcool-acido resistenti riferibili a micobatteri tubercolari atipici
Striscio da tessuti
Colorazione di Ziehl-Neelsen
Ingrandimento = 1200 X

CAPITOLO I

Caratteristiche generali dei micobatteri atipici

CENNI STORICI

Per molti anni sono state considerate patogene per l'uomo solamente tre specie di micobatteri: *tuberculosis*, *bovis* e *leprae*. Ma a breve distanza dalla scoperta del bacillo tubercolare (Koch, 1882) erano già stati individuati nelle secrezioni umane altri bacilli, che in qualche modo somigliavano ai precedenti.

Pinner nel 1935 aveva chiamato "microrganismi atipici acido-resistenti" alcuni ceppi che differivano da quelli classici, soprattutto per l'aspetto delle colonie e perché non ammalavano la cavia.

Segnalazioni di probabili "micobatteri atipici" (denominazione presa poi) si susseguirono fino all'identificazione di due nuovi patogeni, *M. ulcerans* (1948) e *M. intracellulare* (1949), seguiti, nell'arco di 5 anni, da altri (*fortuitum, marinum, kansasii, avium, chelonae*).

Le intuizioni di Pinner furono condivise da altri Autori, che confermarono l'inadeguatezza dei criteri tassonomici fino ad allora applicati.

Autore	**Anno**	**Fonte d'isolamento**	**Denominazione assegnata subito o successivamente al micobatterio isolato**
Aronson	1926	pesci	*marinum*
Costa Cruz	1938	ascesso da iniezione	*fortuitum* (a rapida crescita)
McCallum *e Coll.*	1948	eruzione cutanea per chemioterapici anti-tubercolari	*ulcerans*
Cuttino *e Coll.*	1949	Infezione letale generalizzata in un bambino	*intracellulare* (Runyon,1965)
Norden *e Coll.*	1965	granuloma cutaneo da balneazione	*balnei*
Prissik *e Coll.*	1952	adenite cervicale in bambini	*scrofulaceum*
Bhuler *e Coll.*	1953	malattia polmonare	*kansasii* (Hauduroy, 1955)

Nel 1954 Timper e Runyon, dopo aver creato la prima collezione di ceppi di micobatteri "atipici" isolati dall'uomo, pubblicarono un lavoro fondamentale, spiegando le relazioni tra malattia e proprietà dei batteri responsabili, senza più alcun riferimento alla patogenicità verso gli animali da esperimento. Il loro sistema di classificazione è rimasto in uso col nome di "schema di Runyon".
La struttura dello schema (al quale appartengono, tra le altre, alcune specie significative qui citate) è descritta alla fine della Prima Parte (Capitolo III, Esperienze degli anni '60).

Gruppo I di Runyon (fotocromogeni a lenta crescita)	*M. kansasii, M. marinum, M. simiae*
Gruppo II di Runyon (scotocromogeni a lenta crescita)	*M. szulgai, M. scrofulaceum, M. xenopi*
Gruppo III di Runyon (non cromogeni a lenta crescita)	*M. avium* complex, *M. genavense,* *M. haemophilum, M. malmoense*
Gruppo IV di Runyon (a rapida crescita)	*M. fortuitum, M chelonae, M. abscessus,* *M. mucogenicum*

In letteratura i micobatteri atipici (o anonimi) vengono anche chiamati "micobatteri non-tubercolari" con l'acronimo MOTT (*Mycobacteria other than tuberculosis*).

Tuttavia questa denominazione può risultare discutibile, se si considera che, per effetto di un' evoluzione nel tempo, le specie in questione non hanno ancora un ruolo ben definito nelle patologie di tipo tubercolare.

Confronto fra lo sviluppo e la pigmentazione delle colonie di un ceppo di micobatterio tubercolare e di un ceppo atipico fotocromogeno del I° gruppo di Runyon (a destra). Terreno colturale IUTM, sviluppo delle colture = 1 mese

COLLOCAZIONE TASSONOMICA DEL GENERE *MYCOBACTERIUM*

Secondo il Bergey's Manual (IX edizione, 1994), il gruppo dei micobatteri viene descritto come un unico genere (*Mycobacterium*) formato da microrganismi allungati, bastoncellari, caratteristicamente acido-resistenti, aerobi, per lo più a crescita lenta, che vivono liberi in natura o parassiti dei vertebrati. Alcune specie possono essere confuse con altri generi.

La proprietà di resistere agli acidi, dovuta a materiali vari della parete cellulare, è particolarmente importante per riconoscerli e si apprezza nell'esame microscopico mediante colorazione. Esistono altri batteri parzialmente acido-resistenti, ma sono facilmente decolorabili con l'alcool, sebbene essi possano resistere alla decolorazione con acidi deboli.

La tecnica di colorazione (classica quella di Ziehl-Neelsen, nata nel 1882) è quindi molto importante e deve essere eseguita accuratamente. Dal 1937 è stata affiancata dalla colorazione con sostanze fluorescenti (Hagermann).

È compito del laboratorio isolare dai tessuti i micobatteri, identificarli, differenziando i patogeni potenziali dai saprofiti. Questi ultimi possono causare malattie in certe situazioni, comportandosi, quindi, da opportunisti (Krishnaswami *e Coll*., 1969).

I micobatteri ritenuti patogeni o potenzialmente patogeni (complessivamente oltre 50 specie) sono stati classificati in due sottogruppi (tabella 1):

Tabella 1 – Classificazione dei micobatteri (Bergey's Manual)

M. tuberculosis complex (micobatteri tipici)	*M. tuberculosis* *M. bovis* *M. africanum* *M. microti*
Micobatteri atipici	gruppi di Runyon 1 - **fotocromogeni** 2 - **scotocromogeni** 3 - **non cromogeni a lenta crescita** 4 - **a rapida crescita**

Entrambi i raggruppamenti, secondo un'ipotesi molto suggestiva, deriverebbero da un unico ceppo ancestrale (*Mycobacterium arcaicum*), attraverso un'evoluzione condizionata dall'ambiente e dalla recettività dell'ospite.

Tutte le specie mostrano comunque notevoli somiglianze tra loro. Storicamente si sono viste fasi alterne nell'intensità e nella frequenza delle infezioni nell'uomo e negli animali.

Ad esempio, la diffusione della tubercolosi ha sostituito nell'uomo la lebbra, la paratubercolosi ha provocato una contrazione della tubercolosi da *M. bovis* nel bovino, i micobatteri atipici hanno fatto passare in secondo piano nel suino le forme tubercolari classiche trasmesse dall'uomo e dal bovino.

È difficile fare un rapporto fra isolamenti di micobatteri atipici e malattie, in quanto i dati di laboratorio vengono genericamente registrati fra le forme tubercolari, anche se non lo sono (PHS, 1962).

La sempre maggior diffusione dei micobatteri atipici potrebbe essere conseguenza della chemioterapia, che ha abbattuto la frequenza dei tubercolari, senza intaccare le fonti naturali degli atipici. Per di più, si tende col tempo a studiare maggiormente i micobatteri isolati, dotati di caratteristiche insolite, che non vengono automaticamente scartati come non patogeni.

Qualcuno pensa che i batteri atipici rappresenteranno l'ultimo grave problema posto dalle infezioni da micobatteri, non potendo scomparire i loro serbatoi naturali (Davis-Dulbecco, 1981).

CARATTERI COMUNI E CARATTERI DIFFERENZIALI VERSO I MICOBATTERI CLASSICI

Al microscopio i micobatteri, in generale, si possono presentare come bastoncini diritti o leggermente incurvati, delle dimensioni di 0.2-0.7 millimicron per 1.0-10 millimicron. Talvolta sono ramificati, filamentosi o formanti un micelio, che però facilmente si frammenta in elementi allungati o rotondeggianti.

Non si colorano facilmente con la colorazione di Gram, anche se sono debolmente Gram-positivi. Non formano ife, non sono mobili, non formano spore.

Si tratta di germi aerobi, la cui crescita (che avviene da 2 a 60 giorni su appositi terreni e a temperatura adeguata) si può presentare talvolta pigmentata in vario modo, dal giallo all'arancio, soprattutto dopo esposizione alla luce. Il pigmento non diffonde. Resistono al lisozima e sono positivi nelle reazioni di catalasi e aril-sulfatasi.

Quasi tutti questi bacilli esigono terreni arricchiti con proteine dell'uovo, acido oleico, albumina e necessitano comunque di qualche giorno in più dei tradizionali batteri per sviluppare.

Alcune specie (ad esempio il *M. paratuberculosis*) sono più difficili da coltivare in laboratorio e richiedono un supplemento di crescita (*Mycobactin*).

Oltre al tipo di patogenicità, storicamente i caratteri distintivi degli atipici rispetto ai tubercolari classici (si fa riferimento a *M. tuberculosis* e *M. bovis*) sono: la pigmentazione delle colonie sui terreni, il tempo di crescita (spesso più breve) e la diversa patogenicità verso gli animali da esperimento (tabella 2):

Tabella 2 – Alcuni caratteri (storicamente ritenuti distintivi) fra micobatteri tubercolari e atipici

Tipo	*Crescita*	*Esigenze*	*Colonie*	*Cavia*	*Coniglio*	*Pollo*
Umano	Media	Glicerina	Grigio-giallastre, secche, irregolari	+	+/-	-
Bovino	Lenta	Senza glicerina	Più piccole, grigio-giallastre, tendenti a confluire	+	+	-
Atipici (gruppo aviare)	Relativamente rapida	Glicerina	Piccole, confluenti in patina liscia e giallastra	-	+	+

Tentativi di classificazione dei micobatteri diversi da Runyon sono stati proposti da più Autori, con lo scopo di rendere più organica una materia definita un tempo "abbondante e confusa", ma nessuno ha avuto un gran seguito (Cattaneo, 1963).

Ad esempio, Marks (1975) ha basato il suo schema sulle esigenze di temperatura per la crescita (tabella 3):

Tabella 3 – Classificazione dei micobatteri atipici secondo Marks in base alla temperatura ottimale di crescita in laboratorio

Divisione primaria	Temperatura °C			Specie principali di interesse clinico
	25	37	45	
Stretti mesofili	-	+	-	*tuberculosis, bovis*
Psicrofili	+	+	-	*marinum, chelonae, ulcerans*
Mesofili	+	+	-	*kansasii, flavescens, gordonae, fortuitum, abscessus, terrae*
Ad ampio spettro	+	+	+	*avium-intracellulare, smegmatis, phlei*
Termofili	-	+	+	*xenopi*

Anche Bailey e Scott (1965) hanno tentato di inquadrare in uno schema i ceppi "modificati" che sfuggono alla classificazione di Runyon, ma i criteri biochimici adottati (*test* del rosso neutro, dell'auramina, del fattore cordale, della pigmentazione alla luce artificiale) non si sono dimostrati in seguito sufficienti per una differenziazione da quelli classici (tabella 4):

Tabella 4 - Caratteri differenziali dei micobatteri secondo Bailey e Scott

Test	Specie di micobatteri				Micobatteri "anonimi"			
	tuberculosis	*bovis*	*avium*	saprofiti	foto-cromogeni (I)	scoto-cromogeni (II)	non foto-cromogeni (III)	a rapida crescita (IV)
Aspetti colturali								
Corde	+ strette	+	+	-	+/- lasse	-	-	+/-
Pigmento	crema, bianco	bianco	bianco	giallo, arancio, rosso	giallo, rosso mattone (luce)	rosso-arancio (luce e buio)	bianco	bianco, rosso-arancio
Aspetti biochimici								
Catalasi	+	+	+	- (+/-)	+++	+++	++	++
Rosso neutro	rosso	rosso	rosso	giallo	rosso mattone	rosso mattone	giallo	giallo
Tioglicolato	non cresce (6 sett)	cresce (4 sett)	cresce (4 sett)	cresce (1-2 gg)	cresce (2-4 sett)	cresce (2-4 sett)	cresce (2-4 sett)	cresce (1-2gg)
Niacina	+	-	-	-	-	-	-	-
Auramina	+ giallo	+ giallo	+ giallo	-	+/- arancio	+/- arancio	+/- arancio	-
Aspetti biologici								
Topo	+	++	++	-	+	-	+/-	-/+
Cavia	+++	+++	-	-	-	-	-	-
Coniglio	+/-	+++	++	-	-	-	-	-
Pollo	-	-	+++	-	-	-	-	-
Note	A	B	C	D	E	F	G	H

NOTE
A = non cresce a 45 °C e sotto i 25 °C. *Optimum* a 34-37 °C in 3-6 settimane
B = non cresce a 45 °C e sotto i 25 °C. *Optimum* a 34-37 °C in 3-6 settimane
C = cresce a 45 °C ma non a 25 °C
D = cresce in 1-2 settimane a 25 °C
E = cresce lentamente in 1-2 settimane a 25 °C
F = cresce lentamente in 1-2 settimane a 25 °C
G = pleomorfo, colonie tipo *M. tuberculosis*. Cresce a 25 °C in 1-2 settimane
H = cresce in 1 settimana a 25 °C
I numeri I, II, III e IV si riferiscono alla classificazione di Runyon

STRUTTURA DEI MICOBATTERI ATIPICI

Assomigliano molto ai germi classici della tubercolosi, sia per struttura che per metabolismo. Possiedono *antigeni strutturali* che si trovano sulla parete della cellula batterica e che costituiscono un mosaico complesso, formato essenzialmente da arabinogalattano (comune a *Nocardia* e ad alcuni miceti), da peptidoglicolipidi e da micosidi (tipo A, C, G).

Questi ultimi sono responsabili delle differenze fra sierotipi. Si possono riconoscere attraverso cromatografia e stanno alla base della siero-agglutinazione.

Le specie *avium* e *intracellulare* non sono differenziabili sotto il profilo morfologico, colturale, biochimico e perciò sono riunite in un unico "*complex*", ricco di 28 sierotipi. Difatti, sierologicamente, i tipi da 1 a 3 sono attribuiti alla specie *avium*, quelli da 4 a 28 alla specie *intracellulare* (Koppers *e Coll*., 1991).

I peptidoglicolipidi presentano un "*core*" comune a tutti i sierotipi e differenze nei 4 oligosaccaridi attaccati, che determinano la specificità antigenica individuale.

Poiché lo stesso zucchero può trovarsi in due sierotipi diversi, si spiegano le *reazioni crociate* che si verificano in sierologia.

Esistono infine gli acidi micolici, che contribuiscono alla impermeabilità delle cellule batteriche verso farmaci e coloranti.

Si riteneva in passato che gli acidi micolici dei tubercolari classici (umano e bovino), avendo 24 atomi di carbonio, fossero diversi da quelli dei saprofiti, con soli 20-22 atomi.

Lechevalier *e Coll*. (1971) hanno dimostrato che questa differenza non esiste. In pratica, la differenza fra gruppi di micobatteri per contenuto in lipidi, glicolipidi e peptidoglicolipidi è quella riassunta nella tabella 5 (Gastambide-Odier, 1972):

Tabella 5 – Differenze chimico-strutturali fra micobatteri

Composti chimici	Micobatteri umani	Micobatteri bovini	Micobatteri atipici
Dimicocerosato di ftiocerolo	+	+	-
Micoside B	-	+	-
Micoside A / G	-	-	+
Acidi aminati nei polisaccaridi delle cere D	+	-	+

Esistono anche *antigeni citoplasmatici*, che si possono estrarre sottoponendo le cellule agli ultrasuoni. Intervengono nelle reazioni di immunodiffusione e di immunoelettroforesi.

Alcuni antigeni (4-5) sono comuni a tutti i micobatteri e pertanto caratterizzano il genere *Mycobacterium*.

Almeno due antigeni sono specifici dei micobatteri a lenta crescita e altrettanti di quelli a rapida crescita (comuni alle nocardie). Da due a otto antigeni sono poi caratteristici per ogni singola specie.

BIOCHIMICA DI LABORATORIO DEGLI ATIPICI

Alcuni *test* biochimici, già applicati in batteriologia, sono stati ripresi per identificare i micobatteri, apportando in qualche caso delle modifiche per aggirare l'impermeabilità delle cellule. Queste ed altre prove sono descritte in dettaglio nella Parte Seconda (Tecnica di laboratorio).

Tabella 6 - Prove biochimiche differenziali per micobatteri atipici (con riferimento anche ai batteri classici tubercolari)

Velocità di crescita	Pigmento	Pigmento foto-attivato	*Test* dei nitrati	Crescita su MacConkey Agar	*Test* della catalasi	Crescita con Tween-80	*Test* della niacina	Resistenza a TCH	Tolleranza a NaCl	Specie
rapida	+	+								*vaccae*
		-							+	*phlei*
									-	*diernhoferi*
	-		+	+						*fortuitum*
									+	*smegmatis*
									-	*diernhoferi*
			-						+/-	*chelonae*
lenta	+	+	+							*kansasii*
			-			+				*marinum*
						-				*simiae*
		-	+						+	*flavescens*
									-	*szulgai*
			-		+	+				*gordonae*
						-				*scrofulaceum*
					-					*xenopi*
	-		+				+			*tuberculosis*
							-		+	*triviale*
									-	*terrae*
			-		+					*ulcerans*
					-	+				*gastri*
						-		+		*avium*
								-		*bovis*

TCH = tiophen-2-carboxylic acid hydrazide

DUE SPECIE DI RILEVANTE IMPORTANZA EPIDEMIOLOGICA:

***1) M. avium-intracellulare* complex**

Le prove di ibridazione del DNA hanno chiarito che si tratta di due specie distinte, molto vicine ad altre due (*M. scrofulaceum* e un'altra specie non ben definita). L'immunodiffusione ha poi dimostrato che esistono ampie correlazioni antigeniche con *M. lepraemurium* (agente della lebbra del ratto, non coltivabile sui terreni batteriologici) e con *M. paratuberculosis* (agente della malattia di Johne dei ruminanti). Nella specie *avium* sono poi state proposte tre ulteriori divisioni, sulla base degli acidi nucleici e dei caratteri fenotipici, in altrettante sottospecie: *avium*, *paratuberculosis*, *silvaticum.*

M. avium cresce in meno di due settimane su terreno di Löwenstein-Jensen con colonie lisce, umide, non pigmentate e su terreno liquido in forma di abbondante sedimento mucoide. Biochimicamente è negativo verso catalasi, urea, nitrati. Reagisce positivamente verso nicotinamide, pirazinamide, Tween 80 (in 5 giorni).

Le differenze fra *avium* e *intracellulare* non sono molto marcate, ma fanno eccezione le seguenti proprietà specifiche del *M. avium*: negatività all'arilsulfatasi dopo 3 giorni (*intracellulare* diventa positivo dopo 10 giorni), capacità di crescere anche a 43 °C, magggior patogenicità, agglutinabilità dai sieri diagnostici 1-2-3 (mentre i restanti sieri da 4 fino a 24 agglutinano *intracellulare*).

2) *M. paratuberculosis, agente eziologico della paratubercolosi (morbo di Johne)*
Le differenze tra *M. paratuberculosis* ed altre specie sono riportate nella descrizione delle malattie provocate nell'uomo e nel bovino.
Dal punto di vista del laboratorio, questo microrganismo richiede terreni addizionati di *Mycobactin* per poter crescere.

Caratteri biochimici indici di patogenicità

Le specie patogene presentano un interesse evidente, essendo causa di malattie croniche spesso non trattabili con i chemio-antibiotici validi nella lotta contro la tubercolosi.

Inoltre i pazienti infetti da micobatteri non tubercolari sono spesso ricoverati assieme ai malati di tubercolosi e la loro malattia non viene diagnosticata subito, ma dopo un periodo d'incertezze.

Neppure la prova biologica può essere d'aiuto, poiché l'inoculazione della cavia non provoca la morte dell'animale.

Alcuni caratteri biochimici possono viceversa servire da prove indirette di patogenicità e anticipare quindi la prognosi: il riconoscimento del fattore cordale, la riduzione del blu di metilene, la reazione al rosso neutro, la prova dell'auramina (*vedi anche Parte Seconda – tecnica di laboratorio*).

Middlebrook *e Coll*. (1947) hanno osservato che i bacilli, visti al microscopio, quando si orientano in corde sono virulenti, mentre quelli avirulenti si ammassano in modo irregolare.

La sostanza che agisce come fattore cordale, isolata da Bloch nel 1950, ha proprietà tensioattive.

Chimicamente si tratta di 6-6' dimicolato di trealosio e la sua sintesi può essere indotta trattando i batteri con Triton A-20-D-4, un agente non ionico attivo sulla tensione superficiale, per cui un ceppo virulento si trasforma in virulento.

La virulenza non può essere legata solo al fattore cordale, ma anche ad altri composti chimici, tra cui sulfolipidi, cere D, dimicocerosato di ftiocerolo, micosidi A e G. Difatti esistono in natura ceppi avirulenti (come il ceppo BCG) che formano corde e altri virulenti, come *M. bovis*, che non le formano.

Bloch, inoltre, ha dimostrato che i bacilli virulenti non riducono il blu di metilene o altri coloranti del gruppo fenolo-indofenolo perché possiedono un rivestimento superficiale, che impedisce alla deidrogenasi batterica di entrare in contatto con il substrato.

Per di più, eliminando mediante estrazione il fattore cordale, il ceppo riduce il blu di metilene.

Middlebrook (1947) ha visto che le sostanze acide presenti in superficie sulla parete batterica dei ceppi virulenti (acidi micolici, cere D, sulfolipidi) esplicano un'azione di salificazione sul colorante rosso neutro, per cui essi si colorano in rosso, mentre gli atipici (qualora non virulenti) si colorano in giallo.

La reazione positiva può essere neutralizzata aggiungendo alla coltura un tensioattivo (Tween 80).

MECCANISMI DI PATOGENESI E DI RESISTENZA ALL'INFEZIONE

Studi in umana riguardanti le forme polmonari hanno messo in evidenza che i micobatteri atipici non si discostano dai patogeni tradizionali quanto a meccanismi d'insorgenza dell'infezione. Difatti è stato osservato che:

- nei pazienti infetti da HIV, le infezioni disseminate da atipici avvengono solo dopo che il numero di linfociti-T $CD4^+$ è sceso sotto il valore di 50/ mcl, suggerendo che i prodotti delle cellule T sono richiesti per la resistenza batterica;
- nei pazienti non infetti da HIV, sindromi genetiche di infezioni disseminate da atipici sono state associate a specifiche mutazioni nella sintesi dell'interferon IFN-γ e dell'interleuchina IL-12.

I micobatteri, al pari di altri microrganismi, vengono inizialmente fagocitati dai macrofagi, che rispondono con la produzione di IL-12 (interleuchina), che a sua volta sovraintende alla produzione di IFN-γ (interferon). Quest'ultimo induce i neutrofili e i macrofagi ad uccidere i germi patogeni intracellulari.

Si instaura una reazione positiva fra IFN-γ e IL-12, che è critica per controllare l'infezione.

In effetti, le infezioni da atipici sono l'espressione di un difetto immunologico acquisito (nel caso dell'HIV) o iatrogeno oppure genetico (Griffith *e Coll*., 2007).

RESISTENZA AI DISINFETTANTI

I micobatteri sono, fra i microrganismi non sporigeni, i più resistenti ai disinfettanti chimici. Hanno, teoricamente, una parziale efficacia i fenoli sintetici (ortofenilfenolo), i cresoli (lisolo), formaldeide, glutaraldeide, ipocloriti e cloramine, gli iodofori.

Da prove eseguite su *M. chelonae* (rappresentante dei micobatteri a rapida crescita, IV gruppo di Runyon) si ricavano i seguenti dati, che offrono un'idea della sensibilità verso alcune sostanze chimiche (tabella 7):

Tabella 7 - Comportamento dei micobatteri atipici verso alcuni disinfettanti, sull'esempio di *M. chelonae*

Disinfettante	*Concentrazione*	*Tempo di sopravvivenza*	*Autore*
Formaldeide in soluzione acquosa	2%	24 ore	Carson *e Coll*., 1978
Cloro libero a pH 7	0.3 – 0.7 mcg/ml	60 minuti	
Glutaraldeide alcalina	2%	60 minuti	
Glucoprotamina	2500 ppm	15 minuti	Meyer *e Coll*., 1999
Acido ipocloroso	60mg/l/min (dose di clorazione degli acquedotti)	Riduce la concentrazione di 1.5 log	Le Dantec *e Coll*., 2002

La presenza degli acidi micolici nella membrana dei micobatteri giustifica la notevole resistenza che essi possiedono verso clorazione e ozonizzazione. Per questo l'acqua viene considerata il serbatoio primario degli atipici (Field *e Coll*., 2006).

La resistenza ai disinfettanti viene ricordata anche da Griffith *e Coll*. (2007), che citano lo scarso effetto dell'ammonio quaternario, dei fenoli e degli iodofori. Inoltre, la forte resi-

stenza degli atipici al cloro spiegherebbe la sopravvivenza di questi germi nelle piscine, nelle vasche ad uso terapeutico, nelle docce e in tutti i luoghi in cui la disinfezione esercita la sua efficacia verso gli altri microrganismi, ma non verso i micobatteri, che, di conseguenza, non avrebbero più competitori.

ANTIBIOTICI E FARMACO-RESISTENZA

Per anni le forme tubercolari (tipiche e non) sono state trattate con una selezione di antibiotici universalmente accettati, comprendente idrazide dell'acido isonicotinico (INH), streptomicina, acido para-amino-salicilico (PAS), etambutolo, rifampicina e pochi altri.

Tuttavia i micobatteri atipici presentano una resistenza notevole all'acido para-amino-salicilico e variabile all'isoniazide e alla streptomicina, mentre sono generalmente sensibili a etionamide, cicloserina, capreomicina, tiocarlide, rifampicina.

Con la scoperta di nuove molecole, la gamma di sostanze a disposizione per trattare i micobatteri in generale si è ampliata notevolmente, facendo registrare successi e insuccessi, come appare nella seguente raccolta di dati (tabella 8):

Tabella 8 - Esperienze fatte *in vitro* da diversi Autori nel trattamento antibiotico di infezioni tubercolari da micobatteri atipici

Famiglia	Antibiotico	Specie batterica	Concentrazione minima inibente mcg/ml di terreno	Autore
Rifamicine	Rifampicina	*M. marinum*	0,5	Aubry *e Coll.*, 2000
	Rifabutina		0,06	
Tetracicline	Minociclina		4	
	Doxyciclina		16	
Macrolidi	Claritromicina		4	
	Azitromicina		128	
Penicilline	Imipenem		8	
Aminoglicosidi	Amikacina		4	
	Etambutolo		4	
Sulfamidici	Trimethoprim		128	
	Sparfloxacina		2	
	Moxifloxacina		1	
	Ciprofloxacina		8	
	Ofloxacina		16	
	Levofloxacina		8	
	Gatifloxacina	*M. fortuitum*	<0,12	Brown-Elliot *e Coll.*, 2002
		M. chelonae	<4	
Macrolidi	Roxitromicina	*M. malmoense, marinum, kansasii, scrofulaceum, avium, triviale*	0,5	Rastogi *e Coll.*, 1993
		M. szulgai, terrae, chelonae	1	
		M. xenopi, gastri	0,25	
		M. fortuitum	4	

Tenuto conto che quanto preso dalla letteratura si riferisce a prove *in vitro*, spesso eseguite su ceppi di laboratorio, va ricordato che la sensibilità dei micobatteri atipici può discostarsi notevolmente, soprattutto *in vivo,* dagli antibiogrammi allestiti sui primi isolamenti.

Difatti parecchi Autori sono abbastanza concordi nel riconoscere all'intera gamma degli atipici una netta predisposizione al fenomeno della resistenza.

Ad esempio, Casal *e Coll*. (1987) hanno visto che *M. chelonae* e *M. avium* sono spesso resistenti alla ticarcillina, anche in associazione con acido clavulanico e che dosaggi elevati di questi due farmaci inibiscono solo il 30% dei ceppi di *M. fortuitum*.

Nash *e Coll*. (2006) hanno constatato che tra i micobatteri a rapida crescita molte specie (*M. abscessus, M. chelonae, M. fortuitum, M. godii, M. houstonense, M. mageritense, M. wollinskyi*) sono resistenti ai macrolidi per la presenza di un gene *erm.*

Si ritiene che l'antibiogramma – desiderabile, ma di lunga esecuzione – non debba influire sull'inizio del trattamento, ma che sia utile per orientare il clinico verso la continuazione o meno della terapia (Holland, 2001).

Soprattutto nei casi di ripetizione del trattamento, è più frequente la comparsa di resistenze, per cui un certo tipo di farmaco non è più efficace e andrebbe rifatto l'antibiogramma.

Field *e Coll*. (2006) sono del parere che le prove di sensibilità andrebbero fatte solo per i ceppi di atipici clinicamente significativi. Le prove verso la claritromicina sono raccomandabili per il complesso *avium*. Invece sarebbe da evitare il *test* di *routine*, poiché i risultati non corrispondono alla risposta clinica del trattamento, anche se i ceppi possono essere più sensibili ad associazioni più che a singoli antimicobatterici.

Va inoltre tenuto presente che i soggetti HIV possono avere infezioni policlonali da *M. avium*, per cui i diversi ceppi possono avere differenti profili di sensibilità.

Il *test* con rifampicina è utile nel caso di *M. kansasii*, perché può predire insuccessi nel trattamento. Per i ceppi resistenti *in vitro* a rifampicina può valere un *test* successivo verso isoniazide, etambutolo, streptomicina, claritromicina, amikacina, ciprofloxacina, cotrimoxazolo e rifabutina.

La stessa procedura in due tempi può essere estesa alle specie *xenopi*, *malmoense* e *simiae*. I micobatteri a rapida crescita possono essere testati verso amikacina, cefoxitina, ciprofloxacina, claritromicina, doxyciclina, imipenem e cotrimoxazolo.

TERAPIA

Il trattamento farmacologico è spesso reso difficile perché i ceppi isolati presentano, almeno *in vitro*, una resistenza ai principi attivi tradizionalmente impiegati nella terapia delle infezioni da micobatteri.

Associando tre o cinque principi attivi, tra i quali etambutolo, streptomicina, rifampicina, clofazimina, ciprofloxacina, isoniazide e amikacina si osserva spesso una riduzione della batteriemia e un miglioramento della sintomatologia, perlomeno nelle infezioni più gravi, notoriamente sostenute dal complesso *avium/intracellulare*.

Tuttavia, una terapia che preveda l'uso prolungato di diversi farmaci associati, con un incremento notevole della tossicità, è talvolta inapplicabile in pazienti fortemente debilitati (Field *e Coll*., 2006).

Sono stati pertanto studiati principi attivi da impiegare singolarmente e buoni risultati si sono visti con i macrolidi claritromicina e azitromicina. Entrambi i farmaci penetrano nei macrofagi e inibiscono la moltiplicazione intracellulare del microrganismo se impiegati per 8-12 settimane alle dosi, rispettivamente, di 500-2000 mg/die e di 500 mg/die.

Oltre a questi, è stata impiegata con buoni risultati la rifabutina a 300 mg/die (Henderson *e Coll.*, 1994).

Un'ampia rassegna sul problema dei trattamenti antibiotici è stata redatta da Griffith *e Coll.* (2007) negli USA. In particolare, questi Autori si sono soffermati nell'ambito della terapia per le forme polmonari sostenute da *M. avium complex*. Le loro raccomandazioni in questo senso sono sintetizzabili come segue (tabella 9):

Tabella 9 - Proposta di trattamento delle infezioni polmonari da *M. avium* complex secondo Griffith *e Coll.* (2007)

	Terapia iniziale per malattia nodulare / bronchiectasia	Terapia iniziale per malattia cavitaria	Malattia avanzata (grave) o previamente trattata
Macrolidi	Claritromicina 1000 mg per tre volte a settimana	Claritromicina 500-1000 mg/die	Claritromicina 500-1000 mg/die o azitromicina 250-300 mg/die
Etambutolo	25 mg/kg tre volte a settimana	15 mg/kg/die	15 mg/kg/die
Rifamicine	Rifampin 600 mg tre volte a settimana	Rifampin 450-600 mg/die	Rifabutina 150-300 mg/die o rifampin 450-600 mg/die
Aminoglicosidi	Nessuna	Streptomicina o amikacina o nessuna	Streptomicina o amikacina

PROPRIETÀ UTILIZZATE IN FARMACEUTICA

A differenza di altri microrganismi divenuti utili e quindi sfruttabili per fini economici, per gli atipici si conoscono finora pochi impieghi industriali. Una proposta di interesse pratico riguarda la produzione di riboflavina, che si può ottenere facendo fermentare dal *M. phlei* le melasse di barbabietola. È richiesta per questa reazione un' incubazione sotto agitazione per 6 giorni al buio (Ghozlan, 1994).

CAPITOLO II

Distribuzione dei micobatteri in natura

MICOBATTERI ATIPICI NELL'UOMO

Sono chiamate *micobatteriosi* le affezioni provocate da micobatteri atipici o non tubercolari.

Vi fanno parte numerose specie, dotate di particolari caratteristiche sui terreni di coltura. Alcune sviluppano con lento accrescimento, similmente al *M. tuberculosis* classico (20-30 giorni), altre con accrescimento rapido (2-7 giorni). Per di più, alcune specie manifestano spontaneamente una colorazione giallo-arancione (o marrone) se le colture sono tenute alla luce (micobatteri fotocromogeni), altre sviluppano tale colorazione se le provette sono incubate al buio (micobatteri scotocromogeni), altre, infine, si mantengono "acromogene", cioè prive di colorazioni particolari, con lento o con rapido accrescimento (Mandler, 1963; Mariani, 1963).

Sulla base di tali proprietà fenotipiche è tuttora valida la classificazione in quattro gruppi proposta da Runyon nel 1965, in cui si trovano, tra gli altri, i micobatteri atipici elencati nella tabella 10.

La tassonomia dei micobatteri ha però subìto negli ultimi anni notevoli cambiamenti, dovuti al passaggio dall'approccio fenotipico a quello genotipico. La tassonomia basata sul genotipo si è sviluppata in seguito all'individuazione di regioni altamente conservate all'interno del genoma, regioni quindi ideali per gli studi tendenti ad evidenziare affinità o diversità utili ai fini tassonomici. La conseguenza più appariscente del passaggio dall'approccio fenotipico a quello genotipico è stato l'aumento di specie facenti parte del genere *Mycobacterium*. Ad oggi le specie ufficialmente riconosciute sono infatti circa 130.

Tabella 10 - Prospetto delle specie atipiche più importanti nell'uomo (secondo Pelczar, 1977)

A lenta crescita	1. Fotocromogeni	*M. kansasii*	Solitamente patogeno, può causare malattia polmonare, avendo alcune caratteristiche simili al bacillo tubercolare; può colpire anche i linfonodi cervicali. Sensibile a INH, ETA e rifampicina
		M. marinum	Solitamente patogeno. Causa il granuloma da piscina; presente solo in lesioni cutanee, mai nello sputo; Sensibile a rifampicina, ETA, doxi- e claritromicina
		M. simiae	Isolato recentemente da casi simil-tubercolari. Resistente ai farmaci tubercolari. Abitualmente non patogeno
	2. Scotocromogeni	*M. scrofulaceum*	Usualmente non patogeno. Raramente causa malattie polmonari. Può dare malattie ai linfonodi. Resiste agli antitubercolari
		M. szulgai	Causa di polmoniti, adeniti e bursiti. Sensibile a etambutolo, isoniazide e rifampicina
	3. Non cromogeni	*M. avium* complex *(o intracellulare)*	Entrambe le specie usualmente patogene. Possono causare malattie polmonari. Molti ceppi sono resistenti agli antitubercolari
		M. xenopi	Abitualmente non patogeno, può causare malattia polmonare o ai linfonodi. Sensibile a INH, ETA, rifampicina e claritromicina
		M. ulcerans	Usualmente patogeno. Trovato in lesioni superficiali

A rapida crescita		*M. fortuitum*	Di solito non patogeno nelle affezioni polmonari. Frequentemente isolato da lesioni alle estremità. Resiste agli antitubercolari
		M. chelonae	Agente di ascessi in ferite da puntura. Resiste agli antitubercolari

La frequenza delle micobatteriosi varia da paese a paese: in Italia corrisponderebbe al 2-7% di tutte le forme sostenute da micobatteri, mentre i casi più numerosi - sino al 15-25% - sono registrati in Giappone. La comparsa dei malati di HIV/AIDS ha aumentato dappertutto (non solo negli USA e in Inghilterra) il numero dei colpiti da MOTT (*Mycobacteria other than tuberculosis*), con forte prevalenza del complex *avium/intracellulare* (Pozniak *e Coll*., 1999).

Nell'uomo le specie più frequentemente responsabili di micobatteriosi sono: *avium/intracellulare, kansasii, fortuitum, xenopi*.

Oltre a casi singoli, sono segnalati alcuni focolai micro-epidemici domiciliari o intraospedalieri (da *M. xenopi*) o in comunità chiuse, probabilmente in seguito a contaminazioni nelle tubature dell'acqua o nei condizionatori d'aria. La trasmissione interumana non è però documentata.

Le forme polmonari hanno maggiore incidenza nell'età adulta, mentre in alcune forme extrapolmonari e linfoghiandolari predominano nettamente i soggetti in età pediatrica.

Il rischio di micobatteriosi (specialmente quelle sostenute dal complesso del *M. avium*) riguarda soprattutto individui con poche difese immunitarie a causa di altre malattie pregresse o compromessi per HIV.

Le lesioni non sono diverse da quelle manifeste nelle forme tubercolari classiche: difatti il granuloma da MOTT è frutto di linfociti CD4, macrofagi, cellule epitelioidi e giganti, con centri necrotico-caseosi di varia ampiezza. I bacilli alcool-acido resistenti si vedono all'interno dei macrofagi e delle cellule epitelioidi e giganti, nelle quali si moltiplicano. Gli individui infettati da MOTT acquistano uno stato immunitario-allergico come nella tubercolosi, per cui diventano positivi ai *test* allergici cutanei specifici per la specie interessata, con possibilità di ampie di reazioni crociate con altre specie e con i micobatteri tubercolari classici.

Tabella 11 – Localizzazione dei principali micobatteri non-tubercolari (MOTT) nell'uomo

Gruppi di Runyon	Specie	Forme polmonari	Forme extra-polmonari							
			Setticemica	Intestinale	Oculare	Meningo-encefalica	Osteo-articolare	Uro-genitale	Ghiandolare-linfatica	Cutanea
I = fotocromogeni	*kansasii*									
	marinum (balnei)									
	simiae									
II = scotocromogeni	*scrofulaceum (aquae)*									
	ulcerans									
	szulgai									
	xenopi									
III = non cromogeni	*avium/intracellulare/ paratuberculosis*									
	malmoense									
	haemophilum									
	genavense									
IV = a rapida crescita	*fortuitum*									
	chelonae (abscessus)									

MICOBATTERIOSI POLMONARI

Le manifestazioni assomigliano a quelle della tubercolosi classica, con quadri infiltrativi, noduliformi, cavitari (dai ceppi di *M. kansasii* e *xenopi*) o con focolai variamente disseminati (*avium/intracellulare*), talvolta con diffusi interessamenti a livello interstiziale e fibrosi (De Ritis, 1963).

Ricken *e Coll*. (1977) citano un caso di tubercolosi polmonare con formazione di caverne in un paziente colpito da *M. borstelense*.

Blacklock *e Coll*. (1983) citano anche *M. asiaticum* quale responsabile di malattie polmonari in Australia.

Horsburgh (1996) negli USA limita l'eziologia delle forme polmonari essenzialmente attorno al complesso *avium-intracellulare*.

Shih *e Coll*. (1997) attribuiscono nelle Filippine la maggior parte delle forme polmonari simil-tubercolari ai seguenti micobatteri atipici: *avium-intracellulare, chelonae, abscessus, fortuitum.*

I sintomi sono: tosse, dispnea, rialzi termici, astenia, sudorazioni, cali ponderali. Detta sintomatologia assume carattere più attenuato e appena percettibile nei casi cronici.

In associazione con l'AIDS si possono avere (fino al 50% dei casi) processi disseminativi, polmonari ed extrapolmonari (da *avium/intracellulare* e *kansasii*), con setticemia (Miguez-Burbano *e Coll*., 2006).

Griffith *e Coll*. (2007) riportano che dal 1990 in poi si sono osservati negli USA e in Europa frequenti casi di infezioni polmonari da atipici in malati di fibrosi cistica (CF). I ceppi isolati in coltura erano prevalentemente *M. avium* complex in soggetti con età superiore a 40 anni e *M. abscessus* in età pediatrica. Le cause dell'associazione fra atipici e CF non sono chiare. La sorgente d'infezione potrebbe risiedere nell'acqua e la trasmissione potrebbe essere facilitata dalla lunga degenza.

Gli stessi Autori riferiscono su una "sindrome di ipersensibilità polmonare" attribuibile ad infezione da micobatteri del gruppo *avium.* Il fenomeno, inizialmente associato alla vita in zone paludose, è stato poi esteso a focolai non epidemici, ma sempre in relazione alla presenza di acqua (docce, piscine).

Una forma di ipersensibilità polmonare ad eziologia batterica (sempre da micobatteri atipici) è stata poi vista in personale addetto alla lavorazione di metalli che usano, nelle macchine, fluidi disperdibili in *aerosol.* Tra questi, paraffine, oli di pino, idrocarburi aromatici policiclici nei quali i micobatteri sopravvivono (ad esempio, *M. immunogenum*) a dispetto dei trattamenti dei fluidi con disinfettanti di vario genere.

Il complesso *Mycobacterium avium* (MAC)

Le malattie umane causate da MAC si verificano in tutto il mondo, ma predominano nelle aree temperate. L'incidenza negli USA è risultata di 3,2 casi per 100.000 abitanti, con un 50% di isolamenti di *M. intracellulare*. In Germania, invece, l'81% delle infezioni era causato da *M. avium.* Dappertutto si è registrato negli anni un leggero continuo incremento dei casi, anche escludendo dal conteggio i pazienti con AIDS.
Secondo Griffith *e Coll*. (2007), la differenza principale fra le due specie del *complex* consisterebbe nel fatto che *M. avium* darebbe in prevalenza forme generalizzate, mentre *M. intracellulare* forme localizzate.
Si sa per certo che i microrganismi MAC sono ubiquitari e possono provenire da acqua, suolo, paglia, piante, lettiere di animali e persino dalla polvere domestica. La presenza del batterio sarebbe superiore nelle aree costiere e nelle zone rurali.

Winthrop *e Coll*. (2011), in seguito all'analisi di numerosi dati epidemiologici, sostengono che la diffusione di forme polmonari simil-tubercolari da *M. avium* nell'uomo sarebbe di origine tellurica, perlomeno in zone come lo stato dell'Oregon negli USA, caratterizzato da scarsa popolazione, vaste aree desertiche, clima asciutto, elevata dispersione di polvere.
Il rischio maggiore di infettarsi proverrebbe inoltre, per l'uomo, dall'acqua dolce (<2% NaCl), seguita dalle feci degli uccelli (non da suini e bovini) dopo di che i batteri persistono nel suolo a lungo. I polli sono senza dubbio il serbatoio principale.
La diffusione dell'infezione avviene quasi invariabilmente in persone con *deficit* immunitario attraverso la mucosa bronchiale o intestinale, con colonizzazione dell'ileo ascendente. La concomitante ingestione di sostanze irritanti la mucosa (ad esempio, alcool, sostanze favorenti l'acloridria gastrica, antibiotici orali) porta a colonizzazione del tratto enterico superiore. I batteri si legano agli enterociti e alle cellule M, prima di trasferirsi alla lamina propria. Si verifica un marcato interessamento delle placche di Peyer e dei linfonodi mesenterici, accompagnato da erosioni intestinali e diarrea cronica.
Il 75% dei pazienti sviluppa entro un anno batteriemia, per cui i germi si possono localizzare nel fegato e nella milza. I ceppi virulenti possono invadere cellule diverse dai monociti e dalle cellule epiteliali e questo spiega la persistenza dell'infezione negli immunocompromessi (persone sottoposte a chemioterapia, terapia cortisonica, trapianto di midollo osseo, cuore, rene).
La fagocitosi e l'azione dei macrofagi o dei linfociti B fa scattare una risposta cellulare specifica che include l'attivazione di cellule T-*helper*, macrofagi, cellule T-citotossiche e cellule NK. Le citochine sono risultate capaci di uccidere *M. avium* entro i macrofagi coltivati *in vitro*.
In **pazienti HIV-negativi** la malattia polmonare da *M. avium* colpisce in prevalenza maschi di razza bianca dai 45 ai 65 anni con preesistenti affezioni polmonari (polmoniti ostruttive, bronchiectasie, polmoniti ricorrenti, tubercolosi classica, pneumoconiosi, carcinoma bronchiale). I sintomi variano (tosse produttiva cronica, dispnea, sudorazione, malessere, prostrazione, emottisi, febbre e perdita di peso). Circa il 75% dei malati mostra alla radiografia del torace un infiltrato che interessa i segmenti apicali e anteriori dei lobi superiori oppure densi infiltrati uni-lobulari o multi-lobulari interstiziali diffusi e anche noduli polmonari isolati. Si può avere anche una reazione pleurica. I micobatteri si possono isolare dall'espettorato anche in pazienti senza apparenti lesioni, ma che hanno disordini respiratori cronici. La malattia da *M. avium* può essere peggiore di quella da *M. intracellulare.*
In **pazienti HIV-positivi** l'infezione può essere a carico dell'albero respiratorio o dell'intestino, con forme sintomatiche o asintomatiche.
Le lesioni polmonari appaiono localizzate e senza segni di disseminazione. L'aspetto clinico è simile a quello che si osserva negli immunocompromessi AIDS-negativi ed è generalmente meno grave che nella tubercolosi. Si riscontrano tosse produttiva, dispnea, febbre, malessere, debolezza, rara emottisi. La diagnosi è resa difficile (anche alla radiografia) per somiglianze con altre malattie batteriche polmonari.
L'infezione generalizzata dà febbre intermittente, debolezza, perdita di peso, nausea, vomito, diarrea. Gli organi più interessati sono pelle, ossa, articolazioni, occhi, tiroide, bronchi, ghiandole surrenali, testicoli, cervello. Il tratto gastro-intestinale e polmonare rappresenta di solito il punto di partenza dell'infezione generalizzata (Inderlied *e Coll*., 1993).

MICOBATTERIOSI EXTRA-POLMONARI

Sono descritte:
– a livello **oculare**: ulcerazioni corneali, lesioni perforative (da *M. fortuitum*), successive spesso a pregressi traumi oculari;
– a livello **meningo-encefalico**: infezioni da *M. kansasii, fortuitum*;
– alla **tiroide** si attribuiscono tiroiditi da *M. chelonae* (Ricken *e Coll*., 1977);
– **nell'apparato osteo-articolale**: artrosinoviti, osteomieliti da *M. kansasii, fortuitum, xenopi, szulgai, haemophilum;*
– nell'apparato **uro-genitale**: infezioni da *M. kansasii, xenopi, fortuitum*.

Più frequenti sono le micobatteriosi a livello delle **ghiandole linfatiche** e della **cute**:
– adenopatie da *M. scrofulaceum* e da *M. avium/intracellulare*, che avvengono nei primi anni di vita, con interessamento dei linfonodi cervicali, sottomandibolari, ascellari e formazione di ingorghi ghiandolari tendenti alla colliquazione e alla fistolizzazione. In qualche caso si sospetta un contagio attraverso latte contaminato. Nei bambini l'80-90% delle linfoadeniti subacute sarebbe provocato da *M. avium/intracellulare*, raramente da *M. scrofulaceum* e il 10% da *M. tuberculosis* (Inderlied *e Coll*., 1993);
– lesioni cutanee da micobatteri atipici risultano frequenti in Africa ed Asia, spesso impiantate su abrasioni e soluzioni di continuo della pelle, in soggetti abituati a camminare scalzi. Secondo Ho *e Coll*. (2006) in Cina le specie prevalenti sono *marinum* (51%), *avium-intracellulare* (9%), *chelonae* (6%).

Altre lesioni cutanee a carattere indurativo o ulcerativo possono essere causate da *M. marinum, ulcerans, fortuitum, chelonae, haemophilum.* Simili lesioni, concentrate al braccio e, in particolare, al gomito in seguito a urti o abrasioni, sono state viste in soggetti che frequentavano una piscina ed erano attribuibili ad una infezione da *M. marinum*.

Da un lavoro di Malkin *e Coll*. (2009) si legge di un caso di borsite sostenuto da *M. kansasii* in una paziente, trattata con farmaci anti-TNF, che mostrava sull'olecrano una pustola rossa, molle, fluttuante con fuoruscita di fluido, ma senza particolari segni (febbre, interessamento dei linfonodi, aumento della proteina C-reattiva, leucocitosi).

M. chelonae (*abscessus*) *e M. fortuitum* possono causare la formazione di ascessi da iniezione, per esempio in pazienti sotto trattamento immunosoppressivo dopo trapianto di rene o dopo iniezioni di insulina, preparati vaccinali e persino di antibiotici (Ricken *e Coll*., 1977), infezioni chirurgiche e post-traumatiche.

Freudenberger *e Coll*. (2006) segnalano anche un caso di infezione progressiva da *M. abscessus* (a rapida crescita) insorta dopo un trapianto di cuore. Si presentava con formazione di pustole e arrossamento alle gambe.

Notoriamente i micobatteri più diffusi nei pesci sono *marinum, fortuitum, chelonae* e queste specie sono state trovate a livello di lesioni cutanee di pescatori, venditori di pesce, e addetti ad acquari e vasche di allevamenti (Kullavanijaia *e Coll*., 1993; Lewis *e Coll*., 2003). È dimostrato che i pesci ornamentali sono portatori di micobatteri molto più frequentemente rispetto alle comuni specie ittiche commerciali (Pund *e Coll*., 2008).

L'acqua, i pesci e l'uomo

Ricken *e Coll*. (1977) tracciano il seguente quadro sulle infezioni trasmesse all'uomo dall'ambiente ittico (tabella 12):

Tabella 12 – Influsso dell'ambiente acquatico sulla diffusione dei micobatteri atipici

Micobatterio	Origine	Patologia cutanea	Altre localizzazioni
fortuitum	Acque costiere, fiumi e laghi	Ascessi, linfangiti, ulcere, sinoviti, cheratiti	Prostatiti, salpingiti, epididimiti, pleuriti, tubercolosi polmonare
scrofulaceum (o aquae)	Acque e prodotti della pesca	Dermatiti e linfadeniti nella regione facciale e cervicale con lesioni tipiche scrofolose, soprattutto nelle bambine sotto i 3 anni	Infezioni polmonari con formazione di caverne e micobatteriosi generalizzata a esito mortale nei pazienti immunosoppressi
chelonae (o abscessus)	Pesci e animali a sangue freddo in generale	Ascessi	
marinum (o balnei)	Acque salate naturali o di piscine, pesci e altri prodotti ittici	Eruzioni papulo-pustolose localizzate od estese note come granulomatosi da balneazione per frequentazione di piscine, osservate anche in marinai per contatto con l'acqua di mare	

Sono descritte anche micobatteriosi umane contratte per via digerente in seguito a consumo di pesce crudo contaminato da *M. marinum* o da *M. avium* complex.

M. avium subsp. _paratuberculosis_ (MAP) con possibile associazione a malattie nell'uomo: morbo di Crohn, diabete mellito tipo 1, sclerosi multipla

Le somiglianze cliniche e istopatologiche fra paratubercolosi intestinale bovina (*Johne's disease*) ed enterite cronica granulomatosa (*Crohn's disease*) nell'uomo sono state descritte nel 1917 da Dalziel.
Per molti anni il germe non è stato mai osservato al microscopio o coltivato esaminando tessuti di pazienti con malattia di Crohn.
La malattia di Crohn è caratterizzata da un'infiammazione cronica dell'intestino a livello di ileo distale, colon e retto. Colpisce di preferenza i giovani e si presenta con dolori addominali, diarrea, febbre e deperimento organico, cui possono associarsi frequentemente forme articolari, cutanee ed oculari.
L'andamento della malattia è altalenante, con manifestazioni acute alternate a periodi di remissione apparente.
La malattia è diffusa prevalentemente nei paesi del nord Europa (Thorel, 1994).
Chiodini *e Coll.* (1986) avevano visto al microscopio elementi cellulari privi di membrana cellulare (detti sferoplasti), che successivamente si convertivano in bacilli alcool-acido resistenti.
Mishina *e Coll.* (1996), dopo 10-12 settimane d'incubazione, sono riusciti a isolare *M. avium* subsp. *paratuberculosis* su terreno MGIT (Beckton-Dickinson) seminando prelievi da malati di colite ulcerativa o da latte materno di donne affette da morbo di Crohn.
Il micobatterio, durante le prime settimane di coltivazione, non mostrava la membrana cellulare e solo in un secondo tempo assumeva la solita forma bacillare con la classica colorazione di Ziehl-Neelsen.
Bull *e Coll.* (2003) hanno isolato il germe con frequenza elevata (92%) da biopsie di mucosa ileo-cecale presso malati con morbo di Crohn.

Naser *e Coll.*(2004) hanno dimostrato con la tecnica PCR il frammento IS900, tipico del *M. avium* subsp. *paratuberculosis* nel sangue periferico di 28 individui malati.
Golan *e Coll*. (2009) hanno constatato che ceppi MAP invadono attivamente le cellule epiteliali del piccolo intestino, inducendo una forte infiammazione e provocando grave danno alla mucosa. Essi sono riusciti a riprodurre le lesioni tipiche del morbo di Crohn dell'uomo in topi con severa immunodeficienza, mediante inoculazione del germe in porzioni di intestino fetale trapiantato sottocute.
Recentemente è stato osservato che l'attività di un gene può influire nell'insorgenza delle infezioni da micobatteri (in particolare MAP), come pure del diabete mellito tipo 1 (Rosu *e Coll*., 2009).
Questo gene (NRAMP1) ha degli effetti sulla funzione dei macrofagi, essenziale sia per proteggere dalle infezioni batteriche (sotto forma di difese innate) che per intervenire nell'insorgenza e nello sviluppo delle malattie autoimmuni, regolando la produzione di differenti sostanze (tra cui citochine, TNF- a, interleuchina 1- ß).
Ricerche svolte in Sardegna, dove l'infezione da MAP è diffusa fra i ruminanti, hanno rivelato materiale DNA specifico del MAP presente nel 42% di ammalati di sclerosi multipla ed una significativa risposta immunologica umorale degli stessi pazienti verso la proteina del MAP (Cossu *e Coll*., 2011).

M. simiae

È stato descritto da Karasseva nel 1965 e deve il suo nome al fatto di essere stato isolato per la prima volta da una scimmia. Questo micobatterio, per lo più responsabile di colonizzazioni più o meno prolungate dell'albero respiratorio in soggetti affetti da pneumopatie croniche, talvolta può però causare malattia. Nella gran parte dei casi si tratta di pazienti anziani, affetti da altre patologie polmonari che riferiscono tosse produttiva e persistente, dispnea, febbricola e calo ponderale. Il quadro radiologico del torace è del tutto simile a quello di una tubercolosi.

M. simiae presenta un *pattern* di acidi micolici indistinguibile da altre specie di micobatteri e per questo motivo l'impiego dell'HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) non è utile per l'identificazione. Si rende pertanto indispensabile il ricorso a tecniche di biologia molecolare, quali il sequenziamento del rDNA 16s o l'ibridazione inversa.

La terapia delle infezioni da *M. simiae* è molto problematica, in quanto la gran parte degli isolati è resistente *in vitro* a tutti i farmaci antimicobatterici. È stato proposto uno schema terapeutico con claritromicina, moxifloxacina e cotrimoxazolo. La risposta alla terapia è imprevedibile.

M. xenopi

È stato isolato per la prima volta nel 1959 da un rospo, *Xenopus laevis*, da qui il suo nome. La principale fonte d'infezione sembra essere nelle condotte idriche. *M. xenopi* è stato frequentemente isolato dagli spruzzatori delle docce ed è quindi probabile che l'infezione venga contratta per aerosolizzazione di acque contaminate.

Il paziente con pneumopatia da *M. xenopi* è generalmente un paziente anziano che presenta tosse persistente, febbricola e calo ponderale. Il radiogramma del torace mostra cavitazioni a parete sottile localizzate nel lobo superiore. *M. xenopi* viene isolato molto spesso da campioni clinici in assenza di malattia.

L'identificazione presuntiva di *M. xenopi* è facile, grazie alla caratteristica crescita a 45 °C e all'aspetto "a nido d'uccello" delle microcolonie. L'identificazione può essere confermata dal profilo HPLC degli acidi micolici o da tecniche di biologia molecolare (ibridazione inversa).

Non esistono ad oggi protocolli standardizzati per la terapia della pneumopatia.

M. celatum

Descritto nel 1993, biochimicamente assomiglia a *M. avium* e geneticamente a *M. tuberculosis*, per cui può dare *cross*-reazioni con sonde specifiche per MTb *complex*. Viene descritto in casi di linfadenite cervicale in soggetti normali, ma prevale in pazienti HIV-positivi, dove può dare forme polmonari simili alla tubercolosi o forme disseminate somiglianti a *M. avium* (febbre, debolezza, perdita di peso).

Si prospetta il trattamento con macrolidi ed etambutolo, eventualmente associati a rifabutina. La prognosi di pazienti con pneumopatia da *M. celatum* non è buona.

M. genavense

Scoperto nel 1990, può essere coltivato in laboratorio ricorrendo a terreni liquidi incubati in condizioni di microaerofilia. Richiede tempi d'incubazione molto lunghi.

Coyle *e Coll*. (1998) sono riusciti a isolare il germe unicamente con il sistema BACTEC 13A e solo in un secondo tempo è stato possibile avere successo con la coltura in Middlebrook 7H11 Agar supplementato con Mycobactin J.

M. genavense produce lesioni negli uccelli e nel cane, che sono possibili vettori. Nell'uomo sono descritte: lesioni cutanee localizzate, linfadenite cervicale, colangite sclerosante, una sindrome simile a quella di Whipples. Nei malati di AIDS dà forme disseminate, con febbre, perdita di peso, anemia e diarrea.

A causa della difficoltà di isolamento, i casi segnalati sono relativamente rari. Si ritiene che l'incidenza reale di forme disseminate in AIDS sia circa 1/10 di quella del MAC.

I trattamenti con claritromicina danno buoni risultati.

M. malmoense

Isolato a Malmö nel 1977, si trova comunemente nei fiumi della Svezia, dove è al terzo posto fra le cause di infezioni da micobatteri.

Assomiglia a *M. avium* per caratteri biochimici e molecolari. Dà linfadenite nei bambini e forme polmonari caratterizzate da infiltrati, linfadenopatia mediastinica, batteriemia nei malati di AIDS, particolarmente nell'ultimo stadio della malattia.

L'isolamento di *M. malmoense* da campioni clinici è quasi sempre associato a malattia.

Viene trattato con rifampicina, etambutolo, isoniazide per lunghi periodi (18-24 mesi).

M. haemophilum

Il suo *habitat* è poco conosciuto e si sa che cresce con difficoltà in laboratorio su terreni arricchiti con emina e ferro ammonio citrato, esigendo temperature d'incubazione attorno a 30 °C.

Colpisce i malati di AIDS causando febbre, perdita di peso, lesioni cutanee e sottocutanee specialmente alle giunture e alle estremità (forme eritematose e nodulari, formazione di scaglie, ulcere e pustole), tenosinoviti, piomiositi. Sono rare le forme polmonari.

È stato molto spesso isolato da linfonodi cervicali di bambini immunocompetenti. Viene curato finora con macrolidi e chinoloni.

Kay *e Coll*. (2011) riferiscono negli USA sulla comparsa di noduli eritematosi non dolenti a distanza di. 12 giorni dall'applicazione di un tatuaggio sull'avanbraccio, un caso scoperto in seguito al fallimento delle terapie antibiotiche classiche contro i piogeni. La diagnosi di infezione da *M. haemophilum* è stata fatta con PCR.

M. szulgai

È stato descritto per la prima volta nel 1972 da Marks. Viene isolato raramente dall'uomo, ma quando viene trovato è sempre associato a malattia. L'epidemiologia non differisce da quella di altri MOTT. Le infezioni più comuni sono quelle polmonari, più rare sono le infezioni dei tessuti molli.

La malattia polmonare ha un decorso subdolo e colpisce prevalentemente soggetti anziani affetti da precedenti patologie polmonari. RX del torace evidenzia infiltrati apicali e frequentemente cavitazioni a parete sottile.

In vitro risulta sensibile alla maggior parte dei farmaci antimicobatterici. Non esistono protocolli standardizzati per la terapia.

M. gordonae

È il micobatterio più ubiquitario. Può essere isolato con facilità da qualunque ambiente, dal suolo, dall'acqua marina, dall'acqua dolce non trattata e dall'acqua dolce trattata come potabile e acque delle piscine. Da questo deriva il suo vecchio nome, *M. aquae*.

La sua ubiquità rende conto del suo frequente isolamento da campioni clinici, soprattutto escreati e lavaggi gastrici. Viene ritenuto non patogeno.

M. heidelbergense

Non-fotocromogeno, a lenta crescita, è stato isolato da linfonodi cervicali di un bambino immunocompromesso. Risponde a trattamento con isoniazide (poco usata negli atipici).

M. lentiflavum

Associato a casi di linfadenite cervicale e spondilodiscite. Biochimicamente affine a *M. avium*, ha molti caratteri genetici in comune con le specie *simiae, genavense e intermedium.*

M. conspicuum

Ha dato infezione disseminata in soggetti immunocompromessi.

M. goodii

Marchendin *e Coll*. (2009) riportano una segnalazione di infezione da questo microrganismo a rapida crescita, che appartiene al gruppo dello *smegmatis* assieme alla specie *wolinsky*. La sede era il luogo d'impianto di un *pacemaker* ed il caso è stato risolto senza rimozione dell'apparecchio grazie ad un trattamento con doxiciclina.

M. kansasii

È un micobatterio fotocromogeno a lenta crescita, di isolamento molto frequente negli USA, ma abbastanza raro in Europa.

Il serbatoio naturale di *M. kansasii* non è ancora ben definito, anche se molti dati documentano la sua presenza nell'acqua potabile. La trasmissione all'uomo sembra avvenga per aerosolizzazione da fonti ambientali.

La malattia polmonare si manifesta soprattutto in soggetti affetti da patologie polmonari e neoplasie. Segni e sintomi sono aspecifici e comprendono tosse, calo ponderale, malessere generale, febbricola, emottisi.

Il radiogramma del torace mette in evidenza lesioni cavitarie o fibro-nodulari a carico del lobo superiore. Molto raro l'interessamento dei lobi inferiori e della pleura.

In vitro risulta generalmente sensibile ai farmaci antitubercolari di prima scelta, ad eccezione della pirazinamide.

Micobatteri a rapida crescita

Le specie di micobatteri che, in sub-coltura e dopo appropriata diluizione dell'inoculo, danno origine entro sette giorni dalla semina a colonie macroscopicamente osservabili su terreni solidi sono detti "a rapida crescita".

Tre specie hanno importanza in patologia umana: *M. chelonae, abscessus e fortuitum* complex.

Tutte queste specie hanno un particolare tropismo per il polmone e i tessuti molli. La corretta identificazione riveste un'importanza clinica notevole, in quanto queste specie differiscono per sensibilità agli antibiotici, virulenza e tasso di mortalità.

MICOBATTERI ATIPICI NEGLI ANIMALI

Tabella 13 – Principali micobatteri non-tubercolari (MOTT) negli animali

Gruppi di Runyon	Specie	Bovini	Suini	Equini	Ovi-caprini	Avicoli	Animali selvatici	Pesci	Rettili e anfibi	Cani e gatti
I = fotocromogeni	*kansasii*									
	marinum									
	simiae									
	asiaticum									
II = scotocromogeni	*scrofulaceum*									
	ulcerans									
	szulgai									
	xenopi									
	flavescens									
	gordonae (aquae)									
III = non cromogeni	*avium/intracellulare/ paratuberculosis*									
	malmoense									
	haemophilum									
	gastri									
	triviale									
	terrae									
IV = a rapida crescita	*fortuitum*									
	chelonae									
	phlei									
	vaccae									

MICOBATTERI ATIPICI NEL BOVINO

Morbo di Johne (Paratubercolosi)

La Paratubercolosi è una malattia cronica, infettiva e contagiosa a lungo periodo di incubazione, che colpisce in particolar modo i ruminanti domestici e selvatici, causando lesioni intestinali granulomatose localizzate in particolare all'ileo e al colon.

Studiata e descritta per la prima volta nel 1895 da Johne e Frothingham (1895), è nota anche come malattia di Johne (*Johne's Disease*).

Il ruolo eziologico di *Mycobaterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) fu definito con certezza quando Twort e Ingram (1913) riuscirono per primi a coltivare l'agente eziologico in laboratorio, aggiungendo alle colture un estratto di *Mycobacterium tuberculosis* che apportò un fattore di crescita essenziale per MAP, il *Mycobactin*.

Negli ultimi anni l'attenzione verso questa malattia è andata via via aumentando, a causa della crescente diffusione nell'allevamento bovino, ovi-caprino e negli animali selvatici, nonché per il possibile ruolo patogeno di MAP per l'uomo.

Diffusione

La Paratubercolosi rappresenta una delle malattie infettive più importanti per l'ampia diffusione e per i danni arrecati in zootecnia, in particolare nei bovini, dove il tipo di allevamento, le carenze di tipo igienico, le spinte sempre maggiori del punto di vista produttivo e la commercializzazione incontrollata di animali hanno favorito, negli ultimi anni, la diffusione dell'infezione e l'aumento di incidenza della malattia.

Come indicano numerose indagini su vasta scala condotte nei Paesi a maggiore vocazione zootecnica, la malattia è oggi diffusa in tutto il mondo; in Europa i dati di prevalenza apparente di allevamenti bovini infetti varia dal 38 al 68% (Nielsen *e Coll*., 2009).

In Italia sono state effettuate alcune indagini epidemiologiche utilizzando la ricerca sierologica sui singoli capi di un campione di allevamenti rappresentativi della popolazione generale.

In Veneto è stata stimata una prevalenza apparente (% di aziende con almeno un capo positivo) del 64,9% e del 26,73% di prevalenza reale (% di aziende infette corretta in base alle *performances* diagnostiche del *test* utilizzato), con un dato molto allarmante negli allevamenti con oltre 100 capi, nei quale la prevalenza corretta risulta essere del 48,81% (Robbi *e Coll*., 2002).

Analoghe indagini eseguite sul territorio lombardo hanno fornito risultati leggermente inferiori, dimostrando una prevalenza apparente del 43,7% e una prevalenza reale del 19,2% (Arrigoni *e Coll*., 2006); nella Regione Lazio è stata rilevata una prevalenza apparente del 42% delle aziende bovine (Lillini *e Coll*., 2005).

Caratteristiche del microrganismo

MAP è un batterio di piccole dimensioni (0,5 x 1,5 µm), acido-resistente, non sporigeno, immobile, aerobio. Per la crescita *in vitro* richiede la presenza di un agente chelante il ferro, il *mycobactin*, che ne permette l'assorbimento da parte della cellula; la *Mycobactin*-dipendenza è una caratteristica comune a quasi tutti i ceppi MAP conosciuti, ma può essere espressa da altri ceppi appartenenti a *M. avium group*, come *M. avium* subsp. *silvaticum* ed alcuni ceppi di *M. avium* subsp. *avium* (Thorel, 1991).

Un'altra caratteristica differenziale di MAP è la sua lenta crescita, che richiede 4-16 settimane a 37 °C per i ceppi bovini, ma può arrivare a 8 mesi per i ceppi ovini, o a periodi ancora più prolungati per i ceppi di origine umana.

Esso è dotato di elevata resistenza nell'ambiente, dove può sopravvivere per periodi prolungati: 163 giorni nelle acque di fiume, 270 giorni nelle acque stagnanti, 11 mesi nelle feci bovine e nel suolo, ma solo 7 giorni nelle urine (Chiodini *e Coll*., 1984).

In condizioni sperimentali, è stato dimostrato che la sopravvivenza di MAP nei liquami bovini è di 98 giorni a 15 °C, ma può raggiungere 252 giorni a 5 °C (Yorgensen, 1977).

Non si moltiplica nell'ambiente, ma solo nelle specie animali recettive, dove trova un *habitat* favorevole all'interno dei macrofagi.

Epidemiologia

La Paratubercolosi è una malattia tipica, ma non esclusiva dei ruminanti, in quanto altre specie animali (coniglio selvatico, carnivori) sono recettive all'infezione naturale e sperimentale, ed in alcuni casi possono manifestare i sintomi della malattia (Beard *e Coll*., 1999; Greig *e Coll*., 1999).

Mentre il ruolo epidemiologico dei ruminanti selvatici è dimostrato (Stevenson *e Coll*., 2009), altrettanto non si può dire per le specie animali non ruminanti, non essendo ancora completamente chiarita la loro capacità di diffondere MAP nell'ambiente in dosi infettanti. Fa eccezione il coniglio selvatico, che sembra essere in grado di eliminare MAP in dosi infettanti con le feci (Judge *e Coll*., 2005).

Essendo l'infezione localizzata elettivamente a livello intestinale, il materiale infettante di importanza primaria è appunto rappresentato dalle feci; gli animali infetti possono eliminare oltre 5 mila miliardi al giorno di micobatteri con le feci (Chiodini *e Coll*., 1984).

Nelle fasi avanzate di infezione, MAP diffonde a vari organi ed apparati e può essere presente in altri liquidi biologici come il latte, il seme e l'espettorato.

La recettività all'infezione è massima nel vitello fino a 6 mesi e diminuisce con l'aumentare dell'età, ma è ancora significativa fino a 12 mesi (Windsor *e Coll*., 2009).

Generalmente nei soggetti infettatisi da giovani con elevate quantità di MAP si manifestano più frequentemente i sintomi di malattia; tuttavia l'infezione è possibile anche negli adulti che vengano infettati con alte dosi di MAP (Windsor *e Coll*., 2009).

L'infezione si realizza generalmente nel vitello:

- per ingestione di materiale contaminato da feci di animali infetti (suzione da mammelle imbrattate da feci infette, lettiera, acqua e alimenti contaminati);
- per ingestione di colostro/latte infetto, che risulta contenere MAP nel 54% dei casi se proveniente da bovine con malattia clinicamente manifesta (Giese *e Coll*., 2000) e in percentuali variabili dall'8,3% (latte) al 22.2% (colostro) in caso di bovine con infezione subclinica (Streeeter *e Coll*., 1995);
- per via congenita (nel 39% dei soggetti nati da madre con malattia clinicamente manifesta e nel 9% dei soggetti nati da madri con infezione subclinica) (Whittington *e Coll*., 2009).

Oltre alla somministrazione di latte e colostro infetti, il principale fattore di rischio è quindi rappresentato dalla mancata separazione degli animali in gruppi omogenei per età.

L'inadeguatezza strutturale degli abbeveratoi e la conseguente mancata protezione dalla contaminazione fecale, così come la pratica della ferti-irrigazione possono rappresentare ulteriori fattori di rischio per la diffusione dell'infezione in allevamenti infetti.

La via più comune di introduzione dell'infezione in allevamento è l'acquisto di animali infetti, ma anche il contatto con ambienti infetti (partecipazione a mercati e fiere, condivisione di pascoli con animali infetti) o attrezzature contaminate.

Manifestazioni cliniche e danni economici

Nelle fasi iniziali le lesioni sono localizzate alla parete del piccolo intestino e ai linfonodi afferenti; negli stadi più avanzati le lesioni appaiono diffuse a digiuno, ileo, cieco, colon e linfonodi meseraici.

Le lesioni tipiche sono caratterizzate da un ispessimento della parete intestinale che assume un aspetto corrugato, cd. "cerebroide". I linfonodi intestinali appaiono aumentati di volume ed edematosi.

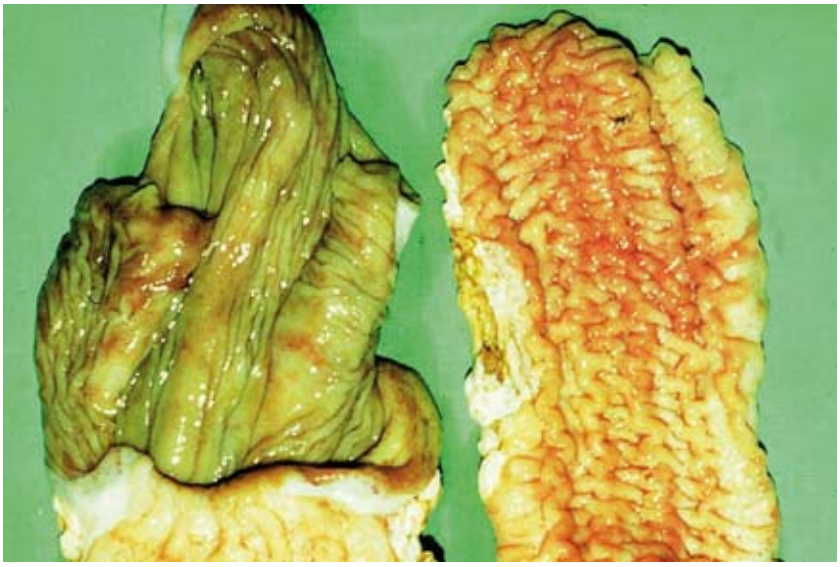
All'ispessimento della parete intestinale fanno seguito malassorbimento ed enteropatia proteino-disperdente, con conseguente bilancio energetico negativo e quindi, negli stadi più avanzati, cachessia.

Lesioni all'intestino tenue di bovino affetto da paratubercolosi

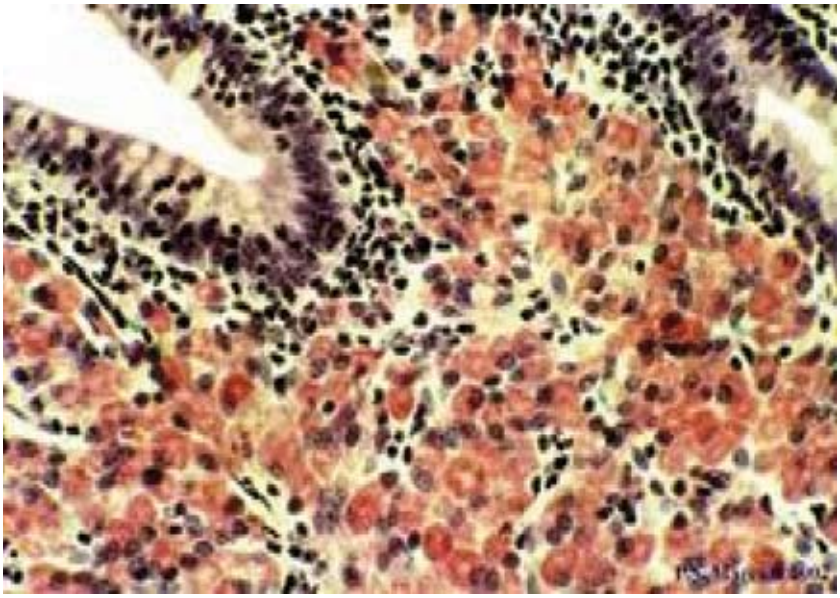
Il periodo di incubazione della malattia nel bovino può variare da alcuni mesi a diversi anni.

La malattia compare nel bovino generalmente alla seconda-terza lattazione, più frequentemente in prossimità del parto; in realtà la precoce riforma degli animali nei nostri allevamenti non permette alla malattia (che presenterebbe un picco intorno ai 4-7 anni) di manifestarsi appieno (Jubb *e Coll.*, 1999).

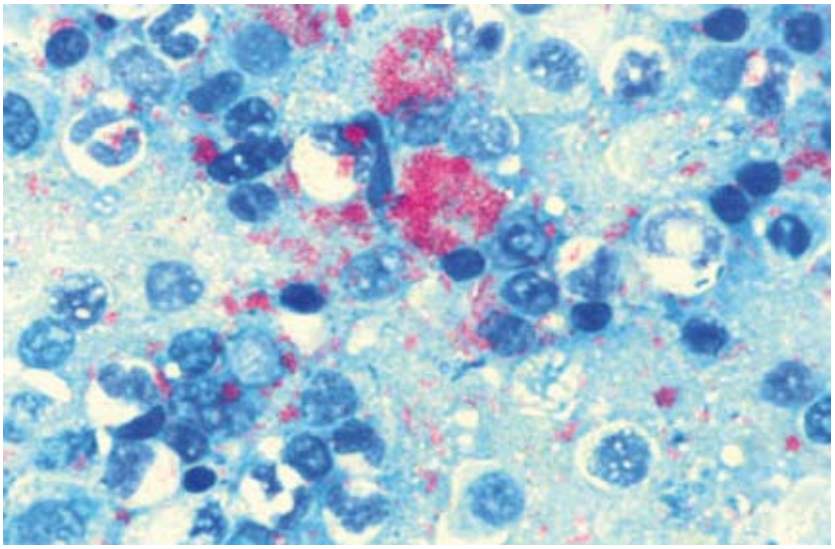
La comparsa di segni clinici alla prima lattazione è generalmente sintomo di elevata prevalenza in allevamento, con conseguente elevata pressione di contaminazione sui giovani animali.



Lesioni all'intestino di bovino affetto da paratubercolosi



Aspetti istologici delle lesioni intestinali da paratubercolosi nel bovino



Presenza di batteri alcool-acido resistenti (M. paratuberculosis) nella mucosa intestinale di bovino

Epitelio intestinale di bovino colpito da paratubercolosi

I sintomi iniziali sono inizialmente aspecifici: diminuzione dell'incremento ponderale, pelo ruvido e opaco, cute secca e anelastica, diminuzione della produzione lattea, ipofertilità, anemia, febbre intermittente, edema intermandibolare.

Nel bovino in seguito compare diarrea, talora molto profusa, cronica o intermittente, con periodi di remissione di settimane o mesi; in questa fase l'appetito è conservato.

Negli stadi terminali si ha anoressia, diarrea talvolta emorragica, edema nella regione dell'addome, depressione del sensorio, grave e progressivo scadimento delle condizioni generali, fino alla morte.

Nei piccoli ruminanti la diarrea è meno frequente e il periodo di incubazione è più breve.

L'impatto economico della Paratubercolosi, al di là delle perdite legate alle forme cliniche, è difficile da quantificare.

L'effetto negativo della Paratubercolosi sulla produzione lattea è ben documentato e stimato intorno al 20% nelle bovine colpite dalla forma clinicamente manifesta, e al 5% in quelle con infezione subclinica a bassa escrezione (Geoenendaal *e Coll*., 2002).

In bovini da carne con infezione subclinica si è osservata una significativa diminuzione dell'incremento ponderale (-13%) ed un peggioramento sia dell'indice di conversione degli alimenti (-10,2% per l'energia e -12,5% per la sostanza secca), che della valutazione della carcassa al macello (Cappa *e Coll*. 1989).

La maggiore incidenza di problemi di fertilità, di mastiti, o di altri problemi di natura sanitaria in soggetti infetti è stata segnalata, ma necessita di maggiori approfondimenti.

Non sono da sottovalutare anche i danni che potrebbero derivare dalla perdita di potenziale genetico a causa della macellazione precoce e la limitazione del commercio degli animali infetti o provenienti da allevamenti infetti, qualora l'Italia decida di perseguire la via del controllo dell'infezione, tracciata dalla maggior parte dei Paesi a vocazione zootecnica.

Il danno economico di maggior rilievo, negli allevamenti ad alta prevalenza d'infezione, è legato alla necessità, da parte dell'allevatore, di non forzare sulle produzioni, in quanto ciò potrebbe rappresentare un fattore condizionante alla comparsa delle manifestazioni cliniche.

Diagnosi

Per meglio orientare la diagnosi di Paratubercolosi ed interpretare i risultati del laboratorio, è necessario tenere presente la cinetica dell'infezione paratubercolare.

A seguito dell'infezione, si ha inizialmente una risposta di tipo cellulo-mediato, che declina nelle fasi successive, parallelamente allo sviluppo dell'immunità umorale e alla comparsa di escrezione fecale (Chiodini *e Coll*., 1984).

La risposta umorale aumenta progressivamente, a seguito del rilascio di un numero sempre maggiore di bacilli da parte dei macrofagi, per giungere alle fasi terminali di malattia, dove, in alcuni animali, può declinare (anergia terminale).

Uno degli ostacoli maggiori al controllo della Paratubercolosi è rappresentato dalla difficoltà di una diagnosi certa d'infezione, legata alla scarsa sensibilità dei test diagnostici, in particolare negli stadi precoci di infezione.

Diagnosi diretta

L'esame colturale delle feci è quello che permette una diagnosi più affidabile, in quanto, pur presentando una sensibilità limitata e molto variabile in funzione dello stadio di infezione (23-70%) dimostra una specificità del 100% quando confermata con metodiche PCR (Nielsen *e Coll*., 2008).

È però stata dimostrata recentemente la possibilità del transito passivo, che coinvolgerebbe, in ambienti altamente contaminati per la presenza di animali ad alta escrezione, un numero significativo di soggetti (Sweneey *e Coll*., 1992).

Non si possono inoltre sottacere i numerosi inconvenienti della coltura, quali i lunghi tempi di attesa per la risposta (fino a 16 settimane per i ceppi bovini, fino a 32 settimane per i ceppi ovini), i frequenti inquinamenti che ne inficiano il risultato, i costi elevati, la necessità di attrezzature e personale specializzato e dotato di esperienza.

I principali vantaggi delle tecniche di biologia molecolare (PCR) rispetto alla coltura fecale sono i tempi rapidi di risposta e la possibilità di mettere in evidenza ceppi ovini di difficile isolamento; recentemente, grazie all'introduzione di nuove procedure di estrazione mediante rottura meccanica della parete, la sensibilità della metodica PCR ha raggiunto valori praticamente sovrapponibili alle metodiche colturali (Taddei *e Coll*., 2006).

Tuttavia, i costi elevati e le possibili *cross*-contaminazioni in laboratorio ne limitano l'utilizzo sui grandi numeri, che viene riservato generalmente alla tipizzazione dei ceppi isolati in coltura o alla diagnosi diretta su animali con forma clinica.

Diagnosi indiretta

Il *test* di valutazione dell'immunità umorale attualmente più utilizzato è il *test* ELISA.

La sensibilità del *test* ELISA in allevamento infetto può variare, in funzione dello stadio di infezione, dal 7-39% (fasi iniziali asintomatiche con eliminazione fecale intermittente o assente) all'87% (sintomatologia clinica in atto) (Nielsen *e Coll*., 2008).

Il preadsorbimento dei sieri con *Mycobacterium phlei*, come previsto dal Manuale OIE, limitando la possibilità di reazioni crociate con micobatteri eterologhi, ha notevolmente migliorato la specificità del *test* ELISA, che risulta essere superiore al 99% (Nielsen *e Coll*., 2008).

Il *test* di immunodiffusione in gel di agar (AGID), di semplice e rapida esecuzione, a fronte di una specificità ottima, presenta una bassa sensibilità, inferiore al *test* ELISA nelle fasi pre-cliniche; per questo motivo se ne consiglia l'applicazione solo in bovini con sintomatologia clinica in atto.

Viene ancora utilizzato negli ovi-caprini e nei selvatici, in parallelo al *test* ELISA.

I *test* di valutazione dell'immunità cellulo-mediata (*skin test* e *test* del gamma-interferon), pur manifestando una buona sensibilità, dimostrano scarsa specificità (Nielsen *e Coll*., 2008).

Il principale vantaggio di tali *test* è la precocità di risposta e dunque la capacità di svelare le nuove infezioni negli animali giovani; al contrario, dato che gli animali in fase avanzata di infezione dimostrano un calo di reattività, tale *test* dimostra una scarsa correlazione con l'entità dell'escrezione fecale.

L'utilizzo di questo tipo di *test*, in particolare quello intradermico, facile da eseguire e a basso costo, potrebbe essere sostanzialmente quello di monitorare la diffusione dell'agente eziologico in allevamento e quindi di formulare un giudizio sulle misure di ordine igienico sanitario messe in atto a protezione dei vitelli.

È da ricordare inoltre che l'infezione da Map può essere causa di reazione para-allergica alla prova tubercolinica ed interferire quindi con i piani di eradicazione della tubercolosi bovina. In questi casi, data l'appartenenza di Map alla specie *Mycobacterium avium*, la prova comparativa (con tubercolina aviare o Johnina) è di valido aiuto nella diagnosi differenziale.

Controllo ed eradicazione negli allevamenti infetti

Le strategie di controllo si basano sull'adozione contemporanea di misure tendenti a:

1. eliminare i soggetti infetti, in particolare quelli con alta escrezione fecale di MAP, e della loro prole. La periodicità dei controlli da eseguire sugli animali è in funzione della prevalenza dell'infezione in allevamento, oltre che degli obiettivi dell'allevatore.
2. proteggere i vitelli dall'infezione.

Le misure per proteggere i vitelli dall'infezione, analogamente alle norme di profilassi contro le enteriti neonatali, mirano ad evitare il contatto diretto o indiretto del vitello con le feci potenzialmente infette degli adulti. A tale scopo si raccomanda il precoce isolamento del vitello, la sua alimentazione con colostro di vacche negative, l'allevamento in gruppi omogenei di età fino all'età adulta, la protezione delle mangiatoie e degli abbeveratoi dalla contaminazione da parte di feci di animali adulti.

La vaccinazione, nonostante sia un mezzo economico per ridurre e ritardare la comparsa di casi clinici (Kohler *e Coll.*, 2009), presenta numerosi inconvenienti, come:

- l'interferenza con la reazione della tubercolina bovina; per tale motivo in Italia il suo utilizzo è vietato;
- la sensibilizzazione ai *test* allergici e sierologici che divengono inapplicabili sul soggetto vaccinato (gli unici metodi diagnostici utilizzabili rimarrebbero la coltura fecale e la PCR);
- la possibilità di lesioni al punto di inoculo;
- la patogenicità del vaccino per l'uomo in caso di inoculazione accidentale;
- l'incompatibilità con un'ottica di eradicazione dell'infezione, ancor più motivata dopo le ipotesi di coinvolgimento di MAP nel Morbo di Crohn dell'uomo.

Le terapie, anche se effettuate per periodi prolungati, si sono dimostrate inefficaci nell' eliminare l'infezione, riuscendo a determinare solo una temporanea riduzione della sintomatologia clinica e dell'escrezione, che riprendono alla sospensione del trattamento (Belloli *e Coll.*, 1990).

L'introduzione di animali infetti è quasi sempre il mezzo di introduzione dell'infezione in allevamento. I vari *test* diagnostici a disposizione non ci danno in nessun caso la certezza che il soggetto negativo sia sano; per questo motivo è sempre opportuno che le garanzie riguardino l'intero allevamento di provenienza dell'animale.

Paratubercolosi come possibile zoonosi

È almeno da un secolo che si discute, a livello scientifico, su un possibile ruolo zoonosico di MAP nella Malattia di Crohn, viste le apparenti similitudini dei sintomi e delle lesioni. Molte ricerche sono state realizzate, soprattutto negli ultimi anni, dopo la messa a punto di nuovi e più sofisticati *test* diagnostici.

Quello che appare evidente, secondo un recente studio di metanalisi, è che i pazienti con Morbo di Crohn hanno mediamente 7 volte più probabilità di albergare MAP a livello intestinale rispetto ai controlli (Feller *e Coll.*, 2007).

Le varie ipotesi patogenetiche (Chamberlin *e Coll.*, 2006) ipotizzano che MAP, nella malattia di Crohn, possa rivestire un ruolo come:

- agente patogeno primario;
- agente opportunista, in grado di esplicare il proprio ruolo patogeno solo in soggetti geneticamente predisposti (mutazione del gene che codifica per la proteina NOD2) (Schreiber *e Coll.*, 2005);
- agente commensale privo di alcun ruolo patogeno.

Il serbatoio naturale di infezione per l'uomo è rappresentato dall'allevamento bovino; l'esposizione dell'uomo è garantita dalla contaminazione della catena alimentare, in particolare del latte e derivati, ma anche carni, vegetali e acqua contaminati da deiezioni di allevamenti infetti (Eltholth *e Coll.*, 2009).

A questo proposito è da sottolineare che da diversi studi è emersa la possibilità di soprav-

vivenza di MAP alla temperatura di pasteurizzazione HTST (72°C per 15”), ma anche a temperature più prudenziali (72 °C per 25’’) (Grant *e Coll*., 2005).

Anche se allo stato attuale delle conoscenze non si può affermare con certezza che esista una relazione tra MAP e Morbo di Crohn, le conoscenze disponibili impongono ulteriori approfondimenti e conferme, ma forniscono comunque una motivazione per intervenire nel controllo della diffusione della Paratubercolosi, come auspicato dal *Report* della Comunità Europea (2000), dal titolo “*Possible link between Crohn’s disease and paratuberculosis*”, in cui si conclude che “Le evidenze finora disponibili non sono sufficienti né per confermare, né per escludere che MAP sia l’agente causale almeno di una parte dei casi di *Crohn’s Disease*. Sono necessarie ulteriori ricerche per risolvere questo dubbio. Ad ogni modo, lo sviluppo degli strumenti atti a eradicare la paratubercolosi negli animali deve costituire una priorità”.

Per maggiori informazioni consultare i siti:
- Centro di Referenza Nazionale per la Paratubercolosi: www.izsler.it
- *International Association for Paratuberculosis*: sito ufficiale dell’Associazione Internazionale per la Paratubercolosi, con elenco dei soci e relativo campo di interesse www.paratuberculosis.org
- *Johne’s Information Centre, Wisconsin University, School of Veterinary Medicine*: www.johnes.org

Altre forme di malattia nel bovino

Oltre ai micobatteri responsabili delle due specifiche malattie infettive, *M. bovis* e *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), nel bovino sono segnalate, in forma sporadica, infezioni sostenute da altri micobatteri definiti “atipici”.

L’interesse per questo tipo d’infezioni è legato soprattutto all’interferenza che si può generare con le prove diagnostiche per la tubercolosi.

Dal punto di vista clinico, i micobatteri atipici possono causare infezioni asintomatiche o accompagnate da sintomi che si caratterizzano in funzione dell’organo interessato.

Infezioni asintomatiche

La presenza di reazioni positive o dubbie alla tubercolina PPD in allevamenti indenni da tubercolosi è dovuta a reazioni aspecifiche verso microrganismi che hanno antigeni comuni con *M. bovis*.

In questi casi, nel corso di esami colturali svolti per approfondimenti diagnostici, capita talvolta di isolare, al posto del microrganismo specifico, micobatteri di altro tipo che vengono messi in relazione con la reattività dell’animale.

Per poter dimostrare che i micobatteri isolati sono la causa della reazione aspecifica, sarebbe necessario effettuare infezioni sperimentali, riproducendo la reattività negli animali (bovini o animali da laboratorio) così infettati. Ciò non sempre è possibile o è stato fatto.

La letteratura riporta comunque una serie di micobatteri “atipici” isolati da bovini che avevano manifestato reazioni aspecifiche alla prova della tubercolina. Oltre a MAP e a *M. tuberculosis* (che sono in grado di sensibilizzare i bovini), sono da segnalare i seguenti isolamenti da linfonodi, latte, muco nasale e feci:

M. avium, M. moriokaense, M. asiaticum, M. goodii-like, M. non-chromogenicum, M. szulgai, M. flavescens, M fortuitum, M. terrae, M scrofulaceum, M. gordonae, M. vaccae, M. parafortuitum, M kansasii (Lesslie *e Coll*., 1967; Gallo *e Coll*., 1983; Mc Corry *e Coll*., 2004; Michel, 2008; Durnez *e Coll*., 2009; Houlian, 2010).

Patologie specifiche da micobatteri atipici

Le patologie da micobatteri atipici che colpiscono il bovino possono localizzarsi sulla cute o nella mammella.

Dermatite nodosa

Si tratta di una dermatite che colpisce i bovini per lo più adulti, caratterizzata dalla formazione di noduli sottocutanei di dimensioni che possono andare da quelle di una lenticchia fino ad un uovo di gallina, singoli o più raramente multipli e che possono avere una disposizione moniliforme lungo il decorso dei vasi linfatici. Indolori alla palpazione, si presentano di consistenza dura, ben delimitati e adesi alla cute sovrastante.

La localizzazione più frequente è al collo, alla giogaia, agli arti anteriori, al capezzolo (telite nodosa tubercoloide), alla mammella e allo scroto.

Questi noduli, definiti anche con termine anglosassone "*skin lesions*", di regola regrediscono spontaneamente, ma possono anche ascessuare ed ulcerare (Dirksen *e Coll*., 2004).

L'agente eziologico di questa dermatite non è ancora stato identificato, anche se la lesione e la presenza di micobatteri evidenziabili all'esame istologico depongono per una causa infettiva e più specificamente da micobatteri.

I tentativi di isolare i micobatteri coinvolti non hanno dato risultati risolutivi. Alcuni Autori hanno isolato micobatteri come *M. aquae* (ora chiamato *M. gordonae*) o altri micobatteri non tipizzabili (Yachida *e Coll*., 1973), dei quali non si è mai potuto dimostrare un ruolo eziologico certo.

La dermatite nodosa provoca di regola reazione positiva al *test* allergico intradermico con tubercolina PPD bovina.

Mastite

L'incidenza di mastite da micobatteri è generalmente sottostimata, in quanto si tratta di microrganismi che per crescere richiedono tempi prolungati d'incubazione (4-5 giorni), i quali vanno ben oltre a quelli previsti normalmente per gli esami batteriologici di *routine* (2 giorni).

Per questo motivo la diagnosi eziologica di mastite da micobatteri è un riscontro casuale, legato alla conservazione prolungata in laboratorio delle piastre inoculate.

Dal punto di vista clinico, la mastite da micobatteri atipici non presenta caratteristiche patognomoniche. Si tratta di una mastite cronica, caratterizzata da progressivo indurimento del quarto e presenza talvolta di noduli nel parenchima.

L'assenza di risposta alle normali terapie antibiotiche induce generalmente l'allevatore a procedere all'eliminazione del soggetto colpito.

L'insorgenza di mastite da micobatteri è stata collegata, in alcuni casi, con l'infusione endocanalicolare di pomate antibiotiche in veicolo oleoso.

I micobatteri maggiormente coinvolti sono *M. smegmatis, M. fortuitum e M. chelonae, M. vaccae, M. flavescens* (Koehlne *e Coll*., 1981; Thomson *e Coll*., 1988; Wetzstein *e Coll*., 1992).

La mastite da micobatteri atipici non induce di regola reazioni allergiche aspecifiche al *test* intradermico mediante tubercolina PPD bovina.

MICOBATTERI ATIPICI NEL SUINO

Il suino funge da veicolo di diverse specie di micobatteri. Tra queste quelle che, nel corso degli anni, si sono rivelate maggiormente prevalenti sono *M. avium* e le specie ad essa correlate: *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum*.

Sono state isolate inoltre le specie appartenenti a *M. fortuitum* complex e, occasionalmente, *M. kansasii* e *M. xenopi*. *M. bovis* è stato riscontrato sia tra i suini domestici che tra quelli selvatici.

Epidemiologia

La specie che si isola più frequentemente è *M. avium* (sierotipi 1 – 3) anche se tale prevalenza è, negli ultimi anni, in costante diminuzione a causa della progressiva scomparsa degli allevamenti di tipo familiare che hanno lasciato spazio agli allevamenti intensivi in cui si praticano cicli produttivi più brevi e dove è possibile un maggiore controllo sull'utilizzo delle deiezioni.

La fonte d'infezione principale è costituita dall'ambiente e, in particolare, dalle acque e dal terreno (dove *M. avium* si conserva per anni) contaminati dalle feci di uccelli domestici e selvatici nonché dalle deiezioni di suini infetti (nelle quali la sopravvivenza del germe può arrivare a 3-7 settimane).

La segatura e i trucioli di legno sono, oltre che un veicolo dell'agente eziologico, anche un fattore favorente il suo attecchimento a causa delle lesioni alle mucose che tali mezzi possono provocare. Fattori predisponenti sono l'età (più colpiti i suini sotto i due mesi) e le diete carenti di vitamine o iperglucidiche.

Il ciclo dell'infezione è in prevalenza di tipo oro – fecale: i soggetti infetti sono in grado di eliminare il batterio con le feci dopo 20 – 30 giorni dal contatto, mentre le lesioni linfonodali, localizzate in sede faringea, cervicale e mesenterica, compaiono dopo 80 – 90 giorni.

Nella trasmissione dell'infezione sostenuta da *M. bovis* la specie suina gioca un ruolo importante al pari di quella bovina. In particolare il mantenimento dell'agente eziologico nell'ambiente viene favorito dall'allevamento allo stato brado, ancor più se in promiscuità con altre specie, e dal conseguente contatto con specie selvatiche tra le quali il cinghiale si è dimostrato ugualmente recettivo.

Nei territori ove i programmi di eradicazione dell'infezione da *M. bovis* sono stati solo di recente intensificati, non sono infrequenti i focolai di infezione nel suino: in tal caso il bovino

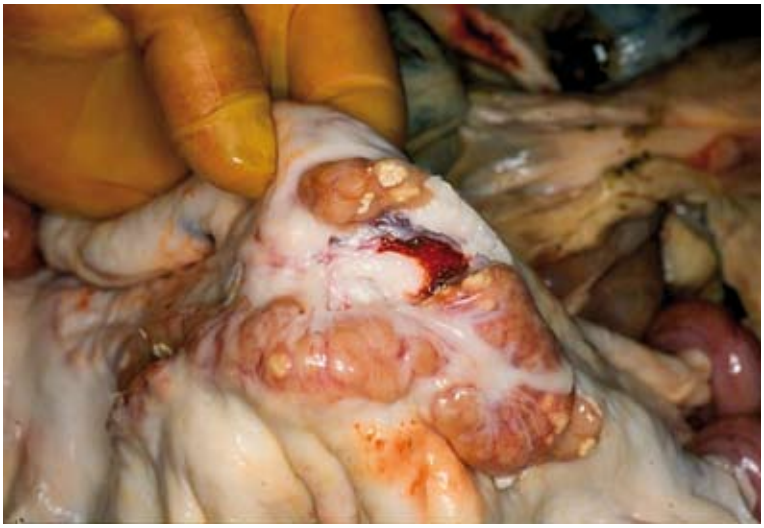
costituisce la sorgente principale e, a differenza di quanto avviene nell'infezione da *M. avium*, viene riconosciuta la trasmissione per via respiratoria (Parra *e Coll*., 2003).

Tra le altre specie di micobatteri, quelle appartenenti a *M. fortuitum* complex (*M. fortuitum, M. abscessus. M. chelonae*), data la loro diffusione ambientale, si riscontrano come reperto occasionale nelle linfoadenopatie e nelle forme artritiche croniche. *M. kansasii* e *M. xenopi* e numerose altre specie, sono state isolate, ma il loro ruolo nell'infezione non sempre è stato compreso (Dey, 1986).

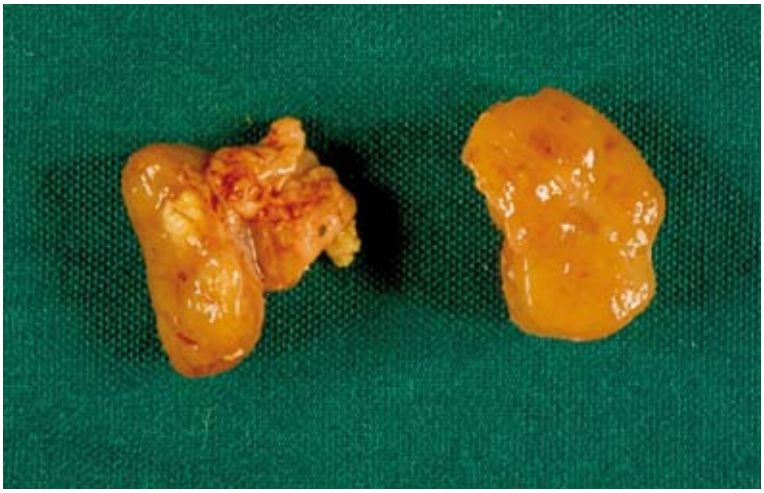
Quadro anatomo – patologico

L'infezione nel suino è caratterizzata dall'assenza di sintomi clinici specifici per cui l'unico supporto diagnostico valido rimane l'esame *post mortem*. Le lesioni rilevabili sono limitate ai linfonodi faringei, cervicali e mesenterici: appaiono di aspetto variabile con dimensioni che possono essere ridotte, di colore bianco – giallastro, fino a includere l'intero linfonodo; ci possono essere una o più aree caseose con margini non completamente definiti e raramente si osserva calcificazione. Ci può essere una fibrosi diffusa e sostanzialmente non si osserva la formazione di una capsula.

La generalizzazione dell'infezione è poco frequente 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. 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.



Lesioni da M. avium nei linfonodi di suino



Lesioni da M. avium nei linfonodi di suino

Lesioni istologiche

Sede	*Quadro osservabile*
Linfonodi	Infiammazione diffusa con cellule epitelioidi e giganti multinucleate che proliferano. Nelle lesioni avanzate c'è necrosi caseosa delle cellule epitelioidi ed infiltrazione neutrofila. Nei linfonodi mandibolari è possibile l'accumulo di grandi istiociti vacuolizzati con dentro strutture sferiche (corpi di Michaelis-Gutman)
Fegato	Lesioni interlobulari circondate da tessuto fibroso con necrosi caseosa e cellule epitelioidi, granulociti e linfociti
Polmone	Proliferazione fibroblastica con necrosi caseosa, cellule epitelioidi, granulociti, linfociti, cellule giganti a livello alveolare o peribronchiale

Viallier *e Coll*. (1976), dopo aver esaminato in Francia 400 gangli sottomascellari di suini sani, hanno concluso che questi organi avevano tutti gli stessi caratteri e cioè più o meno voluminosi, d'aspetto normale o leggermente infiammato, privi di caseificazione. Sono stati isolati 23 ceppi di micobatteri atipici ripartiti nelle specie seguenti: 15 *avium*, 5 *gordonae*, 3 *terrae.*

Vista la netta prevalenza di *M. avium*, gli Autori hanno tipizzato mediante agglutinazione rapida i ceppi, riscontrando soprattutto i sierotipi 1, 2, 3 che sono notoriamente quelli più patogeni per i volatili e che si trovano anche negli animali ammalati. Questi ceppi, inoltre, si rivelavano patogeni per il coniglio e per il topo.

Nel coniglio inoculato *i.v*. con 2 mg/kg di batteri si assisteva a forte dimagramento, seguito da morte 12-30 giorni dopo l'inoculazione. Le lesioni ai visceri erano simili ad una micobatteriosi di tipo Yersin, con milza ipertrofica e abbondante presenza di acido-resistenti nel polmone e nel rene.

Nei topi, inoculati *i.p*. con 0,5 ml di una sospensione batterica contenente 2 mg/ml, non si verificava sempre la morte entro un periodo d'osservazione di 40 giorni, ma si trovavano nei visceri (milza, rene, polmone) numerosissimi micobatteri.

Zorawski *e Coll*. (1976) hanno trovato in suini apparentemente sani in Polonia una netta prevalenza di *M. avium* (84,4%) appartenenti, in ordine di frequenza, ai sierotipi 2, 1, 3. Questi ceppi possedevano una certa virulenza, essendo patogeni per il coniglio.

Una parte dei ceppi di *M. avium* non era agglutinabile perché in fase ruvida e presentava, inoltre, risposte irregolari alle prove biochimiche.

Altri micobatteri atipici, rilevati in minori percentuali, erano attribuibili alle specie *intracellulare, xenopi, scrofulaceum, terrae, fortuitum, pseudofortuitum.*

Thoen *e Coll.* (1981) ricordano l'importanza del sierotipo 8 di *M. avium*, che ha provocato non di rado vasti episodi enzootici d'infezione in allevamenti suinicoli degli USA, colpendo dal 50 al 60% dei capi. Il sierotipo 8 produrrebbe lesioni granulomatose di difficile distinzione da quelle sostenute nel suino dalle specie *bovis* e *tuberculosis*, con grave pregiudizio per le carni che, secondo i regolamenti USA, in questo caso non possono essere commercializzate se non cotte.

Anche Dvorska *e Coll*. (1999) in Cecoslovacchia hanno isolato in massima parte (96,2%) *M. avium* da linfonodi di suini senza lesioni tubercolari, mentre solo il 3,8% apparteneva ad altre specie (*chelonae, terrae, phlei, fortuitum*).

Diagnosi

La diagnosi *in vivo* risulta assai difficoltosa per l'assenza di sintomi clinici specifici. È possibile il ricorso all'impiego della tubercolina, sia bovina che aviare, che può servire da ausilio in programmi di risanamento specialmente nei riproduttori (Guadagnini *e Coll.*, 1994).

Sono descritte inoltre prove immunoenzimatiche (ELISA) per la diagnosi sierologica delle infezioni da *M. avium* complex.

Nella quasi totalità dei casi l'infezione viene diagnosticata mediante l'esame anatomo – patologico e, in particolar modo, costituisce un reperto dell'ispezione *post mortem* in sede di macellazione.

La diagnosi eziologica richiede il ricorso agli esami di laboratorio. L'isolamento viene effettuato a partire dalle lesioni linfonodali mediante l'ausilio di terreni selettivi, sia solidi che liquidi; questi ultimi possono essere impiegati in combinazione con il sistema semi – automatizzato MGIT che consente di ottenere buoni risultati nell'isolamento di molte specie di micobatteri (Hines *e Coll*., 2006*)*.

L'identificazione avviene sia mediante metodiche tradizionali che biologico – molecolari.

Nel primo caso vanno tenute presenti le caratteristiche colturali (temperature e tempi di crescita, capacità di sviluppare pigmentazione alla luce e/o al buio, capacità di crescita in presenza di specifiche sostanze inibenti) che biochimiche.

Delle proprietà biochimiche sono fondamentali la capacità di idrolizzare l'urea, di ridurre il tellurito e i nitrati, di idrolizzare la fenolftaleina (prova dell'arilsulfatasi) e la pirazinamide.

Con le metodiche biologico – molecolari si ricorre principalmente all'impiego della PCR specifica per il genere *Mycobacterium* o per gruppi di specie (TB complex, *avium* complex) o per singole specie.

MICOBATTERI ATIPICI NEGLI OVI-CAPRINI

Si possono verificare infezioni a carattere progressivo riportabili a *M. avium*, anche se non molto frequenti (Farina *e Coll*., 1995).

Un problema a sé stante è la paratubercolosi delle pecore, segnalata per la prima volta in Australia nel 1980, dove negli adulti si osservava dimagramento e diarrea. I morti mostravano linfonodi meseraici ingrossati, enterite granulomatosa ed epatopatia diffusa (Dent, 1985).

MICOBATTERI ATIPICI NEI VOLATILI

Tutte le specie di uccelli sono potenzialmente suscettibili ai micobatteri. In particolare il *Mycobacterium avium* rappresenta la specie maggiormente coinvolta in episodi di micobatteriosi negli uccelli. Altri micobatteri, quali il *Mycobacterium genavense, M. fortuitum, M. tuberculosis, M. gordonae e M. nonchromogenicum* sono stati dimostrati agenti di micobatteriosi aviare (Hoop,1993 e Hoop, Tell *e Coll*. 2001).

Dal punto di vista terminologico, le infezioni negli uccelli sostenute da *Mycobacterium avium* sono denominate " tubercolosi aviare", mentre quelle sostenute da altri micobatteri vengono comunemente denominate "micobatteriosi".

Le prime segnalazioni riguardanti i micobatteri negli uccelli (compreso il pollame) risalgono al 1884 (Cornil e Megnin, Sutton e Gibbes), pochi anni dopo la scoperta del bacillo di Koch.

Il *Mycobacterium avium* appartiene al gruppo dei batteri non tubercolari a lenta crescita e insieme al *Mycobacterium intracellulare* forma il *Mycobacterium avium* complex, più comunemente detto MAC.

Il *Mycobacterium avium* viene ulteriormente classificato mediante metodiche sierologiche ed anche a seconda della specie di provenienza, come ad esempio, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (frequentemente isolato dai ruminati ed uccelli selvatici), *M.avium* subsp. *sylvaticum* (isolato dal colombaccio ed altri uccelli esotici) ed infine *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (isolato da uccelli ed altri animali domestici). Per quest'ultimo è stata proposta un' ulteriore suddivisione su base fenotipica e genotipica: *Mycobacterium avium* subsp. *avium* da specie aviari e *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* se di provenienza umana o da altri mammiferi (Mijs *e Coll*., 2002).

Alcune specie di micobatteri aviari possono in determinate condizioni rappresentare un rischio per la salute umana. In particolare, la dimostrazione di infezioni sostenute da MAC in soggetti immunocompromessi rafforza il loro potenziale ruolo zoonotico.

Tale caratteristica viene infatti utilizzata al fine di evidenziare patologie opportunistiche rivelatrici di AIDS, quale per esempio l'infezione disseminata da MAC.

Nell'uomo rappresenta la patologia batterica più comune nei soggetti con infezione da HIV, che se non opportunamente trattata può manifestarsi fino al 40% dei soggetti infetti.

È opportuno sottolineare che MAC e *M. genavense* risultano essere patogeni per determinate categorie di soggetti a rischio. In nessuna linea guida o linee di raccomandazioni per tali categorie di soggetti gli uccelli vengono considerati potenziali vettori (Lennox, 2007).

Tale apparente discrepanza è strettamente correlata alla fonte di infezione per l'uomo, ritenuta più probabilmente di origine ambientale che animale, poiché tali microrganismi sono comunemente presenti nel cibo, nell'acqua e nel terreno.

La tubercolosi aviare nel pollo è sostenuta da *Mycobacterium avium* serovars 1, 2 e 3 a distribuzione cosmopolita ed è maggiormente presente nelle zone temperate settentrionali.

Allo stato attuale, la tubercolosi nel pollame industriale presenta una prevalenza molto bassa, dovuta principalmente all'organizzazione verticale della filiera produttiva ed alla rapidità dei cicli produttivi, che congiuntamente ad una attenta gestione sanitaria hanno permesso negli anni precedenti l'eradicazione di tale patologia dal circuito industriale.

Gli uccelli selvatici ed i volatili ornamentali o da collezione (così come i volatili allevati in condizioni di libertà) sono ad oggi le principali specie aviari coinvolte in episodi di micobatteriosi.

Potenzialmente tutte le specie aviari sono sensibili a tale patogeno. L'infezione è stata segnalata in fagiani, pernici, anatidi, gru, columbiformi, pappagalli, falconiformi, canarini ed altri fringillidi. L'apparente maggiore incidenza di tubercolosi in tali specie è verosimilmente da attribuire alla maggiore attenzione diagnostica posta su tali specie ornamentali ed anche alle condizioni di stabulazione ed allevamento (solitamente a ciclo chiuso) che possono

permettere il mantenimento dei micobatteri sia all'interno delle voliere che in volatili portatori ed eliminatori.

La principale via di trasmissione per gli uccelli è quella oro-fecale, attraverso la continua eliminazione di micobatteri dai soggetti infetti attraverso il canale digerente. Sebbene piuttosto rara, anche la via respiratoria può essere considerata una possibile via di trasmissione.

Una volta nell'ambiente esterno, i micobatteri possono rimanere infettanti fino a 4 anni nel terreno o fino a 244 giorni nella segatura mantenuta a 37°C (Schalk *e Coll*., 1935; Schliesser e Weber, 1973).

Negli uccelli la malattia si manifesta clinicamente con sintomatologia aspecifica: debolezza, progressivo dimagramento con atrofia dei muscoli pettorali, opacità del piumaggio, anemia, secchezza della cute, zoppie, calo delle *performance* produttive, scarsa risposta alle terapie antibiotiche ed infine mortalità anche dopo diverse settimane o mesi dalla comparsa dei sintomi.

Non tutti gli animali dello stesso gruppo presentano la sintomatologia o si ammalano. In alcuni casi, in particolare quando alcuni fattori predisponenti creano le condizioni perfette per lo sviluppo della malattia, si possono avere focolai piuttosto imponenti. A tal proposito, il caso più eclatante è rappresentato dalla morte di 18.500 fenicotteri in Kenya, dove malnutrizione e conseguente immunodeficienza hanno determinato tale imponente mortalità.

Le lesioni sono principalmente localizzate al fegato, milza, intestino e midollo osseo, anche se altri organi possono essere in alcuni casi coinvolti. Nel pollo le lesioni tipiche sono rappresentate da epato- e splenomegalia con presenza di numerosi noduli di differenti dimensioni, di colore variabile dal giallo al grigio biancastro, dispersi principalmente negli organi di elezione.

Tali noduli di consistenza soda possono essere incisi ed enucleati con facilità. Al taglio questi possono presentare differenti foci giallastri, ma anche un unico centro caseoso giallastro circondato da una capsula fibrosa. Tali noduli granulomatosi sono molto frequenti a livello del midollo osseo. L'infezione sembrerebbe avvenire in una fase molto precoce ed attraverso batteriemia. Le lesioni a carico del midollo osseo rappresentano un segno patognomonico della patologia forma morbosa.

Tra le numerose specie di uccelli non tutte manifestano comunemente lesioni di tipo granulomatoso, come si può rilevare dalla seguente lista (Gerlach, 1999):

Ordine	Incidenza alta	Incidenza rara
Caradriformi (gabbiani, limicoli)	Si	
Ciconiformi (cicogne, aironi, ibis)	Si	
Cuculiformi	Si	
Falconiformi (rapaci diurni)	Si	
Galliformi (pollame)	Si	
Gruiformi (gru, folaga)	Si	
Piciformi (tucani)	Si	
Strigiformi (rapaci notturni)	Si	
Anseriformi (anatre, oche, cigni)		Si
Columbiformi (colombi, tortore)		Si
Caraciformi (martin pescatore, gruccione)		Si
Passeriformi (fringillidi, ploceidi)		Si
Psittaciformi (pappagalli)		Si

La diagnosi differenziale deve sempre includere le seguenti patologie: coligranulomatosi o malattia di Hjarre, pullurosi, salmonellosi, stafilococcosi, colera, aspergillosi e neoplasie. Quando possibile l'esecuzione di un vetrino e la visualizzazione di numerosi bacilli acido-resistenti permette di avanzare una diagnosi.

La diagnosi nell'animale *in vivo* risulta ancora oggi difficoltosa a causa della scarsa tipicità dei sintomi.

Negli animali si attiva una risposta immunitaria sia di tipo umorale che cellulo-mediata (ipersensibilità ritardata); tale specificità viene sfruttata a fini diagnostici con la prova della tubercolina.

L'allergene viene inoculato per via intradermica nella cresta o nei bargigli del pollo e provoca tumefazione persistente fino a 5 giorni negli infetti.

Nel tacchino e nei palmipedi la PPD aviare viene inoculata nell'ala e la lettura si effettua dopo 48 ore. Il *test* della tubercolina offre buone possibilità di diagnosi all'interno di un gruppo mentre risulta sconsigliato sul singolo soggetto, dato che non tutti gli animali infetti danno reazione positiva, come nel caso di infezioni recenti o nella fase finale di anergia immunitaria tipica delle tubercolosi.

Tale *test* inoltre non può essere applicato a tutte le specie di uccelli. Tra i *test* sierologici possiamo ricordare sia l'ELISA che la SAR, anche se entrambi presentano difetti di specificità.

Esami diagnostici mirati (quali biopsie di organo, impronte da granulomi cutanei o strisci da feci), possono essere utili qualora dimostrino la presenza di bacilli acido-resistenti. Naturalmente a causa dell'emissione intermittente dei microrganismi attraverso le feci, tutte le metodiche diagnostiche applicate a tali matrici dovranno considerare sempre tale evenienza.

La diagnosi definitiva dovrà sempre essere confermata mediante la coltura del microrganismo o in alternativa attraverso l'ausilio di metodiche di biologia molecolare che possono permettere in alcuni casi anche l'identificazione della specie di micobatteri coinvolti.

MICOBATTERI ATIPICI NEL CAVALLO

Larsen *e Coll*. (1972) riferiscono di casi di paratubercolosi nel cavallo, trasmessa molto probabilmente da bovine infette eliminatrici con le feci su pascolo comune. Dopo le prime diagnosi incomplete (fatte solo sulla base dei sintomi e di un esame microscopico delle lesioni), i casi successivi, esaminati più attentamente, venivano corredati dall'isolamento del microrganismo dai linfonodi mesenterici, seguito dall'inoculazione in animali da esperimento.

A scopo di ricerca questi Autori hanno infettato *i.v.* dei cavalli con *M. paratuberculosis*, provocando la comparsa della sintomatologia tipica dopo circa 1 mese (perdita di peso, alterazione della pelliccia, diarrea, eliminazione con le feci per 3 mesi).

Le prove intradermiche con Jonhina e la fissazione del complemento non davano i risultati sperati. Alla necroscopia il piccolo intestino si presentava disteso, i linfonodi adiacenti ingrossati, aree di infiammazione granulomatosa erano visibili su fegato, digiuno e cieco.

Dalle ricerche di Nassal (1963) sembra che il cavallo sia più recettivo alla tubercolosi aviare di quanto si creda, avendo trovato su 210 soggetti da macello il 10,5% di infetti con lesioni contenenti *M. avium*, presenti, nel 46,5% anche nell'apparato respiratorio.

MICOBATTERI ATIPICI NEL CANE E NEL GATTO

Nei carnivori domestici l'infezione da micobatteri atipici si traduce spesso in lesioni granulomatose della pelle e dei linfonodi (Biberstein, 1990).

Nei cani in Giappone su 171 soggetti 36 sono stati trovati all'autopsia con lesioni di tipo tubercolare ai linfonodi bronchiali, mediastinici e meseraici, dai quali è stato possibile isolare micobatteri. Sono descritte nel cane anche adeniti da *M. avium* complex.

Nel gatto si possono rinvenire granulomi sottocutanei probabilmente per infezioni da farmaci inoculati e più raramente polmoniti da *M. aquae* (Oudar *e Coll*., 1966).

La *dermatite ulcerativa del gatto* (che colpisce raramente anche il cane) è una malattia legata a micobatteri opportunisti, specialmente a *M. fortuitum*.

Altre specie ritenute responsabili sono *phlei, smegmatis, xenopi, ulcerans, thermoresistibile*. Si pensa sia trasmessa da punture d'insetti.

Le lesioni, più suppurative che granulomatose, tendono ad essere ristrette alla parte ventrale del tronco, in particolare l'addome. I linfonodi sono scarsamente interessati e ridotte le formazioni nodulari.

La malattia regredisce spesso spontaneamente. Non risponde ai trattamenti con farmaci classici antitubercolari (eccetto etambutolo), ma eventualmente ad aminoglicosidi, tetracicline, cloramfenicolo.

I batteri sono facilmente coltivabili in laboratorio su Agar sangue, dove crescono in 48 ore – una settimana.

MICOBATTERI ATIPICI NEI PESCI

Le micobatteriosi ittiche sono state rilevate in un ampio numero di specie acquatiche (Austin & Austin, 1993) in tutto il mondo, sia in pesci d'allevamento (ornamentali o alimentari) che selvatici, d'acqua dolce o salata (Ghittino, 1985). Le specie ornamentali, tuttavia, a causa del diffuso commercio, sono allevate intensivamente e risultano particolarmente esposte al rischio di infezione (Florio *e Coll*., 2003; Lescenko *e Coll*., 2003).

In Italia segnalazioni d'infezione riguardano in modo particolare i pesci ornamentali (Florio *e Coll*., 2003; Prearo *e Coll*., 2004; Salogni *e Coll*., 2007). Negli ultimi anni tuttavia sono state effettuate segnalazioni di malattia nelle specie d'allevamento quali il branzino (*Dicentrarchus labrax*) (Agnetti *e Coll*., 2005); la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) (Salogni *e Coll*., 2007; 2008); la trota fario (*Salmo trutta*) (Salogni *e Coll*., 2007); il persico spigola (*Morone saxatilis x M. chrysops*) (Prearo *e Coll*., 2007); lo storione (*Acipenser baeri*) (Manfrin, 2007, comunicazione personale) e la carpa (*Cyprinus carpio*) (Salogni *e Coll*., 2009).

Gli episodi di micobatteriosi nei pesci sono imputabili a più specie di micobatteri. I più frequentemente isolati sono: *Mycobacterium marinum*, *M. chelonae* e *M. fortuitum*. (Noga, 1996; Bruno *e Coll.*, 1998) sebbene ne siano segnalati anche altri come ad esempio *M. gordonae*, *M. scrofulaceum, M. simiae, M. terrae, M. peregrinum* e *M. poriferae* (Lansdell *e Coll.*, 1993; Bozzetta *e Coll.*, 1995; Tortoli *e Coll*., 1996; Mohney *e Coll*., 1998; Prearo *e Coll*., 2004).

Dal punto di vista clinico, la patologia può passare per lungo tempo inosservata, in quanto paucisintomatica.

I pesci colpiti appaiono emaciati, con scarso appetito e con aree discromiche grigiastre oppure vere e proprie ulcere con perdita di squame a livello cutaneo.

I casi conclamati sono caratterizzati da una letargia, esoftalmo bilaterale, lepidortosi, distensione addominale, respirazione accelerata, nuoto anomalo, deformità scheletriche, emorragie e necrosi viscerali e cutanee, tumefazioni ed ulcerazioni cutanee. La mortalità è tipicamente a stillicidio (Roberts, 1990; Prearo *e Coll*., 2002).

Le lesioni viscerali sono caratterizzate istologicamente dalla presenza di granulomi di varie dimensioni all'interno dei quali sono identificabili bacilli acool-acido resistenti. L'aspetto

macroscopico dei granulomi è quello di noduli grigiastri con localizzazione prevalentemente epatica, splenica, renale e branchiale (Noga, 1996; Prearo *e Coll.,* 2002).

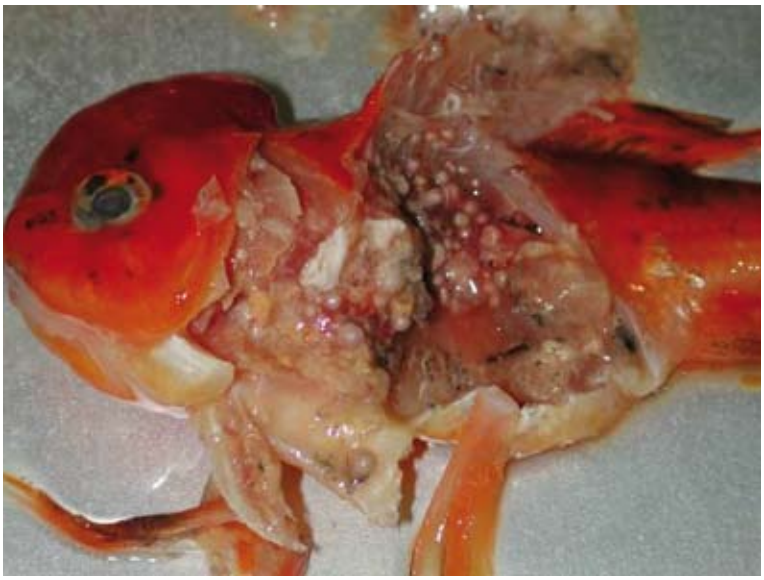
La sintomatologia ed il quadro anatomopatologico possono essere influenzati da eventi stressanti quali il trasporto, la manipolazione, l'elevata densità d'allevamento e condizioni ambientali poco idonee alla specie allevata (Frerichs, 1993).

M. marinum, M. fortuitum e *M. chelonae* sono tra gli agente zoonosici più frequentemente isolati nell'uomo nei casi di micobatteriosi atipiche. L'infezione da micobatteri atipici è da imputarsi soprattutto alla contaminazione di ferite cutanee con acqua, materiali o pesci infetti, piuttosto che al consumo di alimenti di origine acquatica contaminati (Giavenni, 1979; Monti *e Coll*., 1979; Amerio *e Coll.*, 1990).

La lesione indotta, detta anche "granuloma da piscina" (nodulo cutaneo), è a carattere dermatologico e colpisce i frequentatori di piscine e gli operatori del settore acquariologico o della pesca ed acquacoltura. Negli individui immunodepressi (Ristola *e Coll.*, 1999), oppure in quelli molto giovani (Parent *e Coll*., 1995), la malattia può tuttavia generalizzare.

La diagnosi in caso di sospetta micobatteriosi da micobatteri atipici viene effettuata tramite le seguenti procedure:

– esame istologico per ricerca dei granulomi e bacilli acido-resistenti mediante colorazione di Ziehl-Neelsen;
– esame colturale tramite semina su adatti terreni a base d'uovo (esempio: Löwenstein-Jensen e Stonebrinks); la temperatura ottimale per lo sviluppo è di 20-25°C. Tale crescita è in genere abbastanza rapida (5-14 gg), ma comunque variabile in funzione della specie batterica;
– identificazione del ceppo isolato tramite prove biochimiche e tecniche di biologia molecolare (PCR, sequenziamento genomico, ecc.).



Granulomatosi pluriviscerale diffusa in pesce rosso (Carassius auratus) da Mycobacterium marinum

Granulomatosi diffusa con piccoli noduli nella cavità addominale in pesce tropicale (Hyphessobrycon columbianus)

Lesioni granulomatose da M. marinum di vario diametro (da circa 1 cm a meno di 1 mm) in fegato di trota iridea (Oncorhynchus mykiss)

Un' indagine effettuata presso la Sezione Diagnostica di Brescia dell'IZSLER su 184 pesci ornamentali ha permesso di individuare una positività del 41% (78 campioni) per isolamento di micobatteri.

In merito alle specie isolate (grafico 1), è da segnalare come, accanto a quelle classicamente descritte in campo ittico (*M. marinum*, *M. fortuitum, M. chelonae*), ne sono state identificate con una certa prevalenza delle altre, come *M. peregrinum* (patogeno), *M. farcinogenes* (patogeno o potenzialmente tale), *M. gordonae e M. terrae* complex (saprofiti, il cui ruolo patogeno è dubbio).

Tutti i micobatteri isolati, volendo far riferimento alla classificazione di tipo clinico-patologico di Rastogi *e Coll*. (2001), sono ascrivibili, con la sola eccezione di un isolamento di *M. avium* complex, ai MOTT (*Mycobacteria Other Than Tuberculosis*, non *M. avium* complex e non *M. tuberculosis* complex). Non è mai stata dimostrata la presenza di micobatteri appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Tale molteplicità di riscontri suggerisce l'importanza della modalità di campionamento. Molto spesso, infatti, le esigue dimensioni dei campioni analizzati comportano inevitabili contaminazioni microbiche (micobatteri saprofiti o ambientali) dei prelievi con materiale intestinale e/o cutaneo. Conseguentemente la tipizzazione della specie di micobatterio isolato rappresenta un elemento cardine nell'individuazione di microrganismi patogeni per i pesci e di quelli dotati di potere zoonosico.

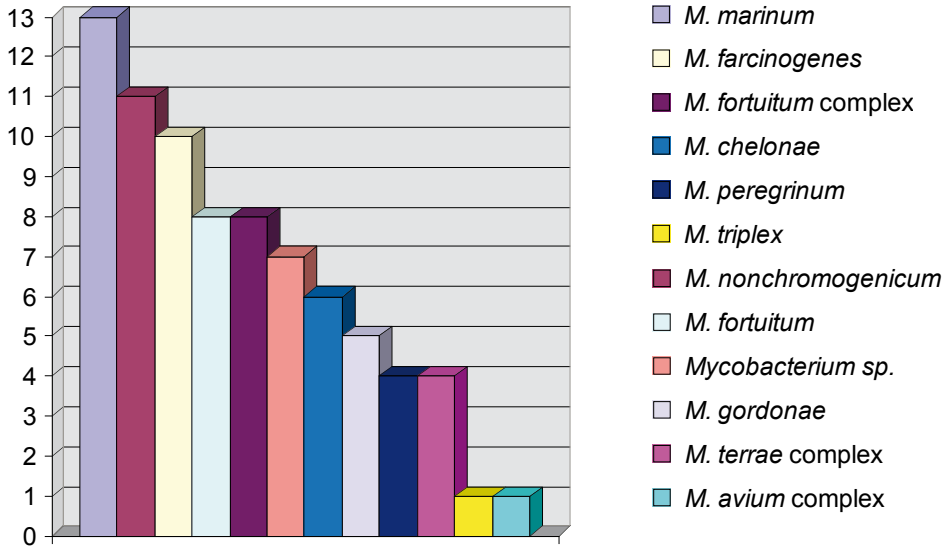


Grafico 1: tipizzazione dei micobatteri isolati in 78 pesci ornamentali

MICOBATTERI ATIPICI NEGLI ANIMALI DA ESPERIMENTO

La progressione dell'infezione è stata studiata negli animali da esperimento (cavie, topi, conigli, polli) usati per l'isolamento diretto da materiale patologico o per identificare colture già sviluppate.

I germi dal luogo d'inoculo passano attraverso i vasi linfatici ai linfonodi regionali (spesso ascellari o inguinali) e da qui alla catena dei linfonodi aortici e infine al torrente circolatorio.

La cavia virtualmente non resiste all'infezione da *M. tuberculosis* e *M. bovis*, ma teoricamente tutti i micobatteri patogeni portano a morte gli animali infettati.

Gli atipici raramente ricalcano nella cavia il decorso dell'infezione tubercolare classica dai segni autoptici caratteristici: milza ipertrofica colore rosso-scuro con noduli superficiali oppure aree caseose giallo-crema, fegato sottile, con bordi angolati, placche grigiastre o gialle, polmoni con noduli grigi e regioni di solidificazione.

Il topo è più recettivo nei confronti degli atipici, anche se riporta talora lesioni parziali e non letali. Ad esempio, viene colpito da *M. kansasii* solo negli organi interni, mentre *M. marinum* e *M. ulcerans* (quest'ultimo molto lentamente) lesionano le parti fredde (coda, cuscinetti plantari, naso, scroto).

Altri aspetti dell'infezione da atipici nel topo sono riportati nel Capitolo III (*Esperienze degli anni '60*).

MICOBATTERI ATIPICI IN ANIMALI SELVATICI

La fauna selvatica può essere un indicatore e/o *reservoir* di micobatteri presenti nell'ambiente in cui questi animali vivono.

Le specie di alcool-acido resistenti più frequentemente isolate sono: *tuberculosis*, *bovis, microti*, *avium* complex ed un gruppo molto esteso di altri micobatteri a carattere ubiquitario e saprofitico (Rastogi *e Coll*., 2001).

Alla luce della molteplicità delle specie, si capisce l'importanza della loro ricerca e della loro identificazione, fondamentale in epidemiologia veterinaria, tenuto conto che il ruolo degli animali selvatici nella diffusione della tubercolosi bovina e delle altre micobatteriosi non è stato ancora chiarito.

Inoltre, la possibile presenza di un'infezione da micobatteri in una popolazione a vita libera potrebbe interferire con i piani di eradicazione della tubercolosi, ponendo seri problemi di sanità pubblica.

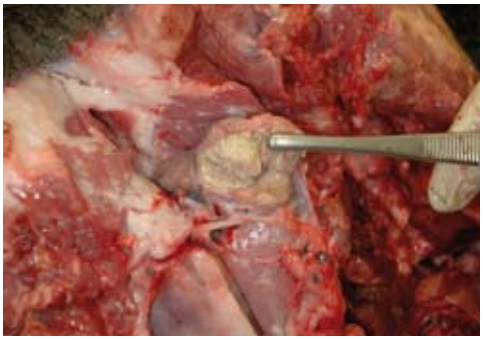
Studi condotti su ungulati selvatici hanno evidenziato che questi animali possono albergare *M. bovis,* agente eziologico della tubercolosi bovina oppure altri micobatteri patogeni e saprofiti (Bollo e Ferroglio, 2002).

M. microti è stato isolato frequentemente nelle arvicole e in altre specie di roditori in Europa (Clifton *e Coll*., 1995). Esistono tuttavia poche segnalazioni di casi patologici, per cui viene considerato di scarso rilievo per gli animali selvatici.

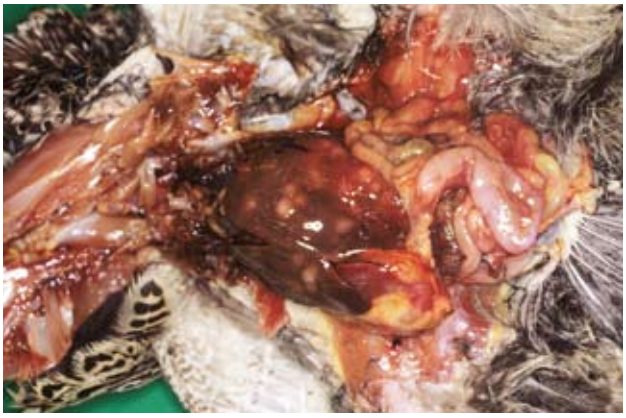
Nei volatili selvatici è possibile osservare lesioni tubercolari causate da *M. avium*, conseguenti all'assunzione di alimenti e acqua infetti, dove questo micobatterio sopravvive più a lungo di altri. Le lesioni sono a carico prevalentemente dell'intestino, del fegato e della milza con frequente coinvolgimento delle ossa e delle articolazioni sottoforma di granulomi scarsamente caseificati.

Riferimento ai micobatteri tubercolari

Esistono numerose segnalazioni di tubercolosi nei Cervidi selvatici, ma si riferiscono generalmente a casi sporadici, dove questi animali fungono da fondo cieco epidemiologico. Le lesioni macroscopiche segnalate variano da noduli o ascessi colliquativi a granulomi caseo-calcifici (De Lisle *e Coll*., 2001).
Così pure è nota la tubercolosi del cinghiale (*Sus scrofa*), evidenziata in diversi paesi europei, compresa l'Italia, sia in casi sporadici che in forma endemica (Mignone *e Coll.*,1991; Ferroglio e Rossi,1996; Gavaudan *e Coll*., 2006; Pacciarini *e Coll*.,2006).
Dal punto di vista anatomopatologico nel cinghiale le lesioni riscontrabili sono di tipo necrotico-calcifico focali, singole o estese, talvolta con capsula fibrosa contenente materiale necrotico caseoso (Pacciarini *e Coll.*, 2006).
Sono stati descritti anche dei casi di isolamento concomitanti a focolai di infezione nel bovino (Serraino *et al*., 1999). I rilievi anatomopatologici segnalati in questa specie sono di modesta entità, rappresentati generalmente da lesioni sclero-caseo-calcifiche limitate ai linfonodi sottomandibolari (Bollo *e Coll*., 2000).
Studi condotti su casi di tubercolosi nel tasso (*Meles meles*) (Clifton *e Coll*., 1995) e nell'opossum australiano (*Trichosurus vulpecula*) (Cooke *e Coll*., 1995) hanno dimostrato che anche queste specie possono fungere da serbatoio dell'infezione.



Lesioni da micobatteri nel cinghiale (linfonodi sottoparotideo e retrofaringeo)



Lesioni nodulari disseminate da M. avium nel fagiano

Le indagini, condotte su campioni sospetti, prelevati in corso di esame necroscopico da animali selvatici presso la Sezione Diagnostica di Brescia dell'IZSLER, sono riassunte nella seguente statistica:

Anno	Totale campioni	*M. bovis*	*M. microti*	*M. avium*	*M. terrae* complex	*M. nonchromogenicum*
2004	76			2	1	2
2005	92	2	1		1	3
2006	106	2	1	4	1	3
2007	123	1	5	4	1	5
2008	63			1		
2009	54		2	1		
Totale	531	5	9	12	4	13

La tubercolosi sostenuta da *M. avium* colpisce anche scimmie, proscimmie (Farina *e Coll.*, 1995) e visoni (Thoen *e Coll.*, 1981).

Nei rettili le sedi preferenziali per lo sviluppo delle lesioni specifiche sono fegato e polmone. Oltre a *M. avium* sono nominate specie di micobatteri difficili da coltivare in laboratorio, se non aggiungendo ai terreni degli agenti chelanti, per cui si è fatto ricorso per la diagnosi a *test* sierologici indiretti (ELISA).

MICOBATTERI ATIPICI NELL'AMBIENTE

Tabella 14 – Principali micobatteri non-tubercolari (MOTT) nell'ambiente

Gruppi di Runyon	Specie	Suolo	Piante	Acque dolci	Acque salate	Alimenti
I = fotocromogeni	*kansasii*					
	marinum (balnei)					
	simiae					
II = scotocromogeni	*scrofulaceum*					
	flavescens					
	gordonae (aquae)					
III = non cromogeni	*avium/intracellulare*					
	conceptionense					
	chimaera					
	phocaicum					
	terrae					
IV = a rapida crescita	*fortuitum*					
	chelonae (abscessus)					
	phlei					
	smegmatis					
	vaccae					
	genavense					

NEL SUOLO

Da ricerche svolte in India, arricchendo campioni di terriccio in sospensione acquosa al 3% di sodio lauryl solfato, addizionata con NaOH all'1%, la maggior parte degli stipiti isolati (oltre il 50%) era formata da micobatteri a rapida crescita.

Di questi, la metà apparteneva a *fortuitum*, seguito a distanza da *phlei, vaccae, avium, smegmatis*, *chelonae* (*abscessus*) (Bannalikar *e Coll*., 2006).

Ichiyama *e Coll*. (1988) in Giappone hanno trovato sia nel terriccio che nelle acque superficiali ceppi di *M. avium* e di *M. scrofulaceum*, avendo però usato un terreno selettivo che esclude la crescita di altri micobatteri atipici (ad esempio, *M. terrae*).

Altre specie, non collegabili a malattie (almeno nell'uomo) sono reperibili nell'ambiente. Tra queste, si ricordano: *alvei, bohemicum, brumae, cookii, radium, gastri, hibernae, confluentis, hasiacum, valientiale, madascarense, mageritense, murale, novacastrense, triplex*.

Il tempo di sopravvivenza dei micobatteri (in generale) nel terriccio e nei pascoli viene stimato attorno ai due anni (D.M. Rep. It. 15-12-95 n° 592)

NELLE ACQUE

Carson *e Coll*. (1978) dicono che gli atipici sopravvivono in maniera eccezionale nelle acque. Dai loro esperimenti, eseguiti introducendo piccole quantità di *M. chelonei* e *M. fortuitum* in acqua distillata (quindi esente da sostanze nutritive !), si è visto che questi germi in 10 giorni a +25 °C si moltiplicano fino a valori di 10^4 - 10^6 cellule per ml e che rimangono quasi invariati per circa un anno.

Da una ricerca condotta in Germania da Fischeder *e Coll*. (1991) non sarebbe raro isolare micobatteri atipici da impianti di potabilizzazione e da reti di distribuzione delle acque ad uso domestico.

Su 105 campioni esaminati, 86 erano positivi. La concentrazione dei bacilli alcool-acido resistenti variava fra 10^2 e 10^3 cellule/ml ed i gruppi di Runyon più frequentemente coinvolti erano scotocromogeni e non-fotocromogeni delle specie *gordonae* (maggior frequenza), *flavescens*, *kansasii*, *chelonae*.

Un isolamento di *M. fortuitum* si è avuto in un impianto di potabilizzazione che sottoponeva le acque a parecchi trattamenti (clorazione, flocculazione, sedimentazione, filtrazione su sabbie, disinfezione con cloramina.

Fortunatamente la maggior parte dei micobatteri che si incontrano nelle acque sono saprofiti non-patogeni o scarsamente pericolosi per l'uomo. Tuttavia questi Autori hanno notato che non sempre le caratteristiche colturali e biochimiche permettevano di inquadrare i germi isolati in laboratorio nello schema di Runyon, per cui rimanevano dubbi sull'esattezza della diagnosi.

Stinear *e Coll*. (2000) hanno messo in relazione 25 casi epidemici di dermatite ulcerativa con l'acqua di un laghetto presso un campo da golf vicino a Melbourne (Australia). Dall'acqua e del prato circostante, in contemporanea al focolaio, veniva isolato ripetutamente *M. ulcerans*, agente eziologico di una malattia, frequente nell'Africa Occidentale, caratterizzata da questo tipo di lesioni (ulcera di Buruli).

Labombardi *e Coll*. (2002), dopo ripetuti isolamenti di *M. fortuitum* dal tratto respiratorio di pazienti ricoverati in differenti reparti di un ospedale di New York, sono arrivati alla con-

clusione che il microrganismo proveniva dai distributori di ghiaccio installati e colonizzati.

Kunimoto *e Coll*. (2003) in Canada hanno dimostrato che i ceppi di *M. avium* isolati dal sangue di individui malati di AIDS erano geneticamente uguali ai ceppi trovati sia in soggetti normali che nell'acqua di dieci città. La mancanza di relazioni interpersonali fa sospettare quindi la trasmissione da ambiente a uomo.

September *e Coll*. (2004) nell'acquedotto di Pretoria e dintorni (Sud Africa) hanno cercato, accanto ai consueti parametri indici di potabilità, la presenza di eventuali acido-resistenti, trovando le specie *gordonae, gilvum, abscessus, fortuitum, septicum*. Non hanno mai isolato ceppi di *M. avium*.

Hilborn *e Coll*. (2006) negli USA hanno vagliato la presenza di eventuali micobatteri non-tubercolari nell'acqua potabile della più vasta area metropolitana di quel paese. Prima dei trattamenti di potabilizzazione, la percentuale di campioni positivi era del 27%, con una concentrazione media intorno a 160 cellule per 500 ml d'acqua.

Dopo ozonizzazione o filtrazione, i micobatteri si trovavano ancora, anche ripetendo le analisi dopo 26 mesi.

La maggior quantità di campioni positivi (più del 50%) proveniva dai punti d'utilizzo finale, cioè dai rubinetti dell'acqua fredda, dove era facile isolare *M. avium, M. fortuitum* e *M. kansasii*. Si ipotizza che i micobatteri eludano i trattamenti colonizzando in acqua le cellule dei protozoi.

Falkinhan *e Coll*. (2008) negli USA hanno stabilito una relazione certa fra acqua (sia calda che fredda) della doccia domestica e malattia polmonare in un donna. Il micobatterio in questione era della specie *avium*.

Da una ricerca di Pagnier *e Coll*. (2009) in Francia vengono indicate come fonti sospette di contaminazione sia le acque libere che quelle interne ai luoghi abitati.

Tra questi ultimi vengono citati gli impianti di produzione dell'acqua calda negli ospedali, le docce (in quanto formano *aerosol*), l'acqua delle apparecchiature dei dentisti, i rubinetti dell' acqua da bere.

Gli Autori hanno svolto delle ricerche anche nelle torri di raffreddamento dell'acquedotto municipale (peraltro trattata con biocidi) ed hanno trovato 5 specie di micobatteri atipici (*fortuitum, conceptionense, chelonae, chimaera, phocaicum*) Tra questi germi, che sopravvivono nelle torri di raffreddamento inglobati nelle amebe, ce ne sono alcuni patogeni, del tipo a lenta crescita, dotati di un' insolita virulenza.

M. phocaicum è stato messo in relazione con casi di polmonite cronica nell'uomo, *M. conceptionense* con osteiti post-traumatiche e *M. chimaera* con infezioni polmonari in individui normali.

Griffith (2010) afferma l'esistenza di un collegamento fra micobatteri atipici provenienti dall'acqua e bronchiectasie nell'uomo, in conseguenza di serbatoi che si creano per effetto della temperatura e dell'accumulo di sostanze nutrienti (ad esempio nei *box* doccia).

Questi germi (tra i quali cita le specie *avium*, *fortuitum* e *abscessus*) avrebbero inoltre la caratteristica di una spiccata multi-resistenza *in vivo* ai farmaci anti-tubercolari, in particolare ai macrolidi. Detta resistenza non sarebbe visibile *in vitro*, per un fenomeno non ben spiegabile (resistenza criptica).

NEI VEGETALI

Il fatto che i micobatteri atipici siano tanto diffusi nelle acque spiega la loro ampia presenza sopra e dentro gli organismi vegetali, coi quali convivono senza apparenti conseguenze.

Sono stati fatti isolamenti da radici, fiori e altre parti verdi delle piante. Tuttavia i più interessanti per un'eventuale trasmissione all'uomo sono i vegetali commestibili. Gli atipici (tra cui primeggia *M. scrofulaceum*, un germe non fotocromogeno assimilato al gruppo *avium-intracellulare*) sono stati trovati nelle patate, nelle barbabietole da zucchero, nei legumi e nei cocomeri (Taber *e Coll*., 1991).

Gli studi pubblicati non sono tuttavia numerosi. Una citazione su *M. phlei* viene dal trattato di botanica del Cappelletti (1959), che ne ricorda la presenza nell'erba.

Egamberdiyeva (2007) nomina ancora questa specie microbica in quanto, assieme ad alcuni altri batteri, promuoverebbe la crescita del mais favorendo l'assorbimento di azoto, fosforo e potassio, soprattutto se la pianta si trova in terreni poveri di calcio.

NEGLI ALIMENTI

L'aumentato interesse per le infezioni umane da *M. avium* è giustificato dall'incidenza nei malati di AIDS, soprattutto allo stadio terminale. Tuttavia si è visto che esistono differenze genetiche fra ceppi umani e ceppi animali, per cui è sorto il dubbio che esistano altri serbatoi di contagio sconosciuti nell'ambiente e che sia possibile la trasmissione attraverso gli alimenti.

La tubercolosi aviare, malattia cronica contagiosa, è stata un grosso problema nella produzione avicola, ma dopo il 1950 la sua importanza è andata calando nell'Europa Occidentale, dove si osservano attualmente solo casi sporadici in piccoli allevamenti familiari.

Nei suini l'infezione da *M. avium* è circoscritta spesso ai linfonodi mandibolari e mesenterici e, tranne poche eccezioni, si manifesta con sintomi clinici riconoscibili prima della macellazione.

Jemmi *e Coll*. (1996) hanno condotto in Svizzera uno studio prelevando campioni da suini sani alla visita *ante mortem,* da polli di allevamenti con tubercolosi clinica (carni e uova), da mangimi e acque d'allevamento.

Numerosi ceppi di *M. avium* sono stati isolati dai suini e dai polli, nessuno dalle uova. Lo studio dei genotipi effettuato con tecnica PCR ha evidenziato che i ceppi provenienti dai polli sono geneticamente diversi da quelli isolati dai suini e dall'uomo. Viceversa, i ceppi di *M. avium* del suino presentano analogie strette con quelli trovati nell'uomo, tanto da non essere distinguibili.

Gli Autori hanno concluso assolvendo i polli (e le uova) dal ruolo di vettori di micobatteriosi, mentre ritengono che le carni suine possano in qualche modo trasmettere l'infezione all'uomo nel caso di compromissione delle difese organiche.

Ritengono, infatti, che dai linfonodi mandibolari e mesenterici del suino l'infezione possa passare alle carni durante la macellazione e che *M. avium* possa giungere all'uomo, essendo abbastanza resistente al calore e capace di sopravvivere a basso pH e ridotta A_w.

Benché non ci siano dati probanti, questi Autori ricordano le ricerche di Horsburgh *e Coll*. (1994) su formaggi a pasta dura e su paté sospettati di diffusione dell'infezione da *M. avium* negli USA.

Con l'eradicazione della tubercolosi bovina e con la pratica della pasteurizzazione è quasi scomparso del tutto il rischio di infezioni alimentari trasmesse per mezzo del latte.

Non sono però scomparsi dalle stalle i micobatteri atipici, per cui è logico che possano trovarsi anche nel latte crudo.

Da ricerche condotte in Germania su 620 campioni di latte, è emerso che il 14,7% era contaminato da questi microrganismi alcool-acido resistenti.

I micobatteri arriverebbero nel latte dall'ambiente (terriccio, fieno, recipienti di raccolta del

latte), raramente dalla mammella, anche se questa via non è da escludere. Per di più la mammella nel bovino infetto da *M. avium* non presenta nessuna alterazione (Nassal, 1963).

Circa un eventuale pericolo per la salute del consumatore, è perlomeno da ritenere sicuro il latte pasteurizzato (Schliesser *e Coll*., 1970).

Difatti i micobatteri, in veicolo acquoso, vengono sicuramente distrutti immediatamente a 80 °C, in 2-4 secondi a 71 °C, in 10-20 minuti a 62 °C (Mantovani, 1961).

Sono stati fatti esperimenti per accertare la sopravvivenza dei micobatteri nei derivati del latte e si è visto che nel burro questi germi resistono fino a 2 mesi, nei formaggi Emmenthal e Gruyère 30 giorni, nel Camembert 47 giorni, nel Cheddar, Edam, Tilsit per tre mesi, nei formaggi non stagionati un anno circa (Mantovani, 1961).

Dai dati sperimentali raccolti, sembra ormai verosimile che metà delle persone colpite da morbo di Crohn sono infette da *M. paratuberculosis*. Diverse sono le possibilità di trasmissione del batterio all'uomo, ma escludendo il contagio interumano e sapendo che gli animali sono il maggior serbatoio, si ritiene che la via di trasmissione più probabile sia quella animale-uomo o prodotti di origine animale-uomo. Di questo parere sono diversi Autori, tra cui Hammer (2007) a proposito del latte crudo.

È certo che *M. paratuberculosis* possiede una resistenza al calore superiore a *M. bovis* e che è in grado di sopravvivere per 15 secondi a 71,5 °C (temperatura di pasteurizzazione) se presente in numero sufficiente, cioè superiore a 10^3 per ml. Inoltre, la formazione di agglomerati cellulari favorisce la termoresistenza.

Studi sul latte pasteurizzato hanno permesso di evidenziare l'esistenza di *M. paratuberculosis* nel latte stesso, per cui in molte nazioni è stato varato un programma di certificazione basato sul controllo annuale degli allevamenti da latte, attraverso esami delle feci o ricerca degli anticorpi nel sangue (Collins, 1997).

Da controlli fatti in Inghilterra e nel Galles usando la tecnica PCR, unica capace di rilevare i batteri vivi e quelli inattivati dalla pasteurizzazione, su 332 confezioni di latte venduto al minuto è stato trovato positivo il 7% (Nauta *e Coll*., 1998).

Negli USA la ricerca in un allevamento di bovine da latte ha messo in evidenza *M. paratuberculosis* nelle feci (28,6%), nel colostro (7,9%) e nel latte (2,4%). Il microrganismo potrebbe aver raggiunto la ghiandola mammaria con i macrofagi circolanti provenienti dal tratto enterico infetto, visto che queste cellule non riescono facilmente a liberarsi dei micobatteri, che quindi sopravvivono a lungo nel loro interno (Streeter *e Coll*., 1995).

Non esistono abbondanti statistiche riguardanti i micobatteri atipici nel mondo vegetale, anche se è lecito supporre che attraverso l'acqua (serbatoio principale) questi microrganismi possano contaminare frutta e verdura.

Argueta *e Coll*. (2000) hanno provato ad esaminare negli USA i prodotti di supermercato e su 121 prelievi di alimenti vegetali crudi ne hanno trovati 25 contaminati.

M. avium predominava nettamente fra i ceppi isolati da lattuga, spinaci, broccoli, porri, funghi. Sono stati inoltre trovati *M. genavense* e *gordonae* nel basilico, *M. simiae* nei succhi di mela non pastorizzati.

Mediel *e Coll*. (2000) descrivono l'isolamento di micobatteri atipici da pesce congelato (sogliola, merluzzo, rana pescatrice) pronto per la vendita.

NEI MANGIMI

Nanhoff *e Coll*. (2006) hanno dimostrato che *M. marinum* contamina *Tubifex tubifex*, un verme che viene somministrato ai pesci degli acquari. L'ingestione del germe provoca una micobatteriosi atipica in una specie ornamentale di ciprinidi neotropicali (*Rivulus magdalenae*).

CAPITOLO III

Dati statistici sulla presenza dei micobatteri atipici

OSSERVAZIONI SU DUE REALTÀ A CONFRONTO (UOMO E ANIMALI)

L'interesse per le malattie da micobatteri atipici nell'uomo trova conferma ancor oggi per due motivi: l'associazione con l'AIDS e la consapevolezza che alcune patologie polmonari si incontrano con crescente frequenza anche in soggetti non-AIDS.

Inoltre, si è visto che le malattie da atipici possono verificarsi anche in distretti prima non considerati e con manifestazioni nuove.

Un altro fattore che ha sospinto a dedicarsi maggiormente all'argomento deriva dal perfezionamento delle metodiche di laboratorio, con conseguente maggior facilità a riconoscere e identificare i ceppi.

Tuttavia, gli studiosi ammettono un *gap* di conoscenze sui micobatteri atipici, in parte da attribuire al fatto che spesso in sede clinica non vengono eseguiti gli approfondimenti necessari. Inoltre, trattandosi di malattie non soggette a denuncia, perlomeno in molti paesi (USA compresi), manca una precisa valutazione sulla reale incidenza delle forme da MOTT.

Tenuto conto che questi microrganismi possono provocare malattie asintomatiche, per valutarne la diffusione bisogna ricorrere alla ricerca degli anticorpi oppure a prove cutanee di sensibilizzazione.

Nei paesi dove la tubercolosi è poco frequente, si deve ammettere che il ritrovamento di anticorpi verso un antigene micobatterico comune (lipoarabinomannina, LAM) sia da attribuire verosimilmente al contatto con ceppi di micobatteri atipici.

Nel mondo occidentale si stima che la morbilità si aggiri su 1 - 1,8 casi per 100.000 persone, basandosi sul numero di isolamenti, ma sicuramente i dati a disposizione sono lacunosi (Griffith *e Coll*., 2007).

DATI STATISTICI IN UMANA

Nel decennio 1994-2003 presso il Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale Civile di Brescia sono stati isolati da pazienti 1658 ceppi di micobatteri alcool-acido resistenti, di cui 884 definiti classici tubercolari e 774 atipici.

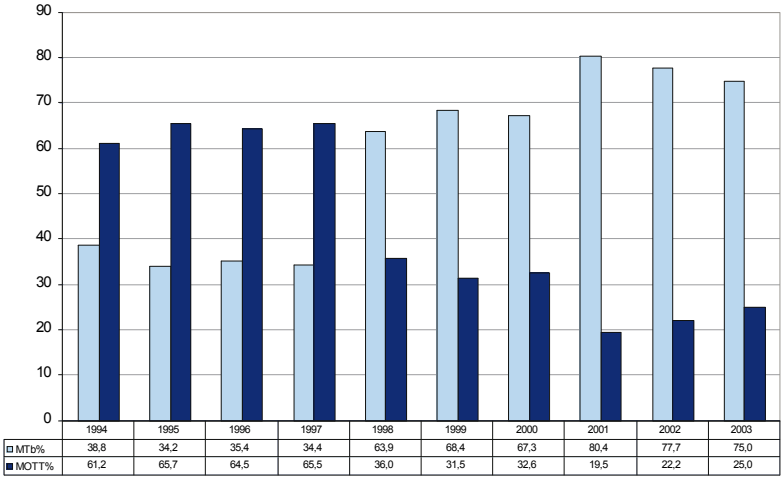
Il 90% del materiale esaminato in dieci anni (66.790 prelievi) era formato da espettorato (42%), sangue (30%), feci (11%) e urine (8%).

La diagnosi di laboratorio si avvaleva in primo luogo dell'esame microscopico sui campioni biologici, ad eccezione del sangue, mediante colorazione di Ziehl-Neelsen o con fluorocromi.

Faceva seguito, previa decontaminazione dei campioni, l'esame colturale su due terreni (uno solido e uno liquido) da incubare a +37 °C per 8 settimane, mentre le colture dei campioni provenienti da cute e sottocute venivano tenute anche a +30 °C.

La disponibilità di un sistema automatizzato di coltura (che riconosce lo sviluppo batterico in seguito a variazione di parametri metabolici all'interno di un terreno liquido) permetteva di rilevare in tempi abbreviati il sospetto di positività.

Grafico 2 - Rapporto fra micobatteri atipici (MOTT) e tubercolari classici (MTb) isolati da pazienti nel periodo 1994 - 2003



(Laboratorio di Microbiologia - Ospedale Civile di Brescia)

Tabella 15 - Micobatteri atipici (totale = 774 ceppi) in confronto con micobatteri tubercolari classici (totale = 884 ceppi) isolati da pazienti nel periodo 1994-2003

Gruppo di Runyon	Specie	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	totale
I fotocromogeni	*marinum*						1			2	1	4
	kansasii	2	2	1	1	1		2	1			10
	simiae							1				1
II scotocromogeni	*scrofulaceum*	1	2		2							5
	gordonae	52	58	26	23	27	19	14	6	2	3	230
	flavescens					1						1
III non cromogeni	*avium* complex	87	95	80	58	17	14	15	8	10	12	396
	genavense	2	2	5	1	2					2	14
	malmoense	1							1	1		3
	phlei				1							1
	triviale							2				2
	terrae						1					1
	lentiflavum							1			2	3
IV a rapida crescita	*fortuitum*					1	1	1	1		1	5
	chelonae					2		2		1		5
	smegmatis				1		1					2
micobatteri tubercolari classici	*M. tuberculosis*	97	91	68	50	94	100	95	111	91	87	884

(Laboratorio di Microbiologia - Ospedale Civile di Brescia)

I micobatteri sviluppati venivano identificati mediante *test* biochimico-colturali o con altri metodi (analisi cromatografica dei lipidi di parete, DNA *probes*, sequenziamento genico).

Dai risultati si nota soprattutto l'inversione di tendenza nella frequenza d'isolamento dei due gruppi (micobatteri tubercolari o MTb e micobatteri atipici o MOTT) osservabile attorno al 1998, data che corrisponde all'introduzione della terapia retrovirale.

L'assortimento dei ceppi è molto vario, come si può notare da tabella, anche se appaiono nettamente predominanti, in ordine decrescente, le specie *avium* complex*, gordonae e genavense.*

In rapporto alla fonte d'isolamento, *M. avium* complex è stato isolato prevalentemente da sangue, espettorato, feci; *M. gordonae* da espettorato e feci; *M. genavense* da sangue.

DATI STATISTICI IN VETERINARIA

La seguente tabella mostra il numero di isolamenti di micobatteri da animali nell'arco di 5 anni (2005-2009) registrati presso il Centro di Referenza per i Micobatteri dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (sede centrale di Brescia).

Tabella 16 - Isolamenti di micobatteri in campo veterinario. Statistica su 5 anni (2005-2009) elaborata presso I.Z.L.E.R. – Centro di Referenza per le Micobatteriosi della sede centrale di Brescia

Specie	Bovino	Bufalo	Cane	Cervo	Capra	Cinghiale	Furetto	Daino	Ovino	Pesce	Suino	Uccelli	Tartaruga	Volpe	Totale
M. avium complex	9		2	3		6	2	2		1	21	7			**53**
M. chelonae	6									20			2		**28**
M. fortuitum										14					**14**
M. fortuitum complex	3									25					**28**
M. gordonae										4					**4**
M. kansasii	4									1	3				**8**
M. marinum										29					**29**
M. microti						8									**8**
M. nonchromogenicum	16			3		1				10					**30**
M. phlei	2														**2**
M. porcinum										3					**3**
M. scrofulaceum								1							**1**
M. smegmatis	7														**7**
M. terrae complex	5			1		6				14			2	2	**30**
M. thermoresistibile	2														**2**
Mycobacterium spp.	6			1			1	1		6					**15**
TOTALE ATIPICI	**60**		**2**	**8**		**21**	**3**	**4**		**127**	**24**	**7**	**4**	**2**	**262**
M. bovis	533	7			3	4		1	4		3				**555**
TOTALE GENERALE	**593**	**7**	**2**	**8**	**3**	**25**	**3**	**5**	**4**	**127**	**27**	**7**	**4**	**2**	**817**

Nota: isolamenti uccelli = anatra, falco, gabbiano, oca, pollo (2), tacchino

Si può osservare che:
- dei 262 ceppi atipici, tre quarti sono rappresentati da sole 6 specie (*avium* 20%, *chelonae*, *marinum*, *nonchromogenicum*, *terrae* ciascuno in percentuale prossima all'11%);
- la fonte d'isolamento di micobatteri atipici più ricca si trova nel pesce (127 ceppi = 48%);
- rispetto agli atipici, molto più numerosi sono gli isolamenti di *M. bovis* (555 ceppi su un totale di 817 = 68%), provenienti – come è logico - quasi esclusivamente da bovini.

ESPERIENZE DEGLI ANNI '60

Introduzione

Nel quadro della patologia della malattia tubercolare è entrato in tempi relativamente recenti, come fattore eziologico, un nuovo gruppo di agenti microbici, rappresentato da bacilli alcool-acido resistenti responsabili di quadri morbosi talora simili a quello tubercolare.

Tali bacilli differiscono da quelli tradizionali per caratteristiche colturali e biologiche e per la patogenicità nei confronti degli animali da esperimento. Il fatto che questi agenti microbici possano coesistere nel materiale patologico con i classici micobatteri tubercolari ed eventualmente anche con i micobatteri saprofiti, apatogeni, rende il problema della identificazione e della differenziazione di questi microrganismi di vitale importanza, sia sul piano puramente biologico che su quello della medicina pratica.

Dal lato biologico la difficoltà che il problema pone deriva dalla grande diffusione che hanno in natura i micobatteri e dal loro notevole polimorfismo. Dal lato pratico, il riconoscimento dell'esistenza di nuove specie di micobatteri comporta il ricorso a particolari tecniche di studio nell'indagine batteriologica e a nuovi criteri terapeutici nel trattamento della malattia tubercolare.

Per quanto l'esistenza di ceppi di micobatteri aventi caratteri diversi da quelli propri dei micobatteri, parassiti e saprofiti delle specie note, fosse stata prospettata già fin dalla fine del secolo XIX, solo negli ultimi decenni le segnalazioni da parte di vari Autori sono diventate numerose, in rapporto soprattutto a una maggiore incidenza dei casi di infezione sostenuti da tali microrganismi.

I micobatteri appartenenti a questo gruppo eterogeneo non hanno ricevuto ancora una posizione tassonomica definita nel genere *Mycobacterium*. Pertanto, le varie denominazioni attribuite dai singoli Autori ai ceppi da loro isolati risentono di questo stato di incertezza nei riguardi dell'inquadramento nella sistematica.

Alcuni ceppi sono stati indicati con termini che ricordano le condizioni del primo isolamento: *M. battey*, dal nome dell'ospedale di provenienza; *M. kansasii*, *M. glasgowii*, dalle rispettive località geografiche; *M. balnei*, dall'acqua di piscina, ecc.

Altri ceppi micobatterici vengono indicati con denominazioni riferentesi all'aspetto delle loro colonie in coltura: *yellow bacilli*, *orange bacilli*, *M. luciflavum*, ecc.

NOTA
"*Esperienze degli anni '60*" riporta le pagine essenziali di una tesi di laurea in Scienze Biologiche, discussa presso l'Università di Padova nel novembre 1965.
Il titolo della tesi era: "Analisi critica dei metodi colturali, biochimici e biologici di differenziazione tra micobatteri tubercolari tipici e atipici (o anonimi). Ricerca su 50 stipiti di micobatteri tubercolari isolati dall'uomo".
Relatore: Prof. Mario Cappellato
Laureando: Maurizio Zavanella

Altri Autori indicano il ceppo in rapporto al tipo di malattia che esso determina: *M. ulcerans, M. abscessus, M. scrofulaceum.*

L'eterogeneicità di questa nomenclatura rende ancora più difficile il dare una posizione definita ad un materiale microbico così abbondante e confuso.

Karslon (1958) ha proposto di riunire tali micobatteri sotto l'indicazione generica di "*Mycobacterium species*". Tuttavia per definire, raggruppandoli, i vari bacilli alcool-acido resistenti (distinti dai micobatteri tubercolari, ma che possono dare luogo nell'uomo a malattie talora simili alla tubercolosi e per le quali è stato proposto il termine di micobatteriosi) si usa, anche se impropriamente, la denominazione generica di "micobatteri atipici" o "anomali", proposta da Hauduroy (1955) o quella di "micobatteri anonimi", proposta da Runyon (1957), che è attualmente di uso più comune.

Secondo Runyon le caratteristiche più comuni dei micobatteri anonimi sono riassumibili nei seguenti punti:

a) formano colonie lisce, spesso fortemente pigmentate in giallo;
b) crescono in 1-2 settimane e sono capaci di svilupparsi a temperatura ambiente, cioè a +25 °C;
c) non provocano malattie nella cavia;
d) mostrano evidente attività catalasica;
e) sono fortemente resistenti agli antibiotici tubercolari classici (streptomicina, PAS, isoniazide).

Il medesimo Autore divide i micobatteri atipici in 4 gruppi:

1. FOTOCROMOGENI (come *M. luciflavum, balnei, kansasii*, ecc)

Si trovano in malattie tubercolo-simili nell'uomo e presentano le seguenti caratteristiche:

- non sono pigmentati se fatti crescere al buio; tuttavia, colonie di 5-6 giorni bianche, esposte a lampada da 100 W per 20-30', diventano gialle dopo incubazione al buio per 6-24 ore;
- se fatti crescere alla luce continua, il pigmento può iscurirsi a rosso mattone;
- crescita uguale al micobatterio tubercolare o più rapida a 37 °C;
- a temperatura ambiente sono visibili in 3-4 settimane;
- sono più larghi dei tubercolari e spesso abbastanza lunghi. Presentano granuli, tendono a ramificarsi e sono fortemente acido-resistenti. Se si trovano di grandi dimensioni, essi appartengono al gruppo "*kansas*";
- danno formazione di corde allentate, catalasi abbondante dopo comparsa del pigmento;
- le cavie, inoculate per via sottocutanea, non danno malattia; i topi, inoculati per via sottoperitoneale o endovena, mostrano segni di infezione.

2. SCOTOCROMOGENI (come *M. paraffinicum*)

Molto raramente si comportano da agenti di malattie polmonari. Generalmente sono saprofiti. Danno colonie gialle o rosso-arancio, sia alla luce che al buio. Il colore è più carico se sono fatti crescere di continuo alla luce. Crescono come i fotocromogeni a 37 °C o a temperatura ambiente. Diversamente dai saprofiti, non crescono a 45 °C. Sono variabili nelle dimensioni, fortemente acido-resistenti, raramente danno corde. Attiva la catalasi. Non sono patogeni per nessun animale da laboratorio.

3. NON CROMOGENI
Sono agenti di malattia polmonare-simile. Certi non sono patogeni e simili al micobatterio aviare. Le colonie sono lisce, emisferiche, non pigmentate, talvolta colore cuoio-marrone, differente però dagli altri gruppi. La velocità di crescita è uguale ai precedenti tipi, sia a 37 °C che a temperatura ambiente. Morfologicamente sono molto pleomorfici, anche a cocco-bacillo ecc. Si trovano anche forme non acido-resistenti, insieme a filamenti di *Nocardia*. Non formano corde e la catalasi è variabile da forte a debole. Non uniforme è la patogenicità, comportandosi certi da saprofiti. Le cavie sono tubercolino-positive. I ceppi di *M. battey* sono più patogeni per il topo, ma non sempre.

4. A RAPIDA CRESCITA
Crescono dal materiale in 3-5 giorni e nelle sub-colture su terreni freschi in 2-4 giorni a 37 °C o a temperatura ambiente. Alcuni sono simili a saprofiti (*M. phlei*), altri (*M. fortuitum*) possono dare alterazioni al rene nei topi iniettati per via endovenosa. Sono fortemente acido-resistenti. Le colonie sono ruvide, non pigmentate o di colore bianco-grigio o beige. Le corde sono a serpentina o, se formano colonie lisce e umide, sono senza corde. La catalasi è attiva.

La sperimentazione

Nel 1964 e 1965, presso l'Istituto di Patologia Generale dell'Università di Padova, è stata condotta una ricerca in collaborazione con l'Ospedale Tisiatrico "Villa Imperiale" di Galliera Veneta (PD), allo scopo di portare un contributo al problema dei micobatteri tubercolari anonimi.

Date le incertezze in questo campo, si è ritenuto interessante condurre uno studio il più possibile completo su un vasto materiale patologico proveniente da reparti tisiologici.

"Villa Imperiale" - ex-Ospedale Tisiatrico - Galliera Veneta (Padova)

Materiali e metodi

Sono stati esaminati 500 campioni, in gran parte costituiti da espettorato e broncoaspirato, prelevati da soggetti con forme tubercolari diagnosticate.

I campioni, dopo decontaminazione con NaOH al 4%, sono stati sottoposti a controllo microscopico (striscio e colorazione di Ziehl-Neelsen) e seminati sui terreni IUTM, Dubos solido e liquido, Petragnani, incubati a temperatura ambiente e a +37 °C per 3 mesi.

Parte del materiale patologico, trattato come sopra, è stato inoculato *i.m.* a ml 1 nelle cavie e *i.p.* a ml 0,2 nei topi, tenuti in osservazione, rispettivamente, per 6 mesi e per 30 giorni.

Dopo necroscopia, dai principali visceri degli animali venivano seminati i terreni per tentare il reisolamento in coltura.

Dall'insieme delle colture sviluppate sono stati selezionati 50 ceppi di bacilli alcool-acido resistenti, in obbedienza ai seguenti criteri di scelta: diversità dei pazienti, delle fonti d'isolamento e degli aspetti colturali, con particolare riguardo ai tempi di sviluppo.

Ceppi isolati da:	Colture sviluppate in:		
	< 3 settimane	3-4 settimane	oltre un mese
Espettorato	7	15	13
Broncoaspirato	2	2	7
Urine		1	2
Prova biologica su cavia	1	1	
Prova biologica su topo	1		

La classificazione dei ceppi è stata eseguita mediante prove (1) colturali, (2) biochimiche, (3) di resistenza agli antibiotici, (4) di patogenicità.

1. Prove colturali

Sono state ripetute le prove sui tempi di crescita in coltura, valutando l'aspetto delle colonie a temperatura ambiente e a +37 °C (sia in luce che al buio).

Prove di pigmentazione

Accertati i vari aspetti dello sviluppo colturale nei diversi terreni di prova (soprattutto solidi) e preso nella dovuta considerazione il periodo d'incubazione (che assume un notevole valore discriminativo) si procede nei casi positivi a sub-colture in serie su terreno selettivo solido (ad esempio, IUTM o Lowenstein-Jensen), annotando forma, tipo e pigmentazione eventuale delle colonie isolate o delle patine colturali.

Una parte dei tubi colturali va mantenuta a temperatura ambiente (25 °C); un'altra parte, posta nelle medesime condizioni di temperatura, una volta ottenuto lo sviluppo microbico viene esposta alla luce per un periodo di 30 giorni, allo scopo di studiare il fenomeno della pigmentogenesi (pigmentazione in presenza di luce). Lo stesso fenomeno è inoltre osservabile conservando le provette colturali, a sviluppo raggiunto, in ambiente privo di luce.

L'eventuale esistenza di particolari ceppi fotocromogeni, ascrivibili al I° gruppo di Runyon, è accertabile esponendo per 20-30 minuti, alla luce di una lampada da 100 Watt, colture dell'età di 5-6 giorni, successivamente incubate in termostato al buio. Come è noto, con questo procedimento si realizza una pigmentazione di colore giallo.

Aspetto delle colture

I micobatteri tipici sono caratterizzati da colonie:	*I micobatteri aventi caratteri di atipicità sono caratterizzati da colonie:*
- rotondeggianti, di media grossezza, granulose al centro e rilevate, piatte alla periferia e con contorno frastagliato, poco o nulla confluenti, di color avorio	- grosse, rotondeggianti od oblunghe, emisferiche e convesse, mucose, filanti, confluenti in formazioni oblunghe o in uno strato umido abbondante, color rosso-mattone
- più piccole, tendenti a dare granuli ravvicinati poco confluenti	- di dimensioni variabili, confluenti in uno strato secco o non, colore da biancastro a giallo intenso
- piccole, granulari, omogenee, tendenti a dare uno strato asciutto sottile, di colore biancastro o incolore	- a forma di patina estesa, mucosa, omogenea, in strato uniforme abbondante color bianco
- c.s. ma più gialle	
- secche, granulose, color avorio-biancastro	

2. Prove biochimiche

Sono stati applicati 7 *test* biochimici, seguendo le indicazioni di Bailey-Scott e di Runyon. Consistevano nelle prove della niacina, catalasi a temperatura ambiente, catalasi a +68 °C, crescita in Brodo tioglicolato, crescita in presenza di vitamina PP, fosfatasi, resistenza al lisozima.

3. Prove di resistenza agli antibiotici

La sensibilità agli antibiotici è stata valutata determinando la concentrazione minima inibente di 10 sostanze antitubercolari in terreno solido (IUTM) e liquido (Kirchner) col metodo delle diluizioni.

Allestimento delle prove per la determinazione della concentrazione minima inibente (MIC) in terreno solido e in brodo
(Jourmans, 1951; Bracco, 1962; Blasi, 1964)

I ceppi vengono posti in presenza di concentrazioni scalari (espresse in microgrammi per ml) dei farmaci anti-tubercolari, ad esempio: idrazide dell'acido isonicotinico INH 10→0.05, streptomicina 10→0.2, PAS 100→0.5, cicloserina 100→5, pirazinamide 1500→1000, viomicina 20→2.5, EITA 20→1, kanamicina 20→2, morfazinamide 750→150.
Ogni antibiotico viene incorporato, alle varie concentrazioni, in terreno IUTM, prima di distribuirlo in provette a 4 ml e sottoporle a coagulazione a 85 °C per 45 minuti.
Le provette, seminate con 0,2 ml di una sospensione allestita in soluzione fisiologica sterile partendo da colture sviluppate su terreno solido, vengono incubate a + 37 °C in termostato per 4 settimane.
La più bassa concentrazione di antibiotico che impedisce la crescita microbica nella progressione delle diluizioni corrisponde alla minima concentrazione inibente (MIC).

Per antibiotici come Isoxyl (4-4 diiso-amilossitiocarbanilide),è preferibile introdurre le diluizioni del farmaco (da 25 a 5 mcg/ml) in terreni liquidi (ad esempio: Brodo di Kirchner o di Middlebrook) dopo sterilizzazione.
I terreni liquidi offrono il vantaggio di non contenere lecitina dell'uovo, che può influire sulla concentrazione finale dell'antibiotico aggiunto.

Concentrazione minima inibente (MIC) per gli antibiotici usati nella sperimentazione e criteri di valutazione della soglia di resistenza *in vitro*

Chemioantibiotico	Concentrazione minima inibente (MIC) espressa in mcg/ml di terreno	Soglia di resistenza *in vitro* indicata in mcg/ml di terreno
Idrazide dell'acido isonicotinico (INH)	0,05 (secondo vari Autori oscilla da 0,01 a 0,1)	1-10
Streptomicina	0,2-1	5 (secondo alcuni Autori 2,5-10)
Acido para-amino-salicilico (PAS)	1	10
Cicloserina	20 (in terreni solidi) 5-10 (in terreni liquidi)	100
Pirazinamide	100-1000 (in terreni solidi) 100-200 (in terreni liquidi)	1000-2000
Viomicina	2,5-6,5	
EITA	0,6	20
Kanamicina	0,1 (in terreni liquidi) 5 (in terreni solidi, secondo alcuni Autori 0,5-2)	20
Morfazinamide	150-750	Alquanto inferiori a pirazinamide. Non ci sono dati precisi.
Isoxyl (4-4 diisoamilossitiocarbanilide)	5-10	25

4. Prove di patogenicità

a) in vitro

Si tratta di prove indirette di patogenicità: rosso neutro, auramina, formazione di corde.

Test del rosso neutro (Dubos e Coll., 1948)

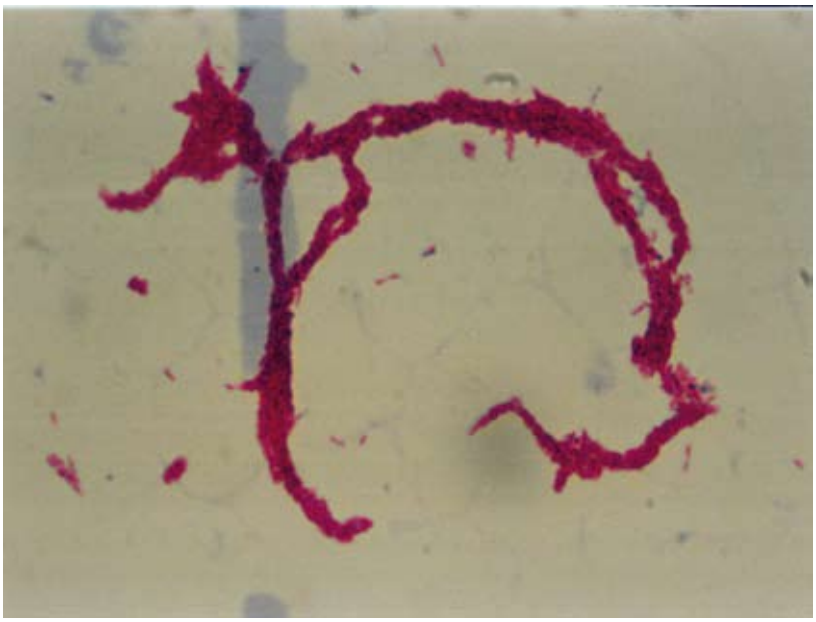
La prova consiste nel trasferire alcune colonie da un terreno di coltura solido in una provetta da centrifuga da 15 ml con tappo a vite, contenente 5 ml di alcool metilico.
Si mette a incubare a +37 °C per un'ora, si centrifuga (2000 rpm per 20 minuti) e si decanta l'alcool. L'operazione va ripetuta per altre due volte.
I germi lavati vengono risospesi in una soluzione acquosa di NaCl al 5% e di barbiturato di sodio all'1%.
Alla sospensione tamponata si aggiungono 0,2 ml di una soluzione acquosa allo 0,05% di rosso neutro, colorante basico.
Si agita la sospensione, che diventa gialla per l'alcalinità del mezzo e si mette ad incubare per un'ora a +37 °C.
Si agita la provetta ogni quarto d'ora e si legge il risultato dopo il periodo d'incubazione.
I germi che danno positiva la reazione del rosso neutro (tutti i micobatteri virulenti) fissano il colore ed appaiono come piccoli ammassi granulari di colore rosa o rosso, mentre i germi che danno negativa tale prova (micobatteri avirulenti, atipici e saprofiti) rimangono di aspetto invariato.

Test dell'auramina (Erlich, 1960)

La prova si basa sull'osservazione che, quando una piccola quantità di coltura di bacilli tubercolari patogeni viene strisciata su un dischetto impregnato di auramina (colore fluorescente giallo brillante), la tinta del colore rimane immutata per oltre due minuti dopo l'aggiunta di idrato sodico allo 0,5% (reazione positiva).
I micobatteri non patogeni scolorano completamente l'auramina (reazione negativa) e quelli anonimi (o atipici) danno reazione positiva di carattere particolare, in quanto il colore prodotto va dal giallo al rosso-mattone.

Test della formazione di corde (Middlebrook e Coll., 1957)

Tale formazione, che si può mettere in evidenza direttamente sul preparato microscopico con la colorazione di Ziehl-Neelsen, consiste nella disposizione a cordoni intrecciati che i micobatteri tubercolari assumono in virtù della presenza di fenomeni di attrazione esercitati da cariche elettriche di gruppi polari delle molecole costituenti la membrana batterica.
Questo accollamento è ritenuto espressione di un fattore di virulenza, il cosiddetto "fattore cordale", caratteristica degli stipiti patogeni virulenti tipici e atipici.
La prova riesce meglio impiegando colture di bacillo tubercolare di 15 giorni a +37°C, in terreno liquido di Dubos al Tween 80, addizionato dello 0,5% di siero albumina bovina e del 5% di plasma umano non riscaldato.
Per mezzo di una pipetta Pasteur si trasferisce, cercando di agitare il meno possibile, un po' di materiale colturale su un vetrino, sul quale è stata posta in precedenza una goccia d'acqua e si pratica uno striscio che si fissa e si colora col metodo di Ziehl-Neelsen.



Formazione di "corde" in micobatteri atipici – Ceppo fotocromogeno del I° gruppo di Runyon - Striscio da coltura su IUTM - Colorazione di Ziehl-Neelsen - Ingrandimento = 1000 x

b) prove biologiche

La patogenicità per gli animali da esperimento (cavie e topi), inoculati con estratti del campione o con sospensioni dei ceppi isolati, è stata saggiata ricercando alla necroscopia le lesioni tipiche. Inoltre sono stati effettuati esami istologici su sezioni colorate con ematossilina-eosina, dopo inclusione in paraffina degli organi più indicativi (milza, fegato, rene) prelevati da cavie e topi.

Inoculazione diretta del campione negli animali da esperimento

Le cavie del peso medio di gr. 350, in numero di due per ogni singolo campione di materiale, vengono inoculare per via sottocutanea, nella regione inguinale, con ml 1 di sospensione.
Questa proviene dal campione trattato con uno dei metodi di decontaminazione. L'inoculo deve avere pH neutro.
I topi (*Mus musculus* var. *alba*) del peso medio di gr. 25, in numero di tre per ogni campione in esame, vengono inoculati per via endoperitoneale con ml 0,2 della medesima sospensione.
Gli animali, mantenuti in gabbie separate, vanno sottoposti a periodici controlli per verificare l'eventuale insorgere dell'infezione tubercolare.
L'andamento della malattia può essere monitorato anche dalla palpazione in prossimità del punto d'inoculo per riconoscere l'ingrossamento dei linfonodi regionali.
La formazione eventuale di ulcere aperte consente il prelievo con un tampone e la semina su terreno solido del materiale raccolto.
Gli animali spontaneamente deceduti sono sottoposti a necroscopia e da alcuni visceri (milza, polmone, fegato, linfonodi) si eseguono strisci da colorare col metodo di Ziehl-Neelsen e, nei casi sospetti, accertamenti istologici.
Negli animali sopravviventi, il periodo di osservazione va prolungato per sei mesi nella cavia e per trenta giorni nel topo.
Nell' autopsia, in caso positivo, si osserva il seguente quadro macroscopico:
- nella cavia: invasione dei gangli inguinali, lombari, retro-epatici, prima nello stesso lato d'inoculazione e poi in quello opposto; invasione della milza che diviene ipertrofica, con chiazze biancastre; aumento di volume del fegato con chiazze giallastre; invasione dei polmoni, più rara e tardiva, specie negli animali morti o sacrificati dopo 4-6 mesi, con tubercoli biancastri, disseminati o confluenti.
- nel topo: milza ipertrofica, processi necrotici nel fegato e nel polmone, alterazioni macroscopiche del rene.

Inoculazione negli animali da esperimento di un ceppo già isolato in coltura

Si inoculano 0,1 mg (peso secco) di batteri sviluppati su terreno solido (ad esempio, Lowenstein-Jensen) per ml di soluzione fisiologica sterile.
Cavie e topi ricevono le quantità di cui sopra con uguale periodo d'osservazione.
Avendo a disposizione sensitine specifiche (PPD), la prova biologica può servire anche per identificare presuntivamente il micobatterio inoculato.
In questo caso 0,1 mg di bacilli (peso secco) vengono inoculati (risospesi in 1 ml di soluzione fisiologica) in una cavia adulta nelle parte interna della coscia.
Dopo 3 settimane è possibile la prova allergica mediante inoculazione sottocutanea nei fianchi dell'animale di 0,1 ml di PPD (*Purified Protein Derivative*) alla concentrazione di 25 TU (unità tubercoliniche).

Risultati

I ceppi studiati sono stati classificati come segue:
- 6 micobatteri tubercolari umani classici
- 26 micobatteri tubercolari umani "modificati"
- 18 micobatteri atipici (tre appartenenti al tipo I di Runyon = fotocromogeni, quattordici al tipo III = non cromogeni, uno al tipo IV = a rapida crescita).

Sono stati chiamati "modificati" quei ceppi che, mostrando caratteristiche intermedie, non rientrano negli schemi dei tipici e degli atipici, per cui sono da presumere varianti di quelli classici.

Quadro riassuntivo dei risultati delle prove
(classificazione dei ceppi con evidenziati in rosso i comportamenti inattesi)

Test		Micobatteri tubercolari classici **6 ceppi**	Micobatteri tubercolari "modificati" (classici che mostrano un comportamento intermedio in alcune prove) **26 ceppi**	Micobatteri atipici o anonimi **18 ceppi** (3 gruppo I - 14 gruppo III - 1 gruppo IV)
1. Prove colturali	Pigmentazione	-	-	+ (limitata al gruppo I)
	Crescita a temperatura ambiente (+25 °C)	-	-	+ (limitata ai gruppi III e IV)
	Rapida crescita	-	-	+ (limitata al gruppo IV)
2. Prove biochimiche	Niacina	+	+	-
	Catalasi a temperatura ambiente	-	- (62%) + (38%)	+
	Catalasi a +68 °C	-	-	-
	Crescita in Brodo tioglicolato	-	- (85%) +(15%)	+
	Crescita in terreno con vitamina PP	+	+	+
	Fosfatasi	+	+	+
	Resistenza al lisozima	-	-	+
3. Prove di resistenza agli antibiotici *	Antibiotico-resistenza, valutata su: PAS, INH, streptomicina	-	- (19%) + (81%)	+ (72%) - (28%)
4. Prove di patogenicità	Rosso neutro	+	+	+
	Auramina	+	+	+
	Formazione di corde	-	-	+ (67%) - (33%)
	Prova biologica ** su: – cavia – topo	 + -	 + (58%) - (42%) - (58%) + (42%)	 - (83%) + (17%) +

* Prove di resistenza agli antibiotici
(% di ceppi resistenti)

Micobatteri	**PAS**	**INH**	**Streptomicina**	Cicloserina	Pirazinamide	Viomicina	EITA	Kanamicina	Morfazinamide	Isoxyl
Tubercolari classici	0	0	0	0	33	83	66	16	66	33
Tubercolari modificati	17	58	65	4	46	92	50	35	42	19
Atipici	28	44	50	11	22	94	61	33	67	67

** Prova biologica

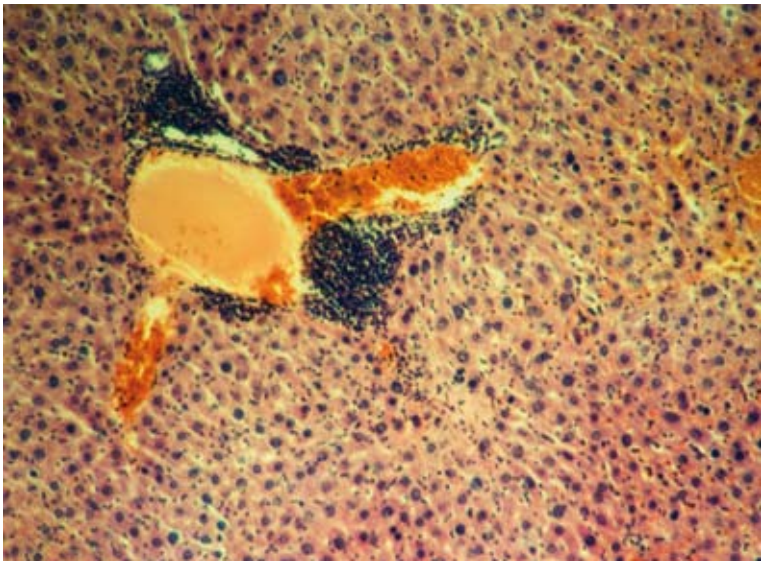
Animali da esperimento ed esito della prova	*Casi*	*%*
Cavia positiva	23	46
Cavia negativa	27	54
Topo positivo	30	60
Cavia e topo positivi	3	6

Mentre per la cavia la necroscopia mostra, nei casi positivi, le classiche alterazioni macroscopiche (infiltrazione nodulare alle linfoghiandole inguinali ecc.), per il topo le alterazioni notate, a distanza di 30 giorni dall'inoculazione, sono:

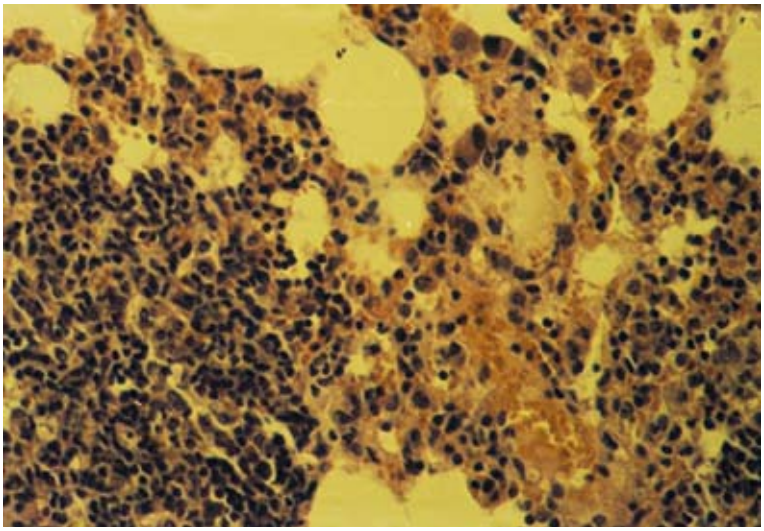
Alterazioni osservate nei topi alla necroscopia	*Casi*	*%*
Ipertrofia della milza	28	56
Necrosi polmonare	7	14
Ipertofia del rene	4	8
Necrosi epatica parcellare	1	2

Esami istologici

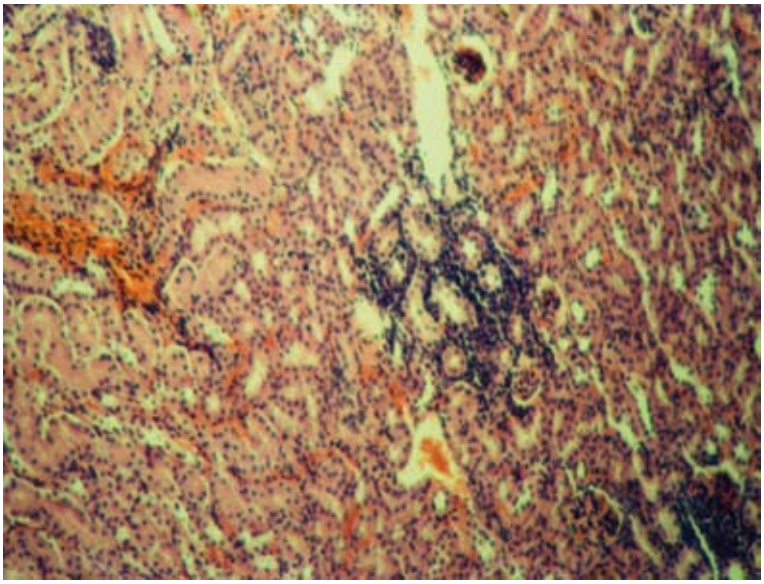
La patogenicità degli atipici per il topo inoculato *i.p.* è confermata dalle alterazioni osservate, consistenti essenzialmente in una tendenza all'infiltrazione di cellule mononucleate a sede prevalentemente perivasale (fegato, milza e rene) e in infiltrati monocitari più cospicui che invadono gli alveoli, dando luogo a quadri di alveolite nel polmone, mentre non si osservano elementi specifici del tubercolo (cellule giganti e cellule epitelioidi).



Fegato di topino a 30 giorni dalla data d'inoculazione intraperitoneale con micobatteri atipici (ceppo non cromogeno del III° gruppo di Runyon)
Si nota infiltrazione prevalentemente monocitaria a sede perivasale
Colorazione ematossilina-eosina
Ingrandimento = 130 x



Polmone di topino sacrificato a 30 giorni dalla data d'inoculazione intraperitoneale con micobatteri atipici (ceppo non cromogeno del III° gruppo di Runyon)
Si nota infiammazione ed infiltrazione alveolare
Colorazione ematossilina-eosina
Ingrandimento = 60 x



Rene di topino inoculato con micobatteri atipici
(ceppo non cromogeno del III° gruppo di Runyon)
Si nota infiltrazione mononucleare peritubulare
Colorazione ematossilina-eosina
Ingrandimento = 60 x

Conclusioni

La denominazione di micobatteri "modificati" è stata introdotta a causa del comportamento colturale, biochimico e biologico che si discosta dagli schemi suggeriti dagli Autori per i micobatteri tubercolari classici.

Difatti, contrariamente alle previsioni, alcuni ceppi tubercolari sono catalasi-positivi (a temperatura ambiente), crescono in Brodo tioglicolato, sono antibiotico-resistenti, non patogeni per la cavia ma per il topo. Così pure, fra gli atipici non tutti i ceppi mostrano antibiotico-resistenza né formano corde, mentre alcuni sono patogeni anche per la cavia.

Tenuto conto che il 52% dei ceppi non rientrava negli schemi tassonomici dei micobatteri tipici e degli atipici, rispettivamente, mostrando caratteristiche intermedie, si può avanzare qualche riserva sui criteri suggeriti da Runyon come base della sua classificazione (pigmentazione delle colonie, crescita a temperatura ambiente, non patogenicità per la cavia, resistenza agli antibiotici).

Il fatto che un'alta percentuale di ceppi dia reazioni differenti da quelle normalmente possedute dai due tipi, umano ed anonimo, farebbe supporre l'esistenza di un nesso filogenetico, nel quale sarebbe riconoscibile una graduale evoluzione da micobatteri ambientali a micobatteri umani tipici attraverso vari stadi intermedi.

PARTE SECONDA

TECNICA DI LABORATORIO

CAPITOLO IV

Trattamento dei campioni e isolamento in laboratorio

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

La maggior difficoltà per isolare i micobatteri sta nella presenza di altri germi inquinanti spesso in quantità massiccia.

Il problema si risolve parzialmente refrigerando i campioni immediatamente dopo il prelievo e trasportandoli a temperatura di frigorifero. Questo metodo di conservazione vale per tutti i tipi di campioni, mentre non è necessario per le feci, che possono essere trasportate per 2-3 ore a temperatura ambiente, oppure congelate.

È accertato che in certi materiali (sputo, urine) il maggior contenuto di micobatteri si trova nei prelievi del mattino.

Si usano recipienti sterili, con tappo a vite, e la consegna al laboratorio deve avvenire comunque entro 24-36 ore, sempre per minimizzare gli effetti negativi della contaminazione secondaria.

Sono da prendere le abituali precauzioni per la salvaguardia del personale che tratta i campioni (vedi *norme specifiche di sicurezza*).

ESAME MICROSCOPICO DIRETTO DEL MATERIALE IN ESAME

L'esame dei tessuti sospetti di contenere bacilli alcool-acido resistenti include la preparazione di opportuni strisci su vetrino da colorare.

Il ritrovamento dei bacilli presso le lesioni è importante, poiché precede l'isolamento, per cui il clinico non deve attendere i tempi relativamente lunghi dell'esame colturale. Al contrario, un esame microscopico diretto negativo non esclude la possibilità che ci siano micobatteri nel tessuto esaminato rivelabili con la semina dei terreni.

L'esame può essere effettuato su tutti i campioni biologici, ad eccezione del sangue, nel quale il numero di micobatteri presenti è sempre inferiore alla soglia di positività.

Il preparato viene allestito raschiando con un vetrino la superficie del tessuto sospetto o strisciando il materiale con l'ansa.

Successivamente il vetrino asciutto viene fissato alla fiamma e colorato, solitamente col metodo di Ziehl-Neelsen (poiché il metodo di Gram non dà buoni risultati) o con fluorocromi.

Le colorazioni più usate sfruttano la caratteristica tintoriale dell'alcool-acido resistenza, che solo i micobatteri possiedono in grado elevato.

I micobatteri, infatti, si colorano bene solo utilizzando coloranti in soluzione acquosa di fenolo (ad esempio, carbol-fucsina), ma una volta colorati resistono ad un trattamento di decolorazione molto energico, eseguito con una miscela di acido e alcool (fenomeno dell'alcool-acido resistenza).

Una colorazione primaria che utilizza i fluorocromi (auramina, rodamina) può essere preferibile in quanto comporta una maggiore sensibilità e consente la scansione del preparato in tempi più brevi.

I limiti dell'esame microscopico diretto sono rappresentati principalmente dalla scarsa sensibilità e dalla non-specificità, che impedisce di dare informazioni sulla specie di micobatteri osservati. Ne consegue che all'esame microscopico deve fare sempre seguito l'esame colturale.

Colorazione col metodo di Ziehl-Neelsen

La tecnica, descritta da Ziehl e Neelsen (riportata da Lennette, 1974), prevede:

- *Soluzione 1* (carbolfucsina) – 10 ml di una soluzione satura di fucsina basica (5 g di fucsina basica in 100 ml di alcool etilico 95%) + 90 ml di soluzione acquosa al 5% di fenolo
- *Soluzione 2* (alcool-acido) - 3 ml di HCl concentrato in alcool etilico 95° fino a 100 ml
- *Soluzione 3* (colorante di contrasto) – soluzione acquosa allo 0,3% di blu di metilene

Lo striscio, fissato alla fiamma, viene coperto con abbondante soluzione 1 e riscaldato con fiamma moderata del *bunsen* nel lato inferiore, fino a comparsa di vapori. Il riscaldamento va ripetuto ad intervalli per 5 minuti.

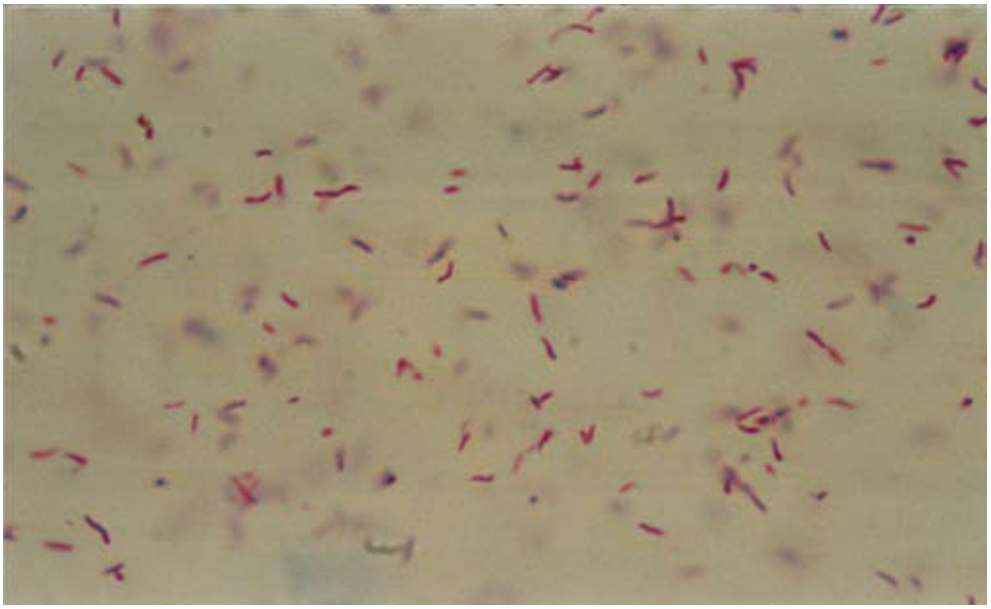
Dopo raffreddamento, il vetrino va lavato con acqua corrente e decolorato con soluzione 2. Segue lavaggio con acqua, colorazione con soluzione 3 per circa 30 secondi, lavaggio finale con acqua.

Il preparato, asciugato con carta bibula nuova, viene esaminato al microscopio con obiettivo 100x, previa apposizione d'olio per immersione.

I bacilli alcool-acido resistenti appaiono colorati in rosso-rosa su fondo azzurro.

Le dimensioni dei bacilli possono fornire qualche indicazione. Bacilli lunghi, grossi, disposti incrociati possono essere *M. kansasii* o *gordonae*; bacilli sottili lunghi o corti: *M. intracellulare* o *M. scrofulaceum*; bacilli sottili, lunghi, incurvati: *M. xenopi.*

Esistono altri metodi di colorazione, ad esempio il metodo di Kinyoun, che evita di riscaldare il vetrino e offre gli stessi risultati.



Micobatteri atipici - Striscio allestito da coltura su terreno IUTM - Colorazione di Ziehl-Neelsen – Ingrandimento = 1000 x

Colorazione col metodo di Kinyoun

Carbolfucsina (fucsina basica 4 g, fenolo 8 g, alcool etilico 95° ml 20, acqua distillata ml 100. Sciogliere la fucsina in alcool, aggiungere fenolo e acqua).

Alcool-acido (3 ml di HCl concentrato in 97 ml di alcool etilico 95°).

Colorante di contrasto verde malachite (soluzione madre preparata con 4 g di verde malachite in 50 ml alcool etilico 95°; soluzione di lavoro preparata con 20 ml di soluzione madre + 180 ml di acqua distillata).

Fissare lo striscio alla fiamma e colorare per 3 minuti con carbolfucsina, senza riscaldare. Lavare con acqua. Decolorare con alcool-acido. Lavare con acqua. Colorare con verde malachite per 30 secondi e lavare con acqua.

In alternativa si può colorare il vetrino con sostanze che fanno apparire i microrganismi fluorescenti (auramina-rodamina, auramina O).

Colorazione per osservazione con microscopio a fluorescenza in luce ultravioletta *(auramina-rodamina)*

La tecnica, descritta da Truant *e Coll*. (1962), prevede:

- *Soluzione 1* - Auramina 1.5 g, rodamina 0.75 g, glicerolo 75 ml, fenolo 10 ml, acqua distillata 50 ml. Filtrare su carta, conservare a temperatura ambiente allo scuro
- *Soluzione 2* - 0,5 ml di HCl in 100 ml di alcool etilico 70%
- *Soluzione 3* - Potassio permanganato in soluzione acquosa 0,5%

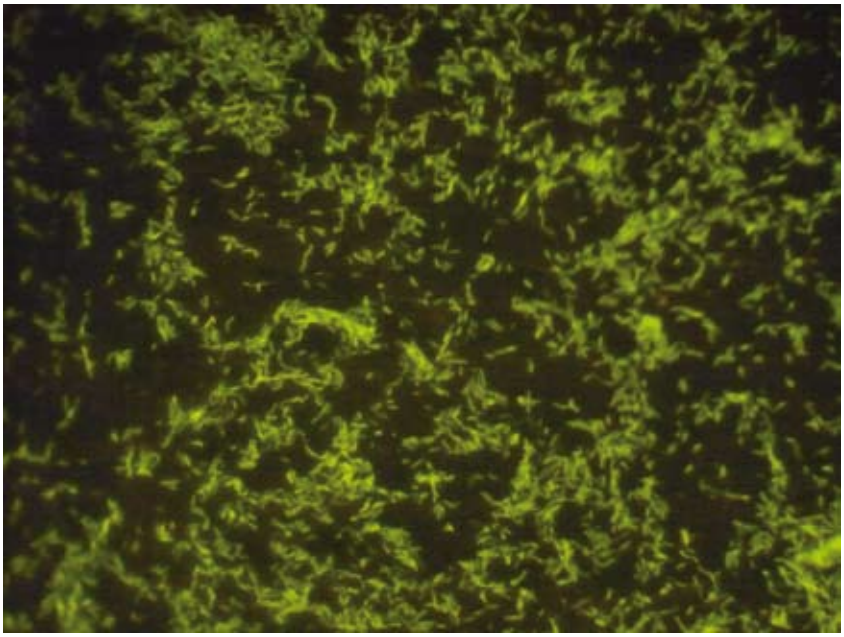
Lo striscio, fissato su piastra riscaldante a +65 °C per 2 ore o una notte, viene colorato con soluzione 1 per 20 minuti a temperatura ambiente, lavato con acqua, decolorato per 2 minuti con alcool-acido, colorato per 2-4 minuti con permanganato, lavato in acqua.
Il preparato, asciugato, si legge al microscopio a fluorescenza con filtri-barriera della lunghezza d'onda compresa fra 410 e 530 nm.
I bacilli alcool-acido resistenti assumono colorazioni varianti fra rosso e giallo fluorescente.

Osservazione con microscopio a fluorescenza dopo colorazione con auramina O

La tecnica, descritta da Richards *e Coll*. (1941) e da BD (nel manuale della Becton-Dickinson col nome di colorazione di Morse) prevede:

- *Soluzione 1* - 0,1 g di auramina O in 10 ml di alcool etilico 95% + 3 ml di fenolo liquido in 87 ml di acqua distillata. Le due soluzioni vanno unite e conservate a temperatura ambiente allo scuro. Non è necessario filtrare per allontanare l'eventuale precipitato
- *Soluzione 2* - 0,5 ml di HCl in 100 ml di alcool etilico 70%
- *Soluzione 3* – Potassio permanganato in soluzione acquosa 0,5%

Lo striscio, fissato alla fiamma, viene colorato con soluzione 1 per 15 minuti a temperatura ambiente, lavato con acqua, decolorato per 2 minuti con alcool-acido, lavato con acqua, colorato per 3 minuti con permanganato, lavato in acqua.
Il preparato, asciugato, si legge al microscopio a fluorescenza con filtri-barriera della lunghezza d'onda compresa fra 500 e 530 nm.
I bacilli alcool-acido resistenti appaiono colorati in giallo-arancio fluorescente.



Mycobacterium fortuitum in coltura su terreno di Löwenstein-Jensen. Striscio colorato con auramina osservato con microscopio a fluorescenza (ingrandimento = 500 X)

DECONTAMINAZIONE DEL CAMPIONE

Questo procedimento ha la duplice funzione di contrastare i contaminanti e di fluidificare gli escreti.

A partire dal 1900 numerose sostanze sono state provate: vapori di formolo, antiformina al 30%, riscaldamento a 54 °C, soda al 4%, acido solforico al 15%, acido cloridrico al 3%, fosfato trisodico al 10%, carbonato d'ammonio, Teepol, lauryl-solfato di sodio, alcuni detergenti (Desogene, Rodalon, Cetavlon, Zephiran, ecc), ma non tutte si sono rivelate innocue per i micobatteri.

Questo fatto indica che nessun trattamento decontaminante è in grado di eliminare la flora batterica concorrenziale e di salvare i micobatteri. Per questo motivo alcuni Autori consigliano di:

- seminare direttamente una parte del campione, senza decontaminazione, e conservarne una parte in congelatore per un eventualmente trattamento;
- centrifugare il materiale per favorire la concentrazione dei micobatteri nel sedimento, oppure filtrare su Millipore nel caso di liquido spinale (Wayne, 1957);
- aggiungere nei terreni penicillina (100 U.I./ml), acido nalidixico (35 mcg/ml), polimixina (25 mcg/ml);
- inoculare una sospensione del campione negli animali da esperimento (*vedi prova biologica*) nei casi in cui si sospetta una forte contaminazione, impossibile da controllare con agenti chimici.

Non tutti i materiali necessitano di essere trattati: per esempio, urine prelevate asetticamente, campioni chirurgici, liquidi spinali, sinoviali o altri fluidi interni poco o nulla contaminati.

In ***diagnostica umana*** sono state proposte numerose varianti alla tecnica di decontaminazione dei campioni. Le più conosciute sono:

1) Procedura con ***idrossido di sodio*** *NaOH* (Petroff, 1915; Krasnow *e Coll.*, 1966; Kubica *e Coll.*, 1967)

Reagenti: NaOH soluzione acquosa sterile 4%, HCl

Il campione da esaminare (escreato, broncoaspirato, liquido pleurico, lavaggio bronchiale, urine) viene decontaminato mediante omogeneizzazione con aggiunta di un pari volume di NaOH al 4%.

Dopo un mantenimento in termostato a +37 °C per 4 ore, la sospensione viene neutralizzata con HCl e centrifugata a 2000 g per 20 minuti

Decantato il soprastante, il sedimento, risospeso in una minima quantità di soluzione fisiologica sterile (indicativamente ml 4), serve per allestire uno striscio destinato all' esame microscopico diretto, per seminare i terreni colturali e inoculare gli animali da esperimento.

Lo stesso trattamento è applicabile a tessuti (frammenti di polmone, milza, linfonodi ecc.) prelevati nel corso di biopsie o necroscopie di animali da esperimento inoculati per la prova biologica. In questo caso i tessuti vengono tagliati a piccoli pezzi con forbici sterili e omogeneizzati in soluzione fisiologica sterile in proporzione di 1:10.

2) Procedura con ***acetil-cisteina-alcali*** (Kubica *e Coll.*, 1967)

Reagenti: citrato trisodico soluzione acquosa al 2,94% (= 0,1 M) ml 50 + NaOH soluzione acquosa al 4% ml 50 + N-acetil-L-cisteina 5 g (preparare al momento, conservare per non più di 48 ore in frigorifero)

Tampone fosfato 0,067 M pH 6,8

Soluzione sterile al 2% di albumina bovina frazione V

Il materiale viene addizionato con uguale quantità di soluzione di acetil-cisteina e lasciato per 15 minuti a temperatura ambiente, agitando occasionalmente. Si neutralizza riempiendo la provetta con tampone fosfato.

Dopo centrifugazione a 2000 g per 15 minuti, il sedimento viene risospeso con 1 ml di soluzione d'albumina, prima di seminare i terreni.

3) Procedura con ***Zephiran-fosfato trisodico*** (Wayne *e Coll.*, 1962; Tison *e Coll.*, 1972)

Reagenti: fosfato trisodico Na_3PO_4 . 12 H_2O 100 g + acqua distillata 400 ml + soluzione concentrata al 17% di benzalconio cloruro o Zephiran® ml 0,75

Tampone per neutralizzazione (Difco)

Aggiungere al materiale un'uguale quantità di soluzione contenente Zephiran, agitare per 30 minuti su agitatore, lasciar riposare per 30 minuti, centrifugare a 2000 g per 20 minuti.

Risospendere il sedimento in 20 ml di tampone per neutralizzazione e centrifugare nuovamente.

Il sedimento, risospeso nello stesso tampone residuo, serve per le semine.

4) Procedura con ***lauryl-solfato*** (Tacquet *e Coll.*, 1963; Engbaek *e Coll.*, 1967)

Reagenti: sodio lauryl-solfato 30 g in 1 lt di acqua distillata a 60 °C + 10 ml NaOH. (sciogliere a +37 °C)

Soluzione di acido solforico 0,9 ml in 1 lt di acqua distillata + 2 ml di soluzione acquosa 1:250 di bromocresolporpora.

A una parte di materiale aggiungere tre parti di soluzione contenente sodio lauryl-solfato. Agitare 3 volte su Vortex a intervalli di 10 minuti. Lasciar riposare per 10 minuti. Centrifugare a 3000 rpm per 30 minuti. Scartare il soprastante e neutralizzare il sedimento con soluzione acida prima di seminare i terreni.

5) Procedura con ***acido ossalico*** (Corper *e Coll*., 1930)

Reagenti: soluzione acquosa sterile di acido ossalico al 5%
Soluzione acquosa sterile di NaOH al 4%
Soluzione fisiologica sterile
Sospendere il materiale in pari quantità di soluzione di acido ossalico. Agitare, lasciare agire per 30 minti con occasionale agitazione, aggiungere soluzione fisiologica sterile. Centrifugare, decantare il soprastante e portare il sedimento a pH 7 con soluzione di NaOH contenente un indicatore.

6) Procedura con ***ditiotreitolo*** *(Konemann,* 1995*)*

Reagenti: soluzione commerciale Sputolysin
Sodio idrato al 2%
Lasciar agire sul materiale adatto al trattamento (espettorato, lavaggio bronchiale) per non più di 15 minuti.

7) Procedura con ***cloruro di cetilpiridinio*** *all'1% con NaCl al 2% (Konemann,*1995*)*

Il metodo è simile al precedente, col vantaggio che i micobatteri tubercolari possono sopravvivere in questo reagente per 8 giorni senza perdita apparente di vitalità.

In ***diagnostica veterinaria***, il materiale, spesso fortemente inquinato, viene preventivamente decontaminato per 4-16 ore in soluzione acquosa di **ipoclorito** 1:1000.
Dopo allontanamento del grasso, il materiale viene omogeneizzato con NaOH al 2% per 10 minuti, neutralizzato con HCl 6N, centrifugato a circa 1500 rpm per 20 minuti.

In alternativa alla soda, si può trattare per 10 minuti il campione da 2-3 ml con un pari volume di **acido solforico** al 4%, addizionato con blu di bromotimolo come indicatore di pH. Segue la neutralizzazione con soda al 6%.

Cottral (1978) ha illustrato un metodo di decontaminazione che consiste nell'omogeneizzare non più di 25 grammi di materiale in 50 ml di brodo, contenente 0,4% di rosso fenolo (indicatore di pH).
L'omogenato, posto su un agitatore magnetico, viene sottoposto a digestione, aggiungendo 100 ml di soluzione composta da 50 g di papaina e 0,6 g di cistina idrocloridrato in 1 lt di acqua distillata.
Si introduce lentamente **NaOH** al 4% fino a viraggio dell'indicatore al rosso. La digestione continua per un'ora a +37 °C, quindi si aggiungono 10 ml di pentano. Una forte agitazione favorisce la concentrazione dei micobatteri nell'interfaccia pentano-acqua.
Con una pipetta si preleva esclusivamente questa parte di liquido, che va centrifugata a 1630 rpm per 20 minuti.
Dal sedimento si possono seminare i terreni selettivi.
Ghittino (1985) per ricercare Nocardia e Micobatteri ha decontaminato i campioni di pesce con **antiformina** (miscela di carbonato di sodio, cloruro di calcio e sodio idrato).

Nel caso specifico della **ricerca del *M. paratuberculosis*** (agente eziologico della malattia di Johne), le tecniche di decontaminazione consigliate sono numerose. Si citano solo alcuni Autori.

Wilson Taylor (1950) raccomanda di omogeneizzare 1 grammo di mucosa intestinale in 10 ml di soluzione acquosa di **acido ossalico** al 5%, filtrare su garza e tenere a +37 °C per 30 minuti, quindi centrifugare a 3500 rpm per 20 minuti, prima di seminare su terreno contenente *mycobactin*.

Ratnamoan *e Coll*. (1986) per purificare il microrganismo isolato dalla mucosa ileale di bovini infetti consigliano un trattamento del campione con **ampicillina**, **tripsina**, **DNA-asi** e **lisozima**.

Shin *e Coll*. (1989) suggeriscono, invece, per ridurre la contaminazione batterica presente nelle feci e coltivare il germe della paratubercolosi, di mantenere il campione fecale per una notte in BHI a mezza concentrazione, addizionato di **esadecilpiridinio cloruro** 0,75%.

Un secondo trattamento prevede l'incubazione della sospensione centrifugata in brodo BHI antibiotato con **anfotericin B**, **acido nalidixico** e **vancomicina**.

Altre possibilità sono presentate da Moyle (1975), Lagadic *e Coll*. (1983), Whipple *e Coll*. (1983), Merkal (1984).

In sintesi, una porzione di intestino dell'animale prelevato 3-4 cm a monte della valvola ileo-cecale o in vicinanza dei linfonodi viene lavata, omogeneizzata in soluzione acquosa sterile di tripsina al 3% e il sedimento decontaminato per 24 ore con **benzalconio cloruro** (Zephyran® 0,1%).

I campioni di feci, raccolti direttamente o con tampone rettale, possono essere sospesi in sufficiente quantità di soluzione fisiologica sterile e decontaminati per 24 ore con l'aggiunta dello 0,3 % di Zephyran®

L'acido ossalico e il cloruro di benzalconio non hanno azione sui miceti, presenti spesso in quantità abbondante nelle feci.

Si può ovviare all' inconveniente aggiungendo al sedimento dei campioni centrifugati due gocce di fungizone in soluzione acquosa a 5 mg/ml.

Nota tecnica

In dettaglio, una delle metodiche per l'isolamento in coltura di *M. paratuberculosis* dalle feci con esadecilpiridinio cloruro (Belletti e Zavanella, 1987), che verrà ripresa anche più avanti, prevede:

Decontaminazione
Feci g 10 + 100 ml di soluzione acquosa 0,75% di esadecilpiridinio cloruro (SIGMA o BDH)
Agitazione rotatoria per 30' a 150-180 movimenti/minuto
Riposo per 5 minuti
Trasferimento di 35 ml in provettone con fondo a V
Sedimentazione per una notte a temperatura ambiente

Semine
0,2 ml di sedimento vengono seminati in doppio su due provette di terreno di Herrold contenente Mycobactin J e sodio piruvato, su due provette di terreno di Herrold con Mycobactin J e su una provetta di terreno di Herrold senza Mycobactin J.
Le provette vengono incubate per 5 giorni a +37 °C in posizione inclinata con tappo semi-svitato e successivamente per 4-10 settimane a +37 °C in posizione eretta, con tappo avvitato.

Lettura
M. paratuberculosis cresce solo in presenza di Mycobactin J e non prima della quarta settimana d'incubazione. Il controllo avviene mediante striscio e colorazione di Ziehl-Neelsen.

Altri tipi di materiale da esaminare

Latte

Nel latte i micobatteri si concentrano nella caseina, mentre sono rari nella panna. Pertanto, si usa addizionare a 25 ml di latte fresco 2,5 ml di soda al 4% o di lauryl-solfato sodico al 20%.

La miscela, agitata per 30 minuti, viene diluita in un pari volume di acqua distillata sterile e centrifugata a 3000 rpm per 30 minuti.

Il sedimento, diviso in due parti, una da seminare sui terreni e l'altra da inoculare negli animali da esperimento.

Alimenti

Argueta *e Coll*. (2000) hanno adottato nelle loro ricerche su prodotti vegetali il seguente metodo.

Ciascun prelievo di 454 grammi veniva lavato sterilmente in un sacchetto con 500 ml di acqua distillata per 10 minuti e quindi il liquido, filtrato su rete, veniva centrifugato a 10.000 rpm per 10 minuti.

Il sedimento, risospeso in brodo Middlebrook 7H9 addizionato con cicloeximide (500 mcg/ml) e glicerolo (10%), era destinato a decontaminazione per 30 minuti a temperatura ambiente con 10 ml di acido ossalico al 5% (oppure NaOH al 2% + sodio citrato al 2,9%). Dopo neutralizzazione con aggiunta di 20 ml di tampone fosfato pH 7 e un'ulteriore centrifugazione, il *pellet* finale (risospeso in 1 ml di tampone) costituiva il materiale di semina.

Le piastre di Middlebrook 7H10 Agar, supplementato con cicloeximide (500 mcg/ml) e verde malachite (0,002%) erano seminate con 100 mcl del campione decontaminato e incubate a +37 °C per 8 settimane, chiuse in sacchetti di politene.

Le colture sviluppate venivano poi trapiantate in brodo Middlebrook 7H9, incubato a +37 °C per 14 giorni e controllate mediante esame microscopico in fluorescenza con colorazione auramina-rodamina oppure con Ziehl-Neelsen.

L'identificazione di specie era affidata alla tecnica PCR, usando due enzimi di restrizione (*Bst*EII e *Hae*III).

Acqua

Ichiyama *e Coll*. (1988) centrifugano 2 litri d'acqua a 1000 g per 10 minuti e risospendono il residuo in 10 ml di soluzione al 2% di NaOH.

Dopo 10 minuti centrifugano nuovamente come sopra e risospendono infine il sedimento in 5 ml di soluzione 0,067 M di KH_2PO_4.

Segue la semina su *slant* di terreno di Ogawa antibiotato (vedi per l'esame del suolo).

Questi Autori hanno integrato la ricerca colturale con una prova biologica su topo, inoculando *i.p*. gli animali con 0,5 ml del campione decontaminato come sopra.

Dopo 14 giorni dagli organi dei topi sacrificati veniva ripetuta la coltura su terreno di Ogawa antibiotato, previo trattamento dell'omogenato di milza, fegato, polmone con NaOH al 4%.

La tecnica seguita da Fischeder *e Coll*. (1991) prevede invece il trattamento del campione con cetilpiridinio cloruro allo 0, 005% per 30 minuti e la filtrazione su tre membrane Millipore da 0,45 mmicron.

Le stesse membrane, lavate con 300 ml di soluzione fisiologica sterile per rimuovere i residui del decontaminante, vengono poi adagiate su piastre di Middlebrook 7H10 Agar, da incubare per 8 settimane a 20, 30, 37 °C.

Le colonie sviluppate vengono trapiantate su *slant* di terreno di Löwenstein-Jensen e identificate biochimicamente.

Una tecnica analoga è stata descritta da Covert *e Coll*. (1999). Essi aggiungono al campio-

ne, al momento del prelievo, sodio tiosolfato (0,1 mg/litro) e prima dell'analisi trattano per 30 minuti l'acqua con cetilpiridinio cloruro (0,04%).

Segue la filtrazione su membrana con porosità 0,45 mmicron, un lavaggio della membrana con tampone e semina della stessa su Middlebrook 7H10 Agar in piastra, da incubare a 37 °C con il 10% di CO_2 per 8 settimane.

September *e Coll*. (2004) per la ricerca dei micobatteri nell'acqua potabile della rete idrica hanno fatto prelievi dalla superficie interna dei rubinetti con tamponi di cotone inumiditi in soluzione di Ringer ¼ concentrata, su un'area di circa 1 cm^2 ed hanno seminato quindi piastre di Middlebrook 7H10 Agar.

I campioni d'acqua venivano invece trattati con sodio tiosolfato (concentrazione finale 0,01%) per neutralizzare il cloro e quindi con cetilpiridinio cloruro (concentrazione finale 0,005%) per eliminare la flora concorrenziale.

Dopo 30 minuti a 25 °C, 100 mcl venivano seminati su piastre dello stesso terreno.

Ricerca di batteri alcool-acido resistenti nelle acque col metodo della filtrazione del campione previamente decontaminato e semina della membrana su terreni selettivi in piastra

Suolo

Ichiyama *e Coll*. (1988) hanno usato la seguente tecnica:

5 grammi di polvere, sospesi in 25 ml di acqua distillata, sono stati messi in agitatore (60 cicli/min) per 30 minuti e poi lasciati riposare per 10 minuti.

A 10 ml di soprastante venivano aggiunti 10 ml di soluzione acquosa al 4% di NaOH. Dopo agitazione per 10 minuti, il campione veniva centrifugato a 1000 g per 10 minuti e il sedimento risospeso in 5 ml di soluzione 0,067 M di KH_2PO_4

Il terreno poi seminato era Ogawa (a base d'uovo) addizionato di ofloxacina (1 mcg/ml) ed etambutolo (2,5 mcg/ml), incubato a +37 °C per 10 settimane.

Vegetali

Taber *e Coll*. (1991) hanno usato la seguente tecnica: sezioni sottili, con superficie di 2 mm^2 , formate da tessuti presi da piante, sono stati immersi in alcool a 70°, addizionato con clorex al 10%, e quindi lavate in acqua distillata, prima della semina su piastre di Middlebrook 7-H-10 Agar, un terreno destinato ad incubazione a +37 °C per 4 settimane.

ESAME COLTURALE

Terreni colturali più usati (formule riportate in Appendice)

I primi terreni erano ovviamente destinati all'isolamento del *M. tuberculosis.* Oggi rivestono, con qualche eccezione, quasi esclusivamente un interesse storico, anche se possono continuare ad essere usati per coltivare i batteri alcool-acido resistenti, tra cui gli atipici.

Si ricordano:

- Siero di sangue bovino coagulato al calore (Koch nel 1882 ottenne con questo terreno la prima coltura del bacillo tubercolare)
- Patata glicerinata e Brodo glicerinato (introdotti da Nocard e Roux nel 1887)
- terreno di Proskauer e Beck (1894) contenente carbonato d'ammonio (fonte di azoto) e glicerina (fonte di carbonio)
- terreno solido di Dorset (1902) formato da estratto di carne, peptone e uova
- terreno liquido di Sauton (1912) composto da asparagina, acido citrico, fosfato bi potassico, solfato di magnesio, citrato di ferro ammoniacale e glicerina. I micobatteri vi crescono formando un velo, come nel Brodo glicerinato
- terreno di Petroff (1918), formato da carne di vitello, glicerina, uova e violetto di genziana
- terreno di Kirchner (1929), studiato per *M. tuberculosis* (ma è valido per tutti i micobatteri). È un brodo che si avvale delle proprietà nutritive apportate da peptone, asparagina, glicerolo e siero di vitello e nel quale i micobatteri crescono non solo in superficie.

Questi substrati in seguito perderanno importanza perché sostituiti da altri più pratici (possibilità di vedere le colonie) e selettivi. Lowenstein-Jensen (1931) e Petragnani (1932), richiamandosi a Dorset, avevano intuito che coagulando a 80-85 °C un'emulsione contenente uova intere, acqua, sali minerali ed un colorante anilinico ad azione selettiva (verde malachite) si otteneva un mezzo di crescita ottimale per i bacilli tubercolari.

Più tardi altri Autori ripresero l'uso dei terreni liquidi, semi-sintetici o sintetici, caratterizzati da una formula più complessa, da affiancare a quelli solidi per aumentare le possibilità d'isolamento. Tra questi si citano:

Youmans *e Coll*. (1946) preparano un terreno semi-sintetico contenente il 10% di siero bovino sterile.

Dubos (1946) rimpiazza il siero bovino con la frazione V dell'albumina bovina e introduce il Tween 80, un estere idrosolubile dell'acido oleico che abbassa la tensione superficiale, rendendo i bacilli idrofili, quindi idonei a crescere in una fase dispersa ed omogenea.

Middlebrook e Cohen (1958), che hanno formulato alcuni terreni contenenti sali minerali, acido oleico, glicerolo, glucosio, albumina (per legare gli oleati e altri composti tossici), biotina e catalasi (favorenti la rivitalizzazione dei batteri stressati).

I più noti sono il brodo 7H9 e l'Agar 7H10. Entrambi possono diventare selettivi con l'aggiunta di verde malachite a bassa concentrazione (25 mg/100ml) e antibiotici (cicloeximide, lincomicina, acido nalidixico).

Mitchison ha reso più selettiva la formula di Middlebrook proponendo il terreno 7H11, che contiene anche idrolisato di caseina (per favorire i ceppi isoniazide-resistenti) e differenti antibiotici (carbenicillina, anfotericina B, polimixina B, trimethoprim).

Lo stesso Autore ha modificato il terreno di Kirchner con l'aggiunta del medesimo supplemento antibiotico (PACT).

Nel 1960 Coletsos propone tre tipi di terreni basati sull'uovo arricchito con oligoelementi, piruvato, glutammato, osseina.

Diversi Autori hanno poi formulato dei terreni con caratteristiche particolari per la ricerca del *M. paratuberculosis*. Questi substrati artificiali possono essere divisi in due gruppi (Belletti e Zavanella, 1987):

– *terreni a base di Agar-siero*, tra cui Dubos-Davis, Glover, Hart, Stuart, Dorset-Henley, Dubos, Watson-Reid, Middlebrook 7H10
– *terreni con tuorlo d'uovo*, tra cui Löwenstein-Jensen, Finlayson, Herrold, Taylor, Nemoro.

Il supplemento Mycobactin

M. paratuberculosis non cresce sui normali terreni per micobatteri, non essendo in grado di utilizzare autonomamente il ferro necessario al suo metabolismo.
Twort e Ingram (1913) isolarono per primi questo microrganismo aggiungendo al terreno una coltura di *M. tuberculosis* uccisa col calore.
Successivamente si è visto che il fattore responsabile della crescita era un composto liposolubile situato nella parete cellulare dei micobatteri, capace di trasportare lo ione ferrico all'interno delle cellule batteriche. Qui viene ridotto a ione ferroso mediante una ferro-mycobactin-ossido reduttasi.
A differenza degli altri micobatteri, *M. paratuberculosis* e alcuni ceppi di *M. avium* non producono Mycobactin.
Per ottenere questa sostanza (chiamata Mycobactin P) è stato impiegato inizialmente il *M. phlei*, apatogeno e di rapido sviluppo.
Più recentemente è stato usato un ceppo "anomalo" di *M. paratuberculosis*, che non richiede questo ingrediente per crescere e che fabbrica in maggior quantità un tipo di Mycobactin, chiamato J, maggiormente efficace.
Il piruvato di sodio accelera la crescita di *M. paratuberculosis* (Merkal, 1982).
L'aggiunta ai terreni del supplemento mycobactin può favorire la crescita di altre specie. Tra queste, è provato il successo nell'isolamento di *M. genavense* (Coyle *e Coll.*, 1992).

Primo isolamento

L'esame colturale può essere effettuato su qualsiasi campione biologico.

Gli attuali *standard* internazionali prevedono l'uso di due terreni, un terreno solido associato ad un terreno liquido, in quanto non esiste il terreno ideale che consente l'isolamento di tutti i micobatteri.

Fra i terreni solidi i più utilizzati sono ancora i terreni all'uovo, quali, ad esempio, Lowenstein-Jensen e IUTM.

Dopo l'inoculo questi terreni vengono abitualmente incubati a +35/37 °C per 8 settimane e ispezionati una volta alla settimana.

I campioni provenienti da cute e sottocute vanno incubati anche a +30 °C.

I terreni liquidi, pur noti da molto tempo, sono stati presi in considerazione solo in tempi relativamente recenti, perché considerati di scarsa utilità pratica per l'altissima percentuale di contaminazione e l'assenza di metodi di rilevazione della crescita.

Il terreno liquido è invece di fondamentale importanza, perché più sensibile e veloce rispetto al terreno solido ed anche perché alcuni micobatteri vi crescono meglio (*M. avium* complex) o esclusivamente (*M. genavense*). Il più usato è il brodo Middlebrook 7H9, variamente modificato nella composizione.

Si seminano abitualmente con 0,2 ml del materiale previamente trattato tre provette per tipo di terreno, affiancando un solido (ad esempio, Lowenstein-Jensen, Petragnani, IUTM, Middlebrook 7H10, Stonebrinks, EYA, ecc.) ad un liquido (Middlebrook 7H9, Dubos, Kirchner, ecc).

Senza dubbio i terreni solidi sono più selettivi, mentre quelli liquidi sono più fertili, permettendo il recupero anche dei germi stressati.

È consigliabile nella prima settimana d'incubazione mantenere le provette di terreno solido inclinate per favorire il contatto fra batteri e superficie di coltura.

Per effettuare la ricerca nel modo più accurato, parecchi Autori consigliano di incubare le colture a tre differenti temperature: ambiente (+25°C), +37 °C (in termostato preferibilmente con il 5 -10% di CO_2) e in termostato a +45°C per periodi non inferiori a sei mesi.

La lettura settimanale delle provette, in caso di sospetto sviluppo, va completata da un controllo microscopico (Beam *e Coll*., 1968).

Il tempo di sviluppo delle colture, in relazione alle differenti temperature d'incubazione, può fornire alcune indicazioni utili per un'identificazione presuntiva:

Tabella 17 – Tempi di crescita in laboratorio di alcuni micobatteri atipici rappresentativi

Tempo di crescita		25°	37°	45°	Sospetto	Prove indicative
< 1 settimana	Rapida crescita	+	+	+	*M. fortuitum*	Arilsulfatasi Crescita su MacConkey
2 o più settimane	Lenta crescita	-	+	-	*M. tuberculosis, M. bovis*	
		-	+	+	*M. xenopi M. avium*	
		+ scarsa	+	-	*M. kansasii*	
		+	+ scarsa	-	*M. marinum*	
		+ scarsa	-	-	*M. ulcerans*	Crescita a +32°C in >3 settimane

Su terreni solidi l'aspetto delle colonie può variare da liscio (S) a ruvido (R) con forme intermedie (SR, RS).

La forma delle colonie può essere rotondeggiante (eugonica) o irregolare (disgonica), talvolta con estensioni filamentose rizoidi, come si desume dalla tabella di Henry (1996).

La crescita su terreno solido può, in qualche caso, avere fluorescenza spontanea. Caroli *e Coll.* (1966) riferiscono di ceppi fluorescenti coltivati su Patata glicerinata e osservati al buio in luce di Wood (366 nm). Tra quelli esaminati, mostravano fluorescenza *M. smegmatis*, *aquae*, *avium*, *thamnopheos*, mentre era negativo *M. phlei* (oltre a *M. tuberculosis*).

Tabella 18 - Morfologia delle colonie di alcuni bacilli alcool-acido resistenti isolati nei laboratori clinici (da Henry, 1996)

Specie	Morfologia delle colonie	Pigmentazione delle colonie	Velocità di crescita (in settimane)	Note
avium complex	Liscia, piccola, sottile, trasparente o grossa, opaca, tondeggiante, ruvida	Nessuna	4-6	Eventuale leggera pigmentazione con incubazione prolungata
scrofulaceum	Liscia, globosa	Scotocromogeno	4-6	Pigmento da giallo chiaro ad arancio scuro
kansasii	Ruvida	Fotocromogeno	4-6	Rari ceppi sono non foto cromogeni o scoto cromogeni
fortuitum e chelonae	Liscia o ruvida	Non fotocromogeno	<1	
xenopi	Liscia con prolungamenti filamentosi a nido d'uccello	Scotocromogeno	4-6	Cresce a 42 °C
szulgai	Liscia o ruvida	Scotocromogeno a 37 °C, fotocromogeno a 25 °C	4-6	
malmoense	Liscia	Incolore	2-3	
simiae	Liscia	Fotocromogeno dopo lunga esposizione alla luce	4-6	
marinum	Rugosa, lucente o liscia, semisferica. Raramente ruvida e secca	Fotocromogeno	2-3	Crescita ottimale a 30 °C
haemophilum	Ruvida o liscia	Non fotocromogeno	4-6	Crescita ottimale a 20 °C
gordonae	Liscia	Scotocromogeno	4-6	
terrae e triviale	Liscia (*terrae*); ruvida (*triviale*)	Non fotocromogeno	4-6	
flavescens	Liscia	Scotocromogeno	2-3	
smegmatis	Ruvida o liscia	Non fotocromogeno	<1	Eventuale colore giallastro

In terreno liquido solitamente i bacilli crescono con un velo abbondante, sottile, finemente corrugato, mentre in profondità danno luogo a formazioni globose, lasciando limpida la zona intermedia.

Nota

Ha un certo influsso sulla velocità di crescita anche la natura del materiale seminato. Ad esempio, le colture da broncoaspirato, soprattutto se realizzate su terreno solido, sembrano esigere tempi più lunghi d'incubazione, a causa di un probabile indovamento dei micobatteri nel parenchima polmonare (Zavanella, 1965).

Prove di pigmentazione

Le modalità di esecuzione di queste prove sono descritte alla fine della Prima Parte (Capitolo III, Esperienze degli anni '60).

Differenti aspetti della crescita su terreno Löwenstein-Jensen di alcune specie di micobatteri atipici dopo un mese d'incubazione a + 30 °C.
Da sinistra verso destra: M. avium, M. fortuitum, M. kansasii, M. gordonae, M. marinum

Tabella 19 - Morfologia delle colonie nelle principali specie di micobatteri

Specie	Tempo di crescita (gg)	Produzione pigmento		Morfologia colonie	
		Luce	Buio	Middlebrook 7H10 agar	Löwenstein - Jensen
M.africanum	10 – 21	Incolore	Incolore	Piatta, rugosa, opaca	Piatta, rugosa, opaca
M. agri	2 – 5	Incolore	Incolore	Rugosa	Rugosa
M. asiaticum	15 – 21	Giallo	Incolore/Crema	Colonie disgoniche; il pigmento può occasionalmente non comparie	Colonie disgoniche; il pigmento può occasionalmente non comparie
M. avium complex	10 – 21	Crema/giallo	Crema/giallo	Sottile, trasparente, opaca o translucida, liscia, circolare; talvolta rugosa e filamentosa	Sottile, trasparente, liscia; talvolta convessa, rugosa e filamentosa; margini rilevati
M. bovis	25 – 90	Incolore/crema	Incolore/crema	Piccola, sottile, spesso non pigmentata, leggermente convessa, rugosa e quindi secca e filamentosa	Rugosa, secca, friabile; centro in rilievo con margine sottile e ondulato; talvolta piatta e diffusa
M. chelonae	3 – 7	Crema	Crema	Rotonda, liscia, opaca, margine intero o lobato, assenza di filamenti; talvolta rugosa e filamentosa	Rotonda, liscia, opaca, margine intero o lobato, assenza di filamenti; talvolta rugosa e filamentosa
M.chitae	3 – 5	Incolore/crema	Incolore/crema	Liscia, umida	Liscia, umida
M. fallax	12 - 21	Incolore	Incolore	Rugosa, eugonica; simile a colonie *M. tuberculosis*	Rugosa, eugonica; simile a colonie *M. tuberculosis*
M. farcinogenes	15 – 30	Giallo	Giallo	Superficie rugosa e con circonvoluzioni, fortemente aderente al terreno, alone iridescente	Superficie rugosa e con circonvoluzioni, fortemente aderente al terreno, alone iridescente
M. flavescens	7 – 10	Giallo/arancio	Giallo/arancio	Liscia , butirrosa	Liscia, butirrosa
M. fortuitum	3 – 7	Crema	Crema	Liscia, convessa (cupola), eventualmente butirrosa o cerosa, multilobata, con agglomerati a rosetta; anche rugosa, opaca, cerosa con margine filamentoso	Liscia, convessa (cupola), eventualmente butirrosa o cerosa, multilobata, con agglomerati a rosetta; anche rugosa, opaca, cerosa con margine filamentoso. Può assumere colorazione verdastra per assorbimento del colorante.
M. gastri	10 – 21	Incolore/crema	Incolore/crema	Rotonda, liscia, convessa, translucida; spesso simile a colonia di *M. avium complex*	Rotonda, liscia, convessa, translucida; spesso simile a colonia di *M. avium* complex
M. gordonae	10 – 25	Giallo/arancio	Giallo/arancio	Rotonda, liscia, convessa, translucida	Rotonda, liscia, convessa, translucida
M. haemophilum	14 – 28	Incolore	Incolore	Rotonda, liscia o rugosa (crescita solo in presenza di emoglobina)	Rotonda, liscia o rugosa (crescita solo in presenza di emoglobina)
M. kansasii	10 – 21	Giallo	Crema	Rilevata, liscia; talvolta rugosa e filamentosa; cristalli carotenoidi visibili dopo esposizione alla luce	Rilevata, liscia; talvolta rugosa e filamentosa; cristalli carotenoidi visibili dopo esposizione alla luce
M. malmoense	7 – 10	Incolore	Incolore	Rotonda, liscia	Rotonda, liscia

Specie	**Tempo di crescita (gg)**	**Produzione pigmento**		**Morfologia colonie**	
		Luce	**Buio**	**Middlebrook 7H10 agar**	**Löwenstein - Jensen**
M. marinum	5 – 14	Giallo	Crema	Rotonda, liscia; talvolta filamentosa	Rotonda, liscia; talvolta filamentosa
M. nonchromogenicum	7 – 21	Crema	Crema	Rotonda, liscia o rugosa, convessa, translucida	Rotonda, liscia o rugosa, convessa, translucida
M. parafortuitum	3 – 5	Giallo pallido	Incolore	Liscia, umida; pigmentazione più marcata dopo esposizione alla luce artificiale	Liscia, umida; pigmentazione più marcata dopo esposizione alla luce artificiale
M. phlei	2 – 5	Giallo scuro Arancio	Giallo scuro Arancio	Rugosa, pieghettata	Rugosa, pieghettata
M. porcinum	2 – 4	Incolore	Incolore	Liscia o rugosa	Liscia o rugosa
M. scrofulaceum	10 – 14	Giallo	Giallo	Liscia, rotonda, umida	Liscia, rotonda, umida
M. senegalense	1 – 2	Incolore/ocra	Incolore/ocra	Superficie rugosa e con circonvoluzioni, fortemente aderente al terreno, alone iridescente	Superficie rugosa e con circonvoluzioni, fortemente aderente al terreno, alone iridescente
M. simiae	7 –14	Giallo	Crema	Liscia, convessa (cupola), leggermente pigmentata	Liscia, convessa (cupola), leggermente pigmentata
M. smegmatis	3 – 7	Crema/corallo	Crema/corallo	Convessa, rugosa, filamentosa, margini lobati. Talvolta: liscia, traslucida, butirrosa	Convessa, rugosa, filamentosa, margini lobati. Talvolta: liscia, traslucida, butirrosa
M. szulgai	14 – 28	Giallo/arancio	Crema (25 °C) Giallo (37 °C)	Liscia o rugosa, margini talvolta irregolari	Liscia o rugosa, margini talvolta irregolari
M. terrae	10 – 21	Crema	Crema	Rotonda, liscia o rugosa, convessa, translucida	Rotonda, liscia o rugosa, convessa, translucida
M. triviale	7 – 14	Crema	Crema	Rotonda, liscia o rugosa, convessa, translucida	Rotonda, liscia o rugosa, convessa, translucida
M. tuberculosis	12 – 28	Crema	Crema	Piatta, rugosa, diffusa; margini irregolari	Rugosa, secca, friabile; centro in rilievo con margine sottile e ondulato; talvolta piatta e diffusa
M. ulcerans	10 – 28	Incolore/giallo	Incolore/giallo	Liscia, piccola, convessa (cupola), trasparente; con l'invecchiamento: da convessa a piatta, rugosa, pigmentata, margine irregolare	Liscia, piccola, convessa (cupola), trasparente; con l'invecchiamento: da convessa a piatta, rugosa, pigmentata, margine irregolare
M. vaccae	2 – 5	Giallo/arancio	Incolore	Liscia, convessa (cupola), umida, lucente, butirrosa; incremento della pigmentazione dopo breve (alcuni minuti) di esposizione alla luce artificiale	Liscia, convessa (cupola), umida, lucente, butirrosa; incremento della pigmentazione dopo breve (alcuni minuti) di esposizione alla luce artificiale
M. xenopi	28 – 42	Giallo (talvolta incolore)	Giallo (talvolta incolore)	Piccola, convessa (cupola), liscia o rugosa, centro compatto con bordo di filamenti ramificati; a 45 °C a nido. Diviene aderente al terreno con crescita a bottone	Piccola, convessa (cupola), liscia o rugosa, centro compatto con bordo di filamenti ramificati; a 45 °C: a nido. Diviene aderente al terreno con crescita a bottone

Prove indirette di virulenza dei ceppi

Sono descritte alla fine della Prima Parte (Capitolo III, Esperienze degli anni ’60).

ISOLAMENTO CON SISTEMI AUTOMATIZZATI O SEMI-AUTOMATICI

Nei più importanti centri di micobatteriologia vengono utilizzati sistemi di coltura automatizzati che utilizzano terreni liquidi (in genere variazioni del brodo Middlebrook 7H9) e che rilevano lo sviluppo batterico in base a variazioni di determinati parametri metabolici che avvengono all’interno del flacone seminato col campione.

Si tratta di sistemi in grado di rilevare variazioni di pressione (ESP culture), produzione di CO_2 (MB Bact T) o consumo di ossigeno (MGIT, Bactec MB).

Le variazioni del parametro in esame all’interno del flacone vengono monitorate ad intervalli regolari dallo strumento automatico, incubatore-lettore, che quindi segnala l’avvenuta positivizzazione sulla base di speciali algoritmi preimpostati.

Questi sistemi consentono di accorciare i tempi d’esame e di ottenere una sensibilità più elevata rispetto ai terreni solidi.

Tra più affermati sistemi in brodo si trovano, oltre a quelli già citati, BACTEC TB e Septi-Check AFB (Becton-Dickinson).

Nel terreno 7H12A di BACTEC TB e 12 B (Johnston Laboratories, Sparks, MD, USA) si trova acido palmitico marcato con ^{14}C. La formazione di $^{14}CO_2$, misurata dallo strumento, fa sospettare la presenza di micobatteri, per cui dal brodo si allestisce uno striscio e una sub-coltura.

I vantaggi del metodo stanno nella maggior rapidità di risposta rispetto alla coltura (14 giorni contro 21) e nella possibilità di eseguire le prove di sensibilità ai farmaci in 5 -7 giorni.

Il Septi-Check è bifasico, avendo un terreno solido e uno liquido a contatto.

Il sistema MGIT è un brodo 7H9 con un indicatore fluorescente, per cui le provette vanno esaminate in luce di Wood a 365 nm.

PROVA BIOLOGICA (Gastinel, 1957; Mariani, 1964)

I *test* di patogenicità sugli animali possono essere tenuti in considerazione quando si sospettano pochi bacilli nel materiale da esaminare oppure quando l’eccessivo inquinamento del campione non è ritenuto controllabile attraverso il procedimento di decontaminazione.

Un caso particolare è fornito da *M. paratuberculosis*, in quanto sarebbe possibile l’isolamento del germe attraverso inoculazione del materiale patologico nell’hamster (Larsen *e Coll*., 1979).

In generale, le prove biologiche attualmente vegono meno praticate, sia per il costo della manutenzione degli animali da esperimento, sia per una maggior sensibilità verso l’impiego di cavie, sostituite con prove *in vitro*.

Ciò vale sia nella fase di isolamento che in quella di identificazione, come di seguito descritto.

Inoculazione diretta del campione negli animali da esperimento e inoculazione negli animali da esperimento di un ceppo già isolato in coltura

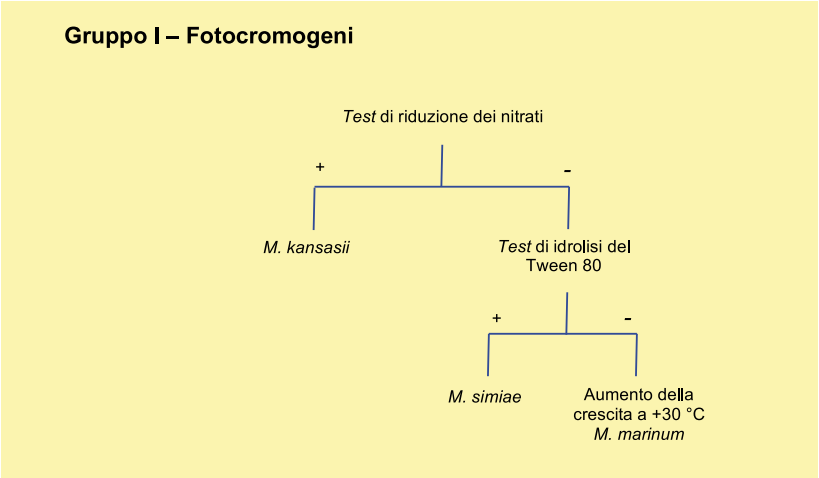
La tecnica è descritta alla fine della Prima Parte (Capitolo III, Esperienze degli anni ’60).

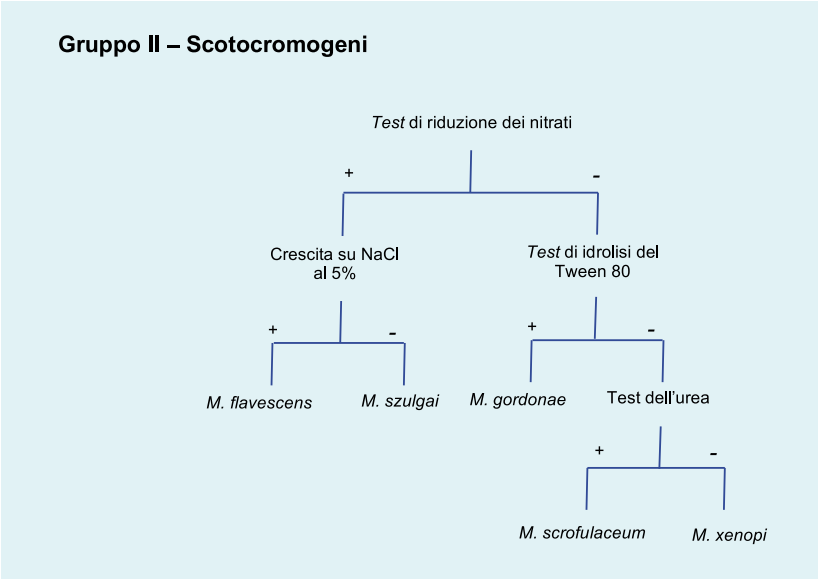
La semina dei terreni colturali solidi e liquidi, partendo da estratti previamente decontaminati dei visceri di cavie e topi, è raccomandata anche nel caso di lesioni di modesta entità che farebbero presumere un risultato negativo della prova biologica (Zavanella, 1965).

CAPITOLO V
Prove di identificazione di specie

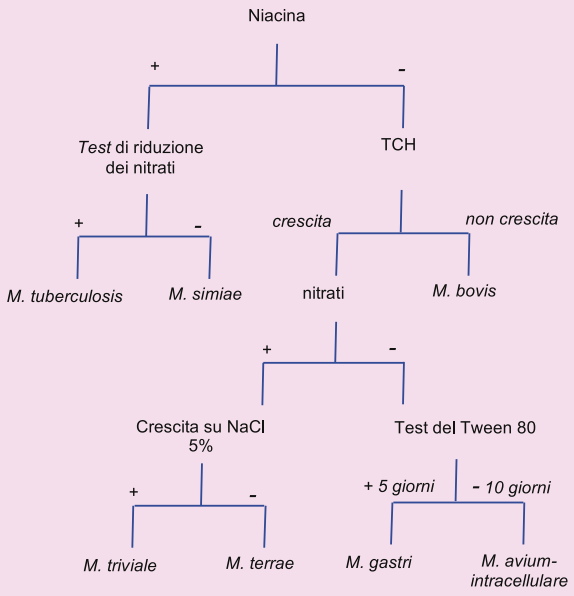
IDENTIFICAZIONE ATTRAVERSO PROVE BIOCHIMICHE

Schemi semplificati per l'identificazione dei più frequenti patogeni potenziali fra i micobatteri dei quattro gruppi di Runyon sono stati messi a punto. Tra essi si riporta quello pubblicato da Henry (1996) sotto forma di algoritmi:

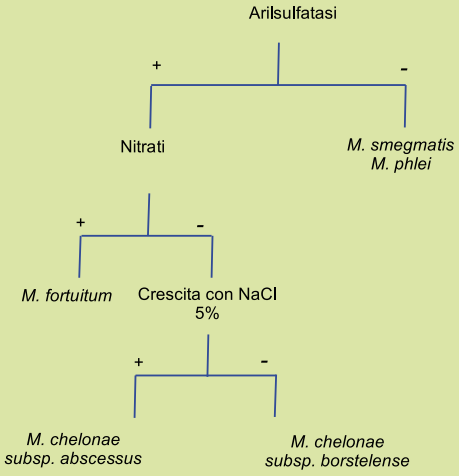




Gruppo III – Non fotocromogeni



Gruppo IV – A rapida crescita



Si tratta di una serie di prove biochimiche che, assieme alla velocità di crescita nelle colture e ai caratteri di pigmentazione, sono impiegate per differenziare le singole specie.

Generalmente non è necessario eseguire tutte le prove biochimiche elencate, ma soltanto alcune, a seconda del sospetto di essere in presenza di qualcuna fra le specie (La Placa, 1985). Ad esempio, può essere sufficiente la seguente scelta:

Caratteri colturali dopo incubazione a: temperatura ambiente (+25°), +37 °C, +42 °C

Prove biochimiche:
Ureasi Nitrati Tellurito Niacina Arilsulfatasi Pirazinamidasi Crescita in presenza di T2H

Nel caso di ricerca dei micobatteri nei pesci può valere il seguente schema semplificato:

Tabella 20 - Comportamento colturale e biochimico delle specie di *Mycobacterium* patogene per i pesci

	M. abscessus* *M. chelonae	***"M. chesapeaki"***	***M. fortuitum***	***M. marinum***	***M. shottsii***
Optimum temperatura	28 °C	28 °C	28 °C	30 °C	23 °C
Velocità di crescita	Rapida	Lenta	Rapida	Lenta	Lenta
Morfologia colonie	Liscia o rugosa	Liscia	Rugosa o liscia	Liscia o parzialmente rugosa	Rugosa; talvolta liscia
Fotoreattività	Non cromogeno	Non cromogeno	Non cromogeno	Fotocromogeno	Non cromogeno
Niacina accumulo	- (raro +)	-	-	-	+
Nitrati riduzione	-	-	+	-	-
Catalasi termostabile	+	-	+	+	d
Tween idrolisi	d	-	- (raro +)	+	-
Tellurito riduzione	+	-	+	- (raro +)	+
NaCl 5% tolleranza	d	-	+	-	-
Arilsulfatasi	+	-	+	d	-
Ureasi	+	+	+	+	+
Pirazinamidasi	+	+	+	d	- (7 gg) + (14-21 gg)

* *Mycobacterium chelonae* non cresce su agar MacConkey incubato a 37 °C, non sviluppa in presenza di NaCl 5% a 35 °C, ma assimila il citrato. Risultati opposti per *Mycobacterium abscessus*.

Lennette *e Coll*. (1974) descrivono i seguenti *test* biochimici:

	Nome abbreviato del *test*
1	Niacina
2	Catalasi
3	Crescita in tioglicolato
4	Crescita con vitamina PP
5	Fosfatasi
6	Lisozima
7	Crescita su MacConkey Agar
8	Arilsulfatasi
9	Riduzione nitrati
10	Riduzione tellurito
11	Tolleranza NaCl
12	Idrolisi Tween 80
13	Ureasi
14	Crescita con T2H
15	Pirazinamidasi
16	Richiesta di ferro

1. *Test* della niacina (Konno, 1956)

La reazione si basa sulla comparsa di una colorazione gialla, quando un composto piridinico, la niacina (prodotta dal germe in forte quantità ed accumulata nel terreno di crescita) reagisce con bromuro di cianogeno (Br-CN) e un'ammina primaria o secondaria.
Questa prova, come è noto, permette di distinguere la varietà umana dei micobatteri tubercolari (positiva) dal *M. bovis* (negativo).
I bacilli atipici danno quasi sempre reazione negativa (eccezionalmente positivi possono risultare *M.simiae* e *M. chelonae*) perché evidentemente nel loro metabolismo non formano, o formano in quantità insufficiente, la niacina (Runyon *e Coll*., 1959).

Una o due gocce dell'acqua di condensazione di un tubo di coltura vengono posti in una vaschetta di porcellana bianca contenente due gocce dei reagenti: anilina al 4% in alcool etilico 95% e bromuro di cianogeno Br-CN in soluzione acquosa al 10%.

Dopo 5 minuti, in caso positivo, compare una colorazione gialla.

→ Il composto bromuro di cianogeno è altamente pericoloso per emissione di vapori tossici e quindi va trattato sotto cappa chimica.

Prova biochimica della formazione di niacina in un test rapido - La sospensione del ceppo da esaminare, allestita a partire da una coltura su terreno solido, permette alla niacina estratta in soluzione fisiologica di reagire con le sostanze adsorbite su striscia di carta. Dopo 15 minuti a temperatura ambiente, si possono osservare i risultati seguenti:
– a sinistra, sviluppo di colore giallo (= esito positivo da M. tuberculosis);
– a destra, nessuna variazione di colore (= esito negativo da ceppo atipico).

2. *Test* della catalasi a temperatura ambiente e a +68 °C
(Schweiger *e Coll*., 1958; Kubica *e Coll*., 1960; Andrejew, 1962 e 1964)

Consiste nell'evidenziare la produzione di catalasi, enzima che scinde H_2O_2 in H_2O e O_2 da parte di una coltura di micobatteri,
L'attività catalasica è in funzione non soltanto del tipo di micobatterio, ma anche della temperatura alla quale la reazione viene eseguita (temperatura ambiente o +68 °C).
A temperatura ambiente tutti i ceppi di micobatteri alcool-acido resistenti, eccetto il micobatterio tubercolare umano isoniazide-resistente, producono catalasi.
A temperatura di +68 °C e pH 7.0, i bacilli tubercolari di tipo umano, il, bacillo bovino e il ceppo umano isoniazide-resistente danno negativa la prova della catalasi, indipendentemente dalla loro virulenza, mentre i micobatteri atipici (o anonimi) ed i saprofiti producono catalasi (Kubica *e Coll*., 1960).

Nota

Secondo Andrejew (1964), l'attività catalasica si distingue in funzione del pH e indipendentemente dall'età della coltura. Da un lato si osserva un'attività molto sensibile ai pH acidi e alcalini (micobatteri umani e bovini), dall'altro a un'attività meno sensibile soprattutto ai pH alcalini (atipici fotocromogeni, ad esempio *M. kansasii*).
Questo fatto potrebbe essere in rapporto con l'insensibilità degli atipici verso gli inibitori provvisti di funzione basica, come l'idrossilammina, l'idrazina, la D-cicloserina e l'INH.
L'attività catalasica dei micobatteri umani classici si caratterizza inoltre per una forte attivazione da temperatura e per una debole termo stabilità. Nei foto cromogeni, al contrario, c'è debole attivazione e forte termostabilità.

Sempre secondo Andrejew (1962), i micobatteri scotocromogeni e quelli a rapida crescita hanno un comportamento variabile e intermedio fra quello dei micobatteri umani classici e dei foto cromogeni. Questi ultimi hanno un'attività catalasica molto forte.

Sulla superficie della patina colturale in provetta con terreno solido si versano alcune gocce di acqua ossigenata al 3%. La reazione positiva è caratterizzata dalla comparsa immediata di numerose bollicine che si formano in seguito alla liberazione di ossigeno.

3. *Test* di crescita in brodo tioglicolato
(Tarshis *e Coll.*, 1952 e 1959)

Il *test* è basato sulla crescita eventuale dei micobatteri in terreno al tioglicolato, la cui formula è riportata in Appendice.
I ceppi virulenti non crescono neppure dopo 4 settimane d'incubazione. Molti ceppi di micobatteri atipici (o anonimi) crescono dopo 2-4 settimane d'incubazione, presentando uno sviluppo lento e di tipo disgonico. I micobatteri saprofiti crescono rapidamente, dopo un giorno o due, con formazione di una pellicola superficiale. Questa prova è anche indice di virulenza (Kubica *e Coll.*, 1967).

Il brodo tioglicolato viene seminato con un'ansata di coltura sviluppata su terreno di Dubos o su IUTM e incubato per 8 settimane a +37 °C, controllando lo sviluppo giornalmente durante la prima settimana e in seguito a congrui intervalli di tempo.

4. *Test* di crescita in terreno con vitamina PP

La rapidità di sviluppo dei micobatteri in questo terreno non è uniforme. Infatti i micobatteri anonimi sviluppano regolarmente a partire dalla prima settimana d'incubazione, mentre i micobatteri umani tipici vengono inizialmente inibiti e il loro sviluppo comincia a manifestarsi solo dopo due settimane.

Per l'esecuzione della prova si allestisce una serie di tubi di coltura con terreno IUTM, incorporandovi vitamina PP nella concentrazione di 5000 gamma.
Dopo la semina, le provette vengono incubate in termostato a +37 °C per 30 giorni.

5. *Test* dell'attività fosfatasica

Serve per differenziare i micobatteri umani tipici da quelli atipici, anche se tale attività è prerogativa di tutti i micobatteri tubercolari.
Esistono tuttavia fra i singoli gruppi, delle differenze quantitative e precisamente:
a) i ceppi umani tipici mostrano un'attività fosfatasica scarsa, che si manifesta tardivamente all'atto della reazione, ma che persiste a lungo;
b) i ceppi atipici danno invece una reazione immediata che si esaurisce rapidamente.

Il *test* si basa sulla produzione di un enzima, la fosfatasi, che agisce su un estere fosforico di fenolftaleina incorporato nel terreno di crescita.
Dopo aggiunta di ammoniaca (NH_3), attorno alle colonie con attività fosfatasica si manifesta immediatamente un alone rosso che dura poche decine di minuti.
Per l'esecuzione della prova vale la tecnica seguente.

a) preparazione dell'estere fosforico di fenolftaleina:

In un matraccio asciutto da 800 ml si sciolgono grammi 4,43 di fenolftaleina in 50 ml di piridina.

Si aggiungono ml 2,5 di ossicloruro di fosforo ($POCl_3$), agitando fortemente perché la reazione è esotermica (quindi va eseguita sotto cappa).

Si aggiunge acqua distillata, prima poche gocce, poi fino a 1/3 del matraccio.

Si aggiungono inoltre alcune gocce di rosso fenolo e 9,5 ml di NaOH al 40% (fino a colorazione rosa), alcool 95° fino al 50% del volume della soluzione, grammi 7,5 di acetato di Ca e di Ba, sciolti in poca acqua, alcool 95° fino a riempire il matraccio.

Si lascia riposare una notte in frigorifero, si centrifuga a 3000 rpm per 30 minuti per raccogliere completamente il sedimento, che viene lavato con alcool assoluto e fatto essiccare in termostato, quindi ridotto a fine polvere.

b) preparazione del terreno per la prova

Si incorpora nel terreno IUTM l'estere, posto in soluzione acquosa al 10%, nella proporzione del 4%, Il terreno viene poi fatto coagulare a 85 °C per due ore.

Si preferisce usare delle piastre di Petri di vetro, che vengono poi sigillate sul bordo con paraffina.

c) semina del ceppo

I ceppi vengono seminati con l'ansa nella maniera tradizionale, in modo da ottenere possibilmente colonie staccate. L'incubazione avviene in termostato a +37 °C per due settimane.

d) reazione

Si introduce nella piastra un batuffolo di cotone bagnato con ammoniaca. Lo sviluppo di colore rosso indica attività fosfatasica.

6. *Test* di resistenza al lisozima

La prova della lisi batterica con lisozima cloruro è stata suggerita dalla constatazione che i micobatteri tubercolari umani tipici sono molto sensibili all'azione del lisozima, mentre i micobatteri atipici appaiono progressivamente più resistenti andando dal tipo I al tipo IV di Runyon.
Questo fenomeno potrebbe trovare spiegazione nel fatto che si va incontro ad un biochimismo di tipo saprofitario, dove una diversa costituzione lipidica della membrana favorirebbe l'insensibilità all'azione litica del lisozima cloruro.
Il *test* si realizza cimentando diluizioni progressive di lisozima con quantità costanti di microrganismi per tempi progressivamente crescenti.

Si preparano diluizioni di lisozima cloruro in soluzione fisiologica sterile in modo da ottenere concentrazioni di 0,1 – 0,3 – 0,5 gamma per ml.

La sospensione di microrganismi da saggiare è portata alla concentrazione di un miliardo di germi per ml, facendo riferimento al torbidimetro di McFarland.

I tempi di contatto sono compresi fra 30 minuti e 4 ore a +37 °C.

Trascorso il periodo di contatto fra germe e lisozima, si procede all'evidenziazione dei corpi microbici rimasti integri mediante striscio e colorazioni di Gram e di Ziehl-Neelsen.

7. *Test* di crescita su MacConkey Agar

Serve per distinguere *M. phlei*, che sviluppa bene entro 5 giorni su questo terreno, mentre *M. fortuitum* e pochi altri micobatteri atipici non crescono o danno scarse colonie alla fine dello striscio, se questo è abbondante (Jones e *Coll*., *1964*).

La semina avviene per striscio con l'ansa a partire da una coltura incubata 7-10 giorni su brodo di Middlebrook o su Tween Albumin Broth. Da parte di alcuni Autori si raccomanda una formula del terreno MacConkey Agar priva di cristalvioletto (cv).

8. *Test* dell' arilsulfatasi

Distingue i micobatteri a rapida crescita. Con poche eccezioni, solo i ceppi di *M. fortuitum* e *M. chelonae* attaccano il solfato di fenolftaleina tripotassico, liberando fenolftaleina con l'intervento dell'enzima arilsulfatasi (Kubica *e Coll*., 1961).

Reagenti

1 - ml 1 di glicerolo e 65 mg di disolfato tripotassico di fenolftaleina sciolti in 100 ml di Dubos Oleic Agar Base. Distribuire in provette da centrifuga a 2 ml, sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti e far solidificare in posizione verticale.

2 – Sodio carbonato 1M (10,6 g in acqua distillata portando a 100 ml).

Test – Inoculare le provette con una goccia di sospensione batterica. Incubare a +37 °C per 3 giorni e fino a 14 giorni.

Aggiungere 1 ml di soluzione di sodio carbonato. La reazione positiva è data dallo sviluppo di colore rosa.

Controlli: positivo = *M. fortuitum*; negativo = *M. tuberculosis*

9. *Test* di riduzione dei nitrati

Le specie positive sono (oltre a *M. tuberculosis*): *M. kansasii, szulgai, fortuitum* e alcuni saprofiti del III gruppo di Runyon.
Le specie negative (oltre a *M. bovis*), sono: *M. marinum, simiae, avium* complex*, xenopi, gastri, chelonae* (Virtanen, 1960).

Reagenti

1 – HCl concentrato diluito 1:2
2 – Sulfanilamide soluzione acquosa 0,2%
3 – N-naftil-etilen-diamina diidrocloridrato soluzione acquosa 0,1%
4 – Nitrate Broth (Difco)

Test – Mettere alcune gocce di acqua distillata sterile in una provetta ed emulsionare alcune ansate di patina batterica.

Aggiungere 2 ml di Nitrate Broth. Omogeneizzare ed incubare in bagnomaria a +37 °C per 2 ore.

Aggiungere una goccia di reagente 1, due gocce di reagente 2 e due gocce di reagente 3.

La reazione positiva è data dalla comparsa di colore rosa-rosso immediato. Alle provette che risultano negative si può aggiungere un'ansata di polvere di zinco, che farà virare al rosso in caso di *test* negativo (per la presenza di nitrati non ridotti).

10. *Test* di riduzione del tellurito

La reazione è tipica dei micobatteri a rapida crescita e di *M. avium* complex, che reagiscono nel tempo di 3 giorni, provocando la riduzione dei sali di tellurito (incolori) a tellurio metallico (nero) (Kilburn *e Coll*., 1969).

Reagenti - Soluzione acquosa 0,2% di potassio tellurito (0,1 g in 50 ml di acqua distillata) da distribuire a 5 ml in provette e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 10 minuti. Le provette sono da usare entro 24 ore.

Test – Aggiungere 2 gocce di soluzione di potassio tellurito ad una coltura fatta sviluppare per una settimana in 5 ml di brodo Middlebrook 7H9. Incubare nuovamente in termostato per 3 giorni ed osservare la formazione di un precipitato nero.

11. *Test* di tolleranza al cloruro di sodio

Alcune specie sono caratterizzate dalla capacità di crescere in presenza del 5% di NaCl. I micobatteri a lenta crescita non crescono, tranne *M. triviale.* I micobatteri a rapida crescita crescono, tranne *M. chelonae* (Krasnow *e Coll.,* 1969).

Si prepara una sospensione densa del ceppo in esame e si seminano 0,1 ml su Löwenstein-Jensen + 5% NaCl. L'incubazione avviene a +37 °C per 4 settimane, interpretando come positivo il *test* se si vede una crescita.

12. *Test* di idrolisi del Tween 80

I micobatteri appartenenti ai gruppi II e III di Runyon idrolizzano in genere, mediante un enzima, il Tween 80 (derivato poliossietilenico del sorbitan monooleato), formando acido oleico che fa virare l'indicatore al rosso.
Sono tipicamente negativi al *test* i micobatteri *avium*, *xenopi*, *scrofulaceum*. Sono invece positivi *M. gordonae* e *M. fortuitum* (Wayne *e Coll*., 1960).
La prova è utile soprattutto per differenziare i micobatteri di scarsa o nulla importanza clinica (positivi alla reazione) tra i micobatteri dei gruppi II e III di Runyon.

Reagenti - A 100 ml di tampone fosfato 0,067 M pH 7 aggiungere 0,5 ml di Tween 80 e 2 ml di soluzione di rosso neutro (preparata sciogliendo 0,1 g di colorante in 85 ml di acqua distillata).

Distribuire in provette a 4 ml ed autoclavare a 121 °C per 15 minuti. Conservare in frigorifero per non più di due settimane.

Test - Inoculare con l'ansa il ceppo da saggiare ed incubare a +37 °C per 10 giorni.

Il *test* è positivo se si osserva, entro 5 giorni, un viraggio da giallo a rosa.

13. *Test* dell'ureasi

L'abilità a idrolizzare l'urea con produzione di ammoniaca varia notevolmente da specie a specie. Sono generalmente urea-positivi i micobatteri *scrofulaceum* e *bovis*, negativi *avium* e *intracellulare* (Toda *e Coll*., 1960; Krasnow *e Coll.,* 1969).

Reagenti - Il terreno di prova viene preparato diluendo una parte di Urea Agar Base con nove parti di acqua distillata sterile.

La miscela, distribuita in provette a 4 ml. da conservare in frigorifero, va eliminata dopo 3 giorni.

Test - Il ceppo in esame viene seminato con l'ansa in una provetta, da incubare a +37 °C per 3 giorni. Il risultato è positivo quando si osserva un viraggio del terreno da rosa a rosso.

14. *Test* di crescita in presenza di idrazide dell'acido tiofen-2-carbossilico (T2H)

Questo *test* serve soprattutto nell'identificazione di *M. bovis*, che non cresce neppure a basse concentrazioni, a differenza degli altri micobatteri, resistenti all'azione del T2H (Bönicke, 1958).

Si prepara una sospensione densa del ceppo da saggiare, che viene poi diluita 1:1000 in acqua distillata sterile.

Tre gocce costituiscono la semina in Dubos Oleic Acid Agar con Albumin complex, al quale sono stati aggiunti 10 mcg/ml di T2H.

Il terreno viene incubato, assieme ai controlli, a +37 °C per 3 settimane.

15. *Test* della pirazinamidasi

Il composto pirazinamide viene deaminato ad acido pirazinoico in 4 giorni dai ceppi di *M. marinum* (positivo), a differenza di *M. kansasii* (negativo).
Questo *test* risulta positivo anche per *M. avium* e M. *tuberculosis*, mentre è negativo per *M. bovis*.

Reagenti – Terreno solido di Dubos contenente pirazinamide 0,01% *(formula riportata nei Terreni e reagenti).*

Test – Si inocula abbondantemente con l'ansa il terreno solido di Dubos+pirazinamide, partendo da una coltura ben sviluppata di 2-3 settimane.

Dopo incubazione per 4 giorni a +37 °C si aggiunge alla provetta 1 ml di soluzione acquosa di solfato d'ammonio all'1%.

Si pone per altre 4 ore in frigorifero prima di leggere la prova. Il risultato positivo è dato dalla comparsa di una banda rosa sulla superficie dell'agar.

Controlli: positivo = *M. avium*; negativo = provetta non seminata.

16. *Test* di richiesta di ferro

La proprietà di assumere ferro inorganico dal terreno differenzia *M. fortuitum* e *M. phlei* (positivi) da *M. chelonae* (negativo) (Runyon *e Coll.*, 1980).

Reagenti
1 - Terreno di Löwenstein-Jensen
2 - Soluzione acquosa di citrato di ferro ammoniacale (ferrico) al 20%

Test – Inoculare la provetta con un'ansata del ceppo in esame. Incubare in termostato a +37 °C fino a crescita appena percettibile.

Aggiungere 2-3 gocce di soluzione ferrica ed incubare per un massimo di 21 giorni. Il risultato positivo è dato dalla formazione di colonie color marrone-ruggine.

Controlli: positivo = *M. fortuitum*; negativo = *M. chelonae*

Limitatamente alle più importanti specie a lenta crescita, il comportamento prevalente verso una scelta di prove colturali e biochimiche è riassunto nei seguenti schemi:

specie	Caratteristiche colturali							Crescita su:		
	Velocità crescita	*Optimum* temperatura	Crescita a 25 °C	Crescita a 42 °C	Crescita a 45 °C	Colonie su M7H10	Pigmento	T2H	NaCl 5%	MacConkey senza cv
M. africanum	L	37	-	-	-	Rg	N	-	-	-
"M. avium complex"	L	37	±	+	±	Sm,I	N	+	-	x
M. avium	L	37	x	+	-		N	+	-	
M. intracellulare	L	37	+	±	±		N	+	-	
M. bovis	L	37	-	-	-	Rg	N	-	-	-
M. gastri	L	30	+	-	-	Sm,Rg	N	+	-	x
M. haemophilum	L	30	+	-	-	Rg,Sm	N	+	-	-
M. malmoense	L	37	+	-	-	Sm,I	N	+	-	-
M. microti	L	37	-	-	-		N	-	-	
"M. terrae complex"	L	37	+	-	-	Sm,Rg	N	+	x	-
M. nonchromogenicum	L	37	+	x	-	Sm,Rg	N	+	-	-
M. terrae	L	37	+	-	-	Sm,Rg	N	+	-	-
M. triviale	L	37	+	-	-	Rg	N	+	+	-
M. shimoidei	L	37	-		x	Rg	N	+	-	-
M. tuberculosis	L	37	-	-	-	Rg	N	+	-	-
M. xenopi	L	42	-	+	+	Sm,D	N,SC	+	-	-

Legenda:
- Velocità di crescita: R (rapida: non superiore a 7 giorni); I (intermedia: 8 - 14 giorni); L (lenta: oltre 14 giorni)
- Colonie su M7H10: Rg (rugose); Sm (lisce); D (a cupola); S (sciamanti); I (miscela di D e di S)
- Fotoreattività (pigmento): N (non cromogeno); P (fotocromogeno); SC (scotocromogeno)
- Caratteristiche colturali e biochimiche (percentuale di ceppi positivi): - (inferiore al 10%); x (tra 10% e 50%); +/- (tra 50% e 90%); + (oltre 90%)
- cv = cristalvioletto

specie	Caratteristiche biochimiche									
	Ureasi	Tellurito (3 gg)	Nitrati	Niacina	Arilsulfatasi (3 gg)	Arilsulfatasi (14 gg)	Pirazin amidasi	Tween id. (10 gg)	Catalasi 68 °C	Fe citrato
M. africanum	+	-	x	x	-	-	x	-	-	-
"M. avium complex"	-	±	-	-	-	±	+	-	±	-
M. avium	-	+	-	-	-		+	-	±	
M. intracellulare	-	+	-	-	-		+	-	+	
M. bovis	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M. gastri	±	±	-	-	-	+	±	+	-	-
M. haemophilum	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
M. malmoense	±	±	-	-	-	-	±	+	x	-
M. microti	+		±	+			+		-	
"M. terrae complex"	-	x	±	-	x	±	x	+	+	-
M. nonchromogenicum	-	-	-	-	-		+	+	+	-
M. terrae	-	-	±	-	-		-	+	+	-
M. triviale	x	x	+	-	±	+	-	+	+	-
M. shimoidei	-	±	-	-	-	-	+	+	+	-
M. tuberculosis	+	-	+	+	-	-	+	±	-	-
M. xenopi	-	-	-	-	±	+	±	-	±	-

Legenda:
- Velocità di crescita: R (rapida: non superiore a 7 giorni); I (intermedia: 8 - 14 giorni); L (lenta: oltre 14 giorni)
- Colonie su M7H10: Rg (rugose); Sm (lisce); D (a cupola); S (sciamanti); I (miscela di D e di S)
- Fotoreattività (pigmento): N (non cromogeno); P (fotocromogeno); SC (scotocromogeno)
- Caratteristiche colturali e biochimiche (percentuale di ceppi positivi): - (inferiore al 10%); x (tra 10% e 50%); +/- (tra 50% e 90%); + (oltre 90%)
- cv = cristalvioletto

Specie	Caratteristiche colturali						
	Velocità crescita	***Optimum* temperatura**	**Crescita a 25 °C**	**Crescita a 42 °C**	**Crescita a 45 °C**	**Colonie su M7H10**	**Pigmento**
M. flavescens	I	37	+		±	Rg,Sm	SC
M. gordonae	L	37	+		-	Sm,I	SC
M. scrofulaceum	L	37	+	+	-	Sm,I	SC
M. szulgai	L	37	+	-	-	Sm,I	SC(37), P(24)
M. xenopi	L	42	-	+	+	Sm,D	N,SC

Specie	Caratteristiche biochimiche						
	Ureasi	**Tellurito (3 gg)**	**Nitrati**	**Niacina**	**Arilsulfatasi (3 gg)**	**Arilsulfatasi (14 gg)**	**Pirazinamidasi**
M. flavescens	+	x	+	-	x	+	+
M. gordonae	x	x	-	-	-	+	±
M. scrofulaceum	±	-	-	-	-	-	+
M. szulgai	±	±	+	-	-	-	+
M. xenopi	-	-	-	-	±	+	±

Legenda:
- Velocità di crescita: R (rapida: non superiore a 7 giorni); I (intermedia: 8 - 14 giorni); L (lenta: oltre 14 giorni)
- Colonie su M7H10: Rg (rugose); Sm (lisce); D (a cupola); S (sciamanti); I (miscela di D e di S)
- Fotoreattività (pigmento): N (non cromogeno); P (fotocromogeno); SC (scotocromogeno)
- Caratteristiche colturali e biochimiche (percentuale di ceppi positivi): - (inferiore al 10%); x (tra 10% e 50%); +/- (tra 50% e 90%); + (oltre 90%)

Specie	Caratteristiche colturali						
	Velocità di crescita	***Optimum* temperatura**	**Crescita a 25 °C**	**Crescita a 42 °C**	**Crescita a 45 °C**	**Colonie su M7H10**	**Pigmento**
M. asiaticum	L	37	+		-	Sm,I	P
M. kansasii	L	37	+	x	-	Sm,Rg	P
M. marinum	I	30	+	-	-	Sm,S	P
M. simiae	L	37	+	-	-	Sm,I	P
M. szulgai	L	37	+	-	-	Sm,I	SC(37), P(24)

Specie	Caratteristiche biochimiche											Crescita su:	
	Ureasi	**Tellurito (3 gg)**	**Nitrati**	**Niacina**	**Arilsul fatasi (3 gg)**	**Arilsul fatasi (14 gg)**	**Pirazin amidasi**	**Tween id. (10 gg)**	**Catalasi 68 °C**	**Fe citrato**	**T2H**	**NaCl 5%**	**Mac Conkey senza cv**
M. asiaticum	-	x	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	±
M. kansasii	+	x	+	-	-	+	±	+	+	-	+	-	-
M. marinum	+	x	-	x	x	+	+	+	+	-	+	x	-
M. simiae	+	±	-	±	-	-	±	-	+	-	+	-	±
M. szulgai	±	±	+	-	-	-	+	±	+	-	+	-	-

Legenda:
- Velocità di crescita: R (rapida: non superiore a 7 giorni); I (intermedia: 8 - 14 giorni); L (lenta: oltre 14 giorni)
- Colonie su M7H10: Rg (rugose); Sm (lisce); D (a cupola); S (sciamanti); I (miscela di D e di S)
- Fotoreattività (pigmento): N (non cromogeno); P (fotocromogeno); SC (scotocromogeno)
- Caratteristiche colturali e biochimiche (percentuale di ceppi positivi): - (inferiore al 10%); x (tra 10% e 50%); +/- (tra 50% e 90%); + (oltre 90%)

Specie	Caratteristiche colturali						
	Velocità di crescita	***Optimum* temperatura**	**Crescita a 25 °C**	**Crescita a 42 °C**	**Crescita a 45 °C**	**Colonie su M7H10**	**Pigmento**
M. agri	R	28	+		+		N
M. chitae	R	28			-		N
M. fallax	R	28	+		±	Rg,Sm	N
M. porcinum	R	28	+	+	-	Rg	N
M. pulveris							N
M. smegmatis	R	28	+		+	Sm,Rg	N,SC

Specie	Caratteristiche biochimiche						
	Ureasi	**Tellurito (3 gg)**	**Nitrati**	**Niacina**	**Aril sulfatasi (3 gg)**	**Aril sulfatasi (14 gg)**	**Pirazin amidasi**
M. agri			+		x		
M. chitae			+		-		
M. fallax	-	±	+	-	-	-	
M. porcinum	+	+	-	-	+		+
M. pulveris							
M. smegmatis	+	+	+	-	-	+	

Legenda:
- Velocità di crescita: R (rapida: non superiore a 7 giorni); I (intermedia: 8 - 14 giorni); L (lenta: oltre 14 giorni)
- Colonie su M7H10: Rg (rugose); Sm (lisce); D (a cupola); S (sciamanti); I (miscela di D e di S)
- Fotoreattività (pigmento): N (non cromogeno); P (fotocromogeno); SC (scotocromogeno)
- Caratteristiche colturali e biochimiche (percentuale di ceppi positivi): - (inferiore al 10%); x (tra 10% e 50%); +/- (tra 50% e 90%); + (oltre 90%)

IDENTIFICAZIONE ATTRAVERSO METODI ALTERNATIVI

L'utilizzo dei *test* biochimico-colturali per l'identificazione dei vari micobatteri è stato notevolmente ridimensionato, perché l'elevato numero di specie da riconoscere richiederebbe un notevole numero di prove e un allungamento dei tempi di lavoro.

Pertanto hanno preso piede altri metodi.

Tecniche cromatografiche

Nella parete dei micobatteri sono presenti acidi grassi a catena lunga, chiamati acidi micolici, e il corredo di questi acidi varia da specie a specie o da complesso a complesso.

Questi acidi, una volta estratti, possono essere separati mediante varie tecniche cromatografiche.

I tracciati che si ottengono con la separazione possono quindi essere confrontati con tracciati noti di riferimento.

Molto spesso si ottengono dei tracciati specie-specifici, che consentono una corretta identificazione; in altri casi si ottengono tracciati gruppo-specifici, che comunque rappresentano un elemento aggiuntivo da valutare assieme ad altri criteri di identificazione.

La cromatografia gas-liquida, l'HPLC e la cromatografia su strato sottile consentono in 2-4 ore di riconoscere colonie di piccole dimensioni cresciute su terreno solido.

BIOLOGIA MOLECOLARE

DNA probes

Attualmente i metodi di identificazione più utilizzati sono i DNA *probes*, che consentono di ottenere in poche ore un'identificazione precisa e accurata dei micobatteri di più comune isolamento.

Questi sistemi di identificazione sono impiegabili a partire da microrganismi cresciuti su terreno liquido o solido.

Si adoperano a scopo identificativo sonde di DNA a singola catena, avente una sequenza complementare a sequenze specie-specifiche presenti nel genoma del micobatterio.

Se la sonda riconosce una sequenza complementare nel microrganismo avviene l'ibridazione, rilevabile visivamente con varie tecniche.

Sonde chemiluminescenti di DNA permettono l'identificazione di alcune specie (*avium, intracellulare, gordonae, kansasii*) in 1-2 ore se messe a contatto con una sufficiente concentrazione di cellule batteriche in terreno solido o liquido (Reisner,1994).

Il limite principale dei DNA *probes* risiede nel numero limitato (alcune decine) di sonde disponibili.

Sequenziamento genico

Questo metodo, molto complesso, consente l'identificazione di tutti i micobatteri isolati. La regione genica più frequentemente sequenziata a scopi identificativi è quella del gene codificante per rRNA 16S (rDNA) ed in particolare di una porzione informativa di 500 bp (*base pairs*: coppie di basi) contenente due regioni ipervariabili.

Altre sequenze altamente conservate si trovano nel gene hsp 65, nella regione spaziatrice fra i geni rRNA 16S-23 S e nel gene rpoB.

L'identificazione del microrganismo in esame avviene confrontando la sequenza ottenuta con sequenze presenti in vari *database* (GenBank, EMBL, DDBJ, ecc).

Una volta inserita la sequenza da identificare, il *database* fornisce un elenco dei microrga-

nismi in ordine decrescente di somiglianza con il ceppo in esame.

L'esperienza del microbiologo gioca comunque un ruolo determinante nella risoluzione delle discordanze e nella valutazione del loro peso.

Tra le procedure ricordiamo quella descritta da Cloud *e Coll.* (2002) che riporta l'applicazione di un *kit* commerciale per l'amplificazione e la sequenziazione della porzione informativa di 500 bp del gene rDNA 16S a partire da ceppi isolati micobatterici con alcune modifiche sulla base dell'esperienza del laboratorio di analisi genomiche presso l'IZSLER.

In dettaglio:

– Estrazione DNA

L'estrazione del DNA avviene a partire da una o più colonie batteriche stemperate in 200 µl di soluzione di lisi. La sospensione batterica viene inattivata mediante trattamento a 95°C per 10 min e centrifugata in microcentrifuga per 2-3 min. Il surnatante viene poi trasferito in microprovetta e diluito 1/50 in acqua bidistillata sterile.

– Reazione PCR

Viene allestita la reazione aggiungendo 15 µl di mix di Mastermix del *kit* commerciale contenente una miscela di *primers* specifici per il gene rDNA 16S, dNTP, Taq Polimerasi e tampone di reazione a 15 µl del campione di DNA estratto.

I campioni vengono sottoposti ad amplificazione in un apparato PCR utilizzando il seguente programma:

1 ciclo iniziale a 95°C per 10 min;

30 cicli da 30 sec a 95°C, 30 sec a 60°C, 45 sec a 72°C;

1 ciclo finale a 72°C per 10 min.

Il prodotto amplificato viene rilevato mediante elettroforesi in gel d'agarosio al 2%.

– Reazione di sequenza del prodotto PCR

A partire dal prodotto PCR per ogni campione vengono eseguite due reazioni: una reazione con il *primer* Dir (Forward) ed una con il *primer* Rev (Reverse) secondo il metodo descritto da Sanger *e Coll.* (1977) utilizzando la chimica dei dideossiterminatori (ddNTP) marcati con fluorescenza. Nelle due provette vengono aggiunti 13 µl di Forward Sequencing Mix o 13 µl di Reverse Sequencing Mix contenenti una miscela di *primer* Dir o Rev, dNTP, ddNTP ciascuno marcato con un diverso fluorocromo, Taq Polimerasi e tampone di reazione.

L'analisi dei prodotti della reazione di sequenza è condotta mediante elettroforesi capillare su sequenziatore automatico utilizzando un polimero sintetico (POP6), applicando 15 V per circa 2 ore.

– Lettura ed interpretazione degli elettroferogrammi

I dati grezzi dei profili elettroforetici ottenuti dalle reazioni Dir e Rev di ciascun ceppo sono analizzati automaticamente da un *software* di analisi che verifica la presenza di elettroferogrammi di buona qualità ed assembla i dati di sequenza ottenuti con entrambe le reazioni. La sequenza finale così ottenuta viene confrontata con le sequenze di una Banca Dati commerciale contenente sequenze di riferimento validate.

Tecniche relativamente nuove (amplificazione enzimatica isotermica dell' rRNA bersaglio, Q-beta replicasi, ligasi a catena) hanno dimostrato grande specificità nell'identificare il gruppo dei tubercolari anche da un esame diretto del campione, ma un livello di sensibilità non sempre all'altezza dei metodi convenzionali (Miller *e Coll.*, 1994).

Nakhjavani *e Coll*. (2006) hanno sperimentato, per la dimostrazione diretta dei micobatteri (e in particolare di *M. avium*) in campioni prelevati dal tratto respiratorio, la seguente tecnica PCR (rpoB-PCR):

estrazione del DNA - 250 mcl del campione, portati al volume finale di 1 ml con EDTA pH 7.6 contenente 10 mg di lisozima, vengono incubati a +37 °C per un'ora.
Alla sospensione vengono aggiunti 30 mcl di soluzione formata da proteinasi K (14 mg/ml) e SDS (3%).
Segue un periodo d'incubazione a +56 °C per 2-3 ore e a +37 °C per una notte.
Al termine si inattiva la proteinasi K mettendo il campione per 15 minuti a +95 °C.

PCR - Viene allestita una miscela di reagenti formata da: DNA estratto, due *primers* specifici (20 pmol ciascuno), 0.5 ml di soluzione per PCR (1 U di Taq DNA polimerasi, 250 mM di dNTP, 50 mM di Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM di MgCl).
La miscela è sottoposta a 30 cicli di amplificazione (30 secondi a 95°, 30 secondi a 60°, 45 secondi a 72°), seguiti da 5 minuti di estensione a 72 °C.
Il prodotto amplificato della reazione viene rivelato mediante elettroforesi su gel di agarosio 1,5% con bromuro di etidio.

Tra i metodi commerciali, basati sugli acidi nucleici e presenti oggi nei laboratori si ricordano i seguenti:

- il *test* dell'RNA ribosomiale predisposto da Gen-Probe (San Diego, California, USA) identifica correttamente, oltre a *M. tuberculosis*, il complesso *avium-intracellulare*, *kansasii* e *gordonae*.

I *probes* sono marcati con un estere d'acridinio e l'ibridazione viene rivelata dalla produzione di chemiluminescenza misurabile con un luminometro. Gli altri micobatteri atipici danno risultato negativo al *test* (Daniel, 1990);

- il sistema SNAP (Syngene Inc., San Diego, CA, USA), oltre al *kit* per *M. tuberculosis* complex, possiede una variante adatta per *M. avium* complex.

Le colture lisate vengono introdotte in contenitori con una membrana di nailon e l'ibridazione con *probes* marcati con un enzima è visualizzata colorimetricamente (Davis, 1992);

- il *kit* LiPA Mycobacteria (InnoGenetics, Temse, Belgio) permette di combinare le fasi di ricerca e di identificazione dei micobatteri.

Il metodo si basa sull' ibridazione inversa di un frammento biotilinato del micobatterio con dei *probes* oligonucleotidici fissati su membrana.

La visualizzazione del DNA legato avviene grazie ad un coniugato streptavidina-fosfatasi alcalina e una sostanza cromogena.

Il tempo necessario per la reazione è di circa 6 ore. Le specie riconoscibili sono, oltre al complex t*uberculosis*, i micobatteri *kansasii, xenopi, gordonae, avium, intracellulare, scrofulaceum, chelonae* (Truant, 2002).

Il *kit* denominato GeneType® Mycobacterium, nelle due versioni CM e AS che Lee *e Coll*. (2009) hanno provato, in parallelo con HPLC e con la sequenziazione del gene 16S rRNA.

Si tratta di un nuovo *test*, prodotto da Hain Lifescience, che identifica, rispettivamente, i micobatteri tubercolari classici e 15 altre specie ritenute patogene. Si basa sull'amplificazione del DNA, in particolare della regione del gene 23S rRNA, seguita da ibridazione inversa mediante specifici *probes* immobilizzati su strisce.

La prova inizia da colture su terreno solido. Un'ansata di patina batterica, sospesa in 1 ml di acqua distillata, viene sottoposta a due trattamenti di estrazione del DNA (sonicazione e

riscaldamento a 100 °C per 15 minuti), seguiti da centrifugazione a 13400 g per 2 minuti. Il soprastante viene messo a contatto con i reagenti fissati alle *strip* che formano il *kit*.

Un secondo *kit*, Gene Type® Mycobacteria Direct, è stato predisposto per ricercare direttamente in campioni decontaminati di materiale polmonare ed extrapolmonare (compreso il sangue) cinque specie di micobatteri: *avium*, *intracellulare*, *kansasii*, *malmoense*, *tuberculosis* complex.

Il *test* avviene in tre fasi: isolamento dell'RNA dal materiale attraverso cattura con sfere magnetiche, amplificazione della sequenza degli acidi nucleici (reazione NASBA) e ibridazione inversa.

Metodi radiometrici

Da un perfezionamento del BACTEC® è nato il sistema BACTEC TB NAP, che entro 4-5 giorni dall'isolamento permette di distinguere i tubercolari dagli altri micobatteri mediante il paranitro-alfa-acatalamino-beta-idrossipropiofenone (NAP).

Questa sostanza inibisce il rilascio di $^{14}CO_2$ nel terreno di prova, composto che solamente *M. tuberculosis* è in grado di produrre.

IDENTIFICAZIONE ATTRAVERSO PROVE IMMUNOLOGICHE *IN VITRO*

1. Test da applicare a colture già isolate

Agglutinazione rapida

Per mezzo di un siero specifico preparato su coniglio e adsorbito si possono differenziare mediante agglutinazione alcuni ceppi fra i 17 sierotipi (28 secondo Koppers *e Coll*., 1991) del gruppo *M. avium*-complex (Schaefer, 1968):

- *M. avium* "*sensu stricto*", conferma i sierotipi I e II
- *M. avium* intermedio, conferma i sierotipi da III a VI e i ceppi Boone, Yandle, Arnold, Altmann, Daden.

La trecnica dell'agglutinazione è stata messa a punto da Schaefer (1965), poi ripresa da Neumann (1988) e da Koppers (1990).

Agglutinazione lenta

La tecnica più seguita per riconoscere i vari sierotipi è quella di Schaefer, nata nel 1965 per tipizzare i ceppi di *M. avium*, ma adattabile ai micobatteri in generale.

Thoen *e Coll*. (1975) hanno introdotto alcune modifiche, sostituendo le provette con le piastre *microtiter.*

Preparazione dell'antigene

La coltura da tipizzare viene seminata in 8 ml di Brodo di Dubos con albumina. Dopo 5 giorni di incubazione a +37 °C, 0.1 ml vengono trapiantati in 8 ml di Brodo Middlebrook 7H9, contenente il complesso albumina-acido oleico di Dubos e Tween 80, da incubare per altri 5 giorni a +37 °C entro una bottiglia Falcon da 30 ml per coltura di tessuti, tenuta orizzontale.

Questa coltura, trasferita in provetta, viene centrifugata a 1641 rpm per 15 minuti e il sedimento raccolto in 5 ml di Brodo Middlebrook 7H9.

Dopo sterilizzazione in autoclave a 121 °C per 12 minuti, l'antigene va diluito fino ad una densità ottica (O.D.) 0.46 misurata a 525 nm con spettrofotometro.

Preparazione dei sieri agglutinanti

Richards *e Coll*. (1972) spiegano la preparazione dei sieri diagnostici su conigli New Zealand, ai quali l'antigene viene inoculato 8 volte in vena a 1.5 ml entro un periodo di 4 settimane.

L'antigene si prepara sospendendo una coltura del ceppo di referenza di un dato micobatterio in PBS, fino alla densità ottica (O.D.) 0.4 letta a 525 nm.

Dopo 6 giorni dall'ultima inoculazione, i conigli vengono salassati (previa anestesia totale) e il sangue fatto sierare. Ogni siero è conservabile a -20 °C, addizionato di 8-idrossichinolina solfato 1:10.000 come antibatterico.

Il titolo d'uso del siero viene calcolato attraverso agglutinazione lenta col metodo di Thoen *e Coll*. e corrisponde alla più alta diluizione che provoca un'agglutinazione completa dell'antigene omologo a 18 ore su una serie di diluizioni al raddoppio del siero in PBS da 1:2 a 1:640. Normalmente il titolo dei sieri varia tra 1:20 e 1:160.

Agglutinazione in piastra

L'antigene viene distribuito a 80 mcl nei pozzetti a fondo piatto di una piastra *microtiter* da 96 pozzetti, nei quali si introducono poi a 80 mcl i vari antisieri.

Come controllo negativo si mettono 80 mcl di Brodo di Middlebrook 7H9 e 80 mcl di antigene.

La piastra va agitata per 45 secondi su un agitatore, coperta e incubata in termostato a +37 °C. Si fanno due letture, a 3 e 6 ore, usando uno stereomicroscopio a 7 ingrandimenti.

La sorgente luminosa del microscopio rende più facile l'osservazione se inclinata a 45°. La reazione positiva è data dalla formazione (*clumping*) di larghi aggregati di batteri.

Lisotipia

La lisotipia per mezzo di fagi specifici è stata adoperata prevalentemente a scopo di ricerca piuttosto che per attività diagnostica nel riconoscimento di *M. tuberculosis, M. bovis* e *M. kansasii*, ma i risultati non sono stati molto incoraggianti (Joubert *e Coll*., 1975).

2. *Test* indiretti destinati alla ricerca di fattori d'immunità nel siero (ELISA, AGID, FDC, *biomarker* serici, *test* IGRA)

Elisa

Considerato che la coltura del materiale infetto può richiedere fino a 8 settimane e che la successiva identificazione biochimica comporta ulteriori 6 settimane, alcuni Ricercatori hanno tentato nuove vie.

Tra questi meritano di essere ricordati Corner *e Coll*. (1988), che hanno pubblicato un semplice e rapido *test* su vetrino, inizialmente limitato in veterinaria al riconoscimento di *M. bovis*.

Il metodo sfrutta anticorpi monoclonali e parte da una coltura su terreno solido, dalla quale si ricava una sospensione batterica di torbidità pari al tubo 3 di McFarland (0,7 ml di soluzione 1% di $BaCl_2$ in 9,3 ml di soluzione 1% di H_2SO_4).

50 mcl, stesi su un vetrino portaoggetti su un'area di circa 1 cm di diametro, vengono fissati con una delle tre seguenti modalità: riscaldamento su piastra a 60-70 °C per 2 ore; immersione in alcool etilico 70° per 30 minuti, quindi alcool 95°; immersione in formalina 10% per 30 minuti.

Gli strisci, coperti con 100 mcl di anticorpi monoclonali verso la specie ricercata ottenuti da coniglio per immunizzazione (Agen Biochemical Ltd., Acacia Ridge, Australia), diluiti 1/300 in soluzione al 4% di latte magro vengono incubati in camera umida a temperatura ambiente per 90 minuti.

I vetrini, lavati due volte con PBS, vengono poi coperti con il secondo anticorpo (anti-coniglio, diluito 1/50 in soluzione al 4% di latte magro) lasciato agire per 90 minuti a temperatura ambiente.

Un secondo lavaggio precede l'aggiunta del substrato, lasciato sul vetrino per 10 minuti e quindi lavato via con PBS.

Tra vari substrati provati, negli esperimenti di Corner *e Coll*. dava buoni risultati quello preparato mescolando 1 ml di 4-cloro-1-naftolo (sciolto a 50 mg/ml di metanolo) e 6 ml di acqua ossigenata 0,1 M entro 194 ml di Tris-HCl Buffer (10 mM pH 7,2).

La reazione positiva si manifesta con viraggio al blu dello striscio sul vetrino.

Numerosi prodotti destinati ai laboratori di umana sono stati commercializzati in alcuni paesi per sveltire i tempi di analisi nella diagnosi di tubercolosi extra-polmonare.

Se la praticità di questi *test* in ELISA è indiscutibile, non altrettanto favorevole sembra essere la loro efficienza.

Difatti, secondo Steingart *e Coll*. (2007), si manifesterebbe fra i vari *kit* una notevole differenza di sensibilità e di specificità. Inoltre, nelle prove comparative fatte da questi Autori canadesi, non sempre i *test* si sono dimostrati validi proprio dove maggiore sarebbe l'esigenza, cioè per svelare anticorpi IgA, IgM, IgG nel siero di bambini e di ammalati di AIDS.

Agar-gel immunodiffusione (AGID)

Sherman *e Coll*. (1984) hanno adottato la seguente tecnica per ricercare gli anticorpi in campioni di siero bovino: il terreno di prova viene preparato sciogliendo Agarose allo 0,75% in soluzione salina (NaCl 8,5%) tamponata con tris-(idrossimetil)-aminometano 0,01 M. e sodio azide 0,02% (antibatterico con funzioni di conservante).

La sospensione viene riscaldata in bagnomaria bollente fino a scioglimento dell'Agarose e conservata in frigorifero in aliquote da 25 ml.

Al momento dell'uso il terreno viene fatto sciogliere per ebollizione in bagnomaria e distribuito in piastre di Petri in modo da formare uno strato spesso 5 mm.

Dopo completa solidificazione, nel terreno vengono ricavati 6 pozzetti, diametro 4 mm, disposti ad esagono, di cui uno centrale e 5 periferici. La distanza da centro a centro tra i pozzetti periferici e quello centrale è di 1 cm.

Nel pozzetto centrale trova posto l'antigene, in quelli periferici i campioni di siero in esame.

L'antigene è dato da un estratto crudo del ceppo di *Mycobacterium* ottenuto sonicando le cellule. Dopo centrifugazione a 40.000 g per 2 ore (per rimuovere i detriti cellulari), il soprastante viene raccolto e liofilizzato.

Al momento dell'uso questo antigene va diluito in acqua alla concentrazione di 10 mg/ml.

Le piastre usate per la prova, incubate a temperatura ambiente entro un contenitore che impedisca l'evaporazione (utile un batuffolo di cotone bagnato), sono da esaminare dopo 24 e 48 ore.

La comparsa di una o più linee di precipitazione entro questo tempo rappresenta un risultato positivo. Sono possibili reazioni crociate fra micobatteri (Merkal, 1973).

Fissazione del complemento (FDC)

Ha avuto un certo successo solo per la ricerca di anticorpi nel siero da *Mycobacterium paratuberculosis* (Rankin, 1970; Goudwaard *e Coll.*, 1976), anche se presenta alcuni inconvenienti: non identifica animali infetti prima della comparsa dei sintomi clinici e dà false reazioni positive imputabili ad altri micobatteri o a *Corynebacterium renale* (Gilmour, 1976).

La tecnica d'esecuzione in micrometodo su piastra (esposta in forma abbreviata) è la seguente:

Materiale
- campioni di siero da esaminare
- siero di referenza anti-*M. paratuberculosis* titolato
- antigene *M. paratuberculosis* titolato
- complemento (siero fresco di cavia inattivato)
- sistema emolitico (SE)
- tampone veronal (diluente)
- piastra *microtiter* a 96 pozzetti con fondo a U
- micropipette da 25 e 50 mcl
- micropipetta multicanale a volume variabile da 50 a 250 mcl
- puntali per micropipetta
- bagnomaria (a +37 e +56 °C)
- *microshaker*
- centrifuga per piastre *microtiter*

Metodo
1. Inattivare i sieri in bagnomaria a +56 °C per 30 minuti.
2. Distribuire 75 mcl di diluente nella fila A e 50 mcl nelle restanti file orizzontali.
3. Introdurre i campioni in esame a 50 mcl nei pozzetti della fila A.
4. Miscelare e allestire le diluizioni con pipetta multicanale, trasferendo 50 mcl dalla fila A fino alla fila G.
5. Distribuire 25 mcl di antigene in tutti i pozzetti, esclusa la fila A.
6. Aggiungere 25 mcl di complemento in tutti i pozzetti dalla fila A alla fila G.
7. Completare il volume dei pozzetti della fila A aggiungendo 25 mcl di diluente.
8. Agitare la piastra su *microshaker* e incubare in termostato a +37 °C per 30 minuti.
9. Aggiungere in tutti i pozzetti 50 mcl di sistema emolitico (SE).
10. Agitare la piastra ed incubare nuovamente a +37 °C per 30 minuti.
11. Centrifugare la piastra a 1000 rpm per 5 minuti o lasciarla una notte in frigorifero a +4 °C.

Controlli
1) PAC del siero: nella fila A, dove non è stato aggiunto l'antigene.
2) PAC dell'antigene: 50 mcl di diluente + 25 mcl di antigene + 25 mcl di complemento
3) Sistema emolitico: 100 mcl di diluente
4) I controlli seguono le modalità della prova principale, con l'aggiunta del sistema emolitico dopo la prima incubazione.

Lettura
È analoga a quella del metodo in provetta, tenendo conto che le diluizioni dei sieri sono 1/5 nella fila B, 1/10 nella fila C ecc.

Identificazione attraverso lo studio dei biomarker

Le variazioni del peptidoma circolante hanno un impatto significativo per comprendere la patogenesi delle malattie batteriche (soprattutto nelle forme sub-cliniche) e si prestano per lo sviluppo di strumenti diagnostici, come nel caso della tubercolosi e della paratubercolosi bovina, cioè due infezioni da micobatteri biologicamente simili.

Si è ipotizzato che i proteomi serici degli animali, in risposta alle infezioni da questi due microrganismi, mostrino similitudini e differenze.

Analizzando il siero di soggetti infettati sperimentalmente, si è notato che, su 110 proteine prese in considerazione, alcune aumentavano la loro concentrazione in proporzioni diverse. Ad esempio, la transtiretina aumentava negli infetti da *M. bovis*, mentre l' alfa-1-microglobulina cresceva negli infetti da *M. paratuberculosis* (Seth *e Coll*., 2009).

Test *IGRA* (*Interferon Gamma Release Assay*)

Sono eseguibili in laboratorio su campioni di sangue e si basano su un fenomeno di stimolazione, riproducibile *in vitro*, del sistema immunogeno dell'individuo (*recall-response*).

Gli individui esposti a malattia hanno infatti nel sangue specifici linfociti T che memorizzano il tipo di antigene infettante.

Aggiungendo al sangue prelevato da un individuo, sospetto d'infezione, un antigene specifico (agente eziologico di quella malattia), si ottiene una rapida re-stimolazione dei linfociti T. Essi producono un'ulteriore quantità di gamma-interferon (IFN-γ) specifico verso quell'antigene, per cui un alto livello di IFN-γ sarebbe indicatore d' infezione.

Nel caso dei micobatteri, gli antigeni specifici introdotti nella prova appartengono a ESAT (*early secretory antigen*) e CFP (*culture filtrate protein*).

Attualmente sono reperibili in Europa almeno due *test* commerciali destinati alla medicina umana: QuantiFERON (Cellestis, Australia) e T-SPOT (Oxford Immunotec, Gran Bretagna).

Il primo *test* (QuantiFERON-Tb Gold o QFN-G) può essere eseguito direttamente su campioni di sangue venoso e funziona come un normale *test* ELISA. In pratica, 1 ml di sangue eparinizzato, prelevato dal paziente, viene incubato a +37 °C per 16-24 ore assieme all'antigene (formato da ESAT-6, CFP-10 e un mitogeno). Segue la separazione del plasma, che viene utilizzato per misurare con una prova in ELISA la quantità di gamma-interferon prodotta (Liu *e Coll*., 2011).

Il secondo *test* (T-SPOT Tb Blood Test) si applica su linfociti purificati, ricavati da sangue venoso periferico, e funziona come ELISPOT (*enzyme-linked-immuno-spot*), da leggere con apposito lettore o al microscopio (Boyd *e Coll*., 2011).

I due *test* hanno dimostrato buone caratteristiche di sensibilità e specificità e non presentano grosse differenze. Tuttavia, un risultato negativo non esclude la possibilità che il soggetto possa avere un'infezione in corso (soprattutto se in età pediatrica o con severa immunodepressione iatrogena), per cui deve essere sempre confrontato con tutti i dati anamnestici e verificato con altri metodi d'indagine.

L'esperienza finora accumulata usando questi *test* per la diagnosi rapida delle forme latenti di tubercolosi ha messo in evidenza che si possono avere situazioni di scarsa corrispondenza con il *test* intradermico della tubercolina, con fenomeni di negativizzazione, ad esempio in ammalati di HIV sotto trattamento con farmaci antitubercolari (Chee *e Coll*., 2007; Luetkemeyer *e Coll*., 2007).

CAPITOLO VI
Altri tipi di esame

PROVE ALLERGICHE

Per alcune specie di micobatteri atipici (tra cui *fortuitum, ulcerans, marinum, kansasii, aquae, xenopi, scrofulaceum, phlei*) sono state messe a punto delle sensitine per effettuare una reazione analoga alla prova allergica della tubercolina, largamente usata in umana verso *M. tuberculosis* e in veterinaria verso *M. bovis e M. avium*.

La preparazione di questi allergeni è molto simile (Magnusson, 1961), in quanto si tratta di prodotti purificati chiamati PPD (*Protein Purified Derivative*).

Alcuni allergeni hanno sigle di riferimento (PPD-A per *M. avium*; PPD-B per *M. intracellulare*; PPD-F per *M. fortuitum*; PPD-G per *M. scrofulaceum*; PPD-Y per *M. kansasii*). Per la paratubercolosi esiste la PPD-johnina.

Produzione di sensitine per prove allergiche su animali (Zavanella *e Coll.*, 1972)

La pellicola superficiale di crescita del ceppo di micobatterio, coltivato in matracci di terreno liquido (ad esempio, Dorset-Henley) a +37 (o +30) °C per 15 giorni, viene trapiantata nello stesso terreno in bottiglie di Roux da incubare per 1 - 2 mesi, a seconda del ceppo.
Dopo sterilizzazione in autoclave a 121 °C, il liquido di crescita viene raccolto, filtrato su garza, addizionato al 10% con acido tricloroacetico (soluzione al 40%) per precipitare le proteine in frigorifero nel periodo di 18-24 ore.
Il sedimento, lavato mediante centrifugazione con acido tricloroacetico all'1% e poi con NaCl al 10%, viene infine sciolto con NaOH 1N fino a neutralizzazione.
Questo prodotto va diluito, fino ad avere circa 2,5 mg/ml di proteina, con un solvente (formato da tampone fosfato M/30, NaCl 0,5%, fenolo 0,5%) e quindi centrifugato ad alta velocità (45.000 rpm su centrifuga Sharples) per allontanare le cellule batteriche.
La sterilità si ottiene filtrando su Seitz EKS-1, dopo di che il prodotto concentrato può essere conservato per un tempo indefinito se liofilizzato.
Per l'uso le sensitine vengono diluite fino ad una determinata concentrazione proteica* aggiungendo una soluzione, sterilizzata in autoclave, contenente glicerina 10%, fenolo 0,5%, NaCl 0,5% in tampone fosfato M/30 a pH 7.
La concentrazione proteica viene stimata con il metodo chimico di Kjeldhal, moltiplicando il contenuto d'azoto per 6,25.
Per alcuni allergeni (come le tubercoline mammiferi e aviare), è possibile esprimere la concentrazione in unità tubercoliniche (UTC) **. Questo viene fatto mediante dosaggio biologico su animali da esperimento, in parallelo ad uno *standard internazionale* di riferimento.

* 0,5 mg/ml nella PPD aviare e nelle sensistine in generale, 1 mg/ml nella PPD bovina

** nella tubercolina PPD bovina la concentrazione ufficiale è di 5000 UTC in 0,1 ml, mentre per la tubercolina PPD aviare è di 5000 UTC in 0,2 ml

La tubercolina PPD aviare risponde positivamente anche nei soggetti infetti da altri micobatteri diversi da *M. avium* complex ed è usata anche nell'uomo.

Lewis *e Coll*. (2003) riportano l'esito delle prove intradermiche secondo il metodo Mantoux fatte in pazienti con infezioni cutanee da *M. marinum* acquisite nelle vasche dei pesci. L'applicazione di 0,1 ml di PPD aviare produceva, dopo 48-72 ore, reazioni maggiori di 10 mm e generalmente superiori rispetto all'effetto della tubercolina PPD umana.

Prove allergiche negli animali d'allevamento

Bovini e bufalini - Vengono effettuate mediante inoculazione intradermica delle tubercoline PPD bovina e PPD aviare e sono regolamentate nel nostro paese dal D.M. 15-12-95 n° 592 (pubblicato sulla G.U. del 30-5-96) allegato I e dal D.L.vo 196/99 allegato B.

La prova viene fatta su un lato del collo (la zona più sensibile), previa tosatura, fra il terzo anteriore e il terzo mediano.

Dopo misurazione, nei punti destinati alla reazione, dello spessore della plica cutanea con cutimetro, vengono inculati nel derma con siringa e ago corto da tubercolina:

- nella prova *standard*, 0,1 ml di tubercolina PPD bovina (= 5.000 UTC)
- nella prova *comparativa*, 12 cm in linea verticale sopra l'inoculo con PPD bovina, 0,2 ml di tubercolina PPD aviare (= 5.000 UTC).

La lettura avviene, in entrambi i tipi di prova, dopo 72 ore (± 4-6 ore) mediante:

- misurazione con cutimetro dell'aumento di spessore della plica cutanea al punto d'inoculo;
- rilevazione di eventuali segni clinici (eritema, essudazione, formazione di escara, lesioni cutanee a buccia d'arancia, dolore, infiammazione dei dotti linfatici regionali o del linfonodo pre-scapolare).

I risultati vengono interpretati come segue:

Prova *standard* con tubercolina PPD bovina		Prova *comparativa* con tubercoline PPD bovina e PPD aviare	Interpretazione dei risultati	
Aumento dello spessore cutaneo	**Segni clinici locali**	**Differenze da rilevare fra le due prove ai fini dell'interpretazione del risultato**	**sospetta tubercolosi bovina**	**sospetta infezione da *M. avium* o da altri micobatteri non tubercolari**
< 2 mm	Assenti	Reazione alla PPD bovina nettamente inferiore a quella con PPD aviare	NEGATIVO	Aumento dello spessore della pelle caratterizzato da gonfiore diffuso al punto d'inoculo della tubercolina PPD aviare. La reazione deve essere superiore a quella della PPD bovina
Tra 2 e 4 mm	Assenti	Reazione con PPD bovina superiore di 2-4 mm a quella con PPD aviare e assenza di segni clinici locali	DUBBIO	
> 4 mm	Presenti, con possibile persistenza oltre le 96 ore	Reazione con PPD bovina superiore di almeno 4 mm a quella con PPD aviare e presenza di segni clinici locali nella zona d'inoculo della PPD bovina	POSITIVO	

Suini - La prova non è regolamentata. È in uso un *test* comparativo per via intradermica, che prevede l'inoculazione di 0,1 ml di PPD bovina nella plica mediana di un orecchio e, rispettivamente, di 0,2 ml di PPD aviare nell'altro orecchio.

La lettura avviene dopo 72 ore e si limita alla rilevazione di segni clinici nella zona d'inoculo, rappresentati essenzialmente da edema, iperemia, formazione di escara.

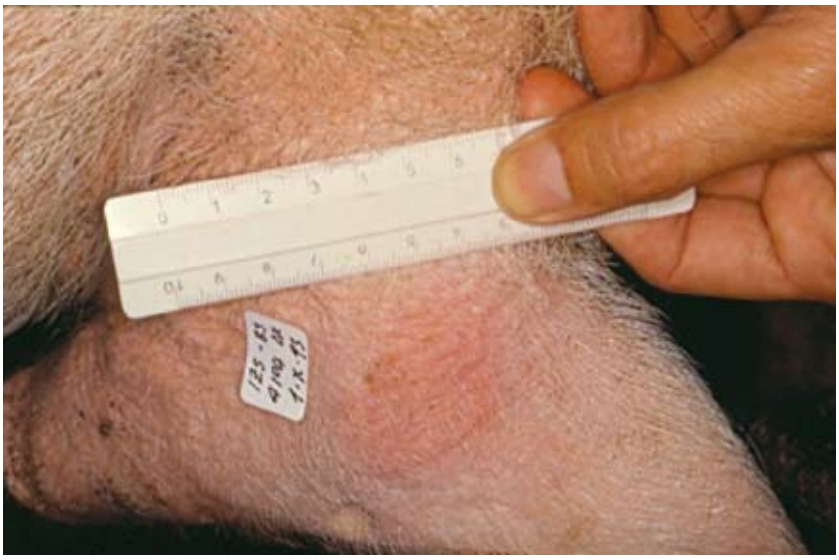
Prova tubercolinica comparativa con PPD bovina e aviare

Prova tubercolinica comparativa con positività per PPD aviare

La presenza di antigeni comuni fra micobatteri tubercolari e micobatteri atipici causa, soprattutto nei bovini di allevamenti risanati, reazioni positive aspecifiche che simulano reinfezioni tubercolari.
Facendo un uso combinato di più tipi di tubercoline (ad esempio, PPD bovina a 7500 U.T./dose e PPD aviare a 2000 U.T./dose nelle cosiddetta "prova comparativa") si ottiene un maggior numero di reazioni positive (Petricevic *e Coll*., 1977).

I batteri atipici dei gruppi II e IV sembrano essere i più coinvolti nel procurare una para-sensibilizzazione, probabilmente perché sono quelli che causano generalmente le lesioni cutanee nel bovino, con conseguente sensibilizzazione paraspecifica.
Sono microrganismi ubiquitari, cui sono esposti soprattutto i soggetti che pascolano su terreni acquitrinosi, oppure ricchi di cespugliosità.
L'azione para-sensibilizzante degli atipici è dovuta all'effettiva penetrazione nei tessuti, per esempio attraverso piccole lesioni della cute e delle mucose, mentre la semplice ingestione non sarebbe sufficiente per scatenare la reazione allergica (Schliesser, 1969).

Le reazioni falsamente positive o dubbie alla tubercolina mammiferi (coallergiche o para-allergiche) possono essere imputate nelle bovine da latte alla presenza di *M. aquae*, appartenente al II° gruppo di Runyon, agente eziologico (assieme ad altri microrganismi) di una malattia cutanea nota come telite nodulare.
Tali considerazioni inducono ad adottare negli allevamenti in cui si registra telite nodulare la reazione doppia comparativa con tubercolina mammiferi ed aviare, poiché quest'ultima appare più sensibile (maggior numero di positività), più specifica (minor numero di negatività) e più fedele nel tempo (2 anni anziché 3) rispetto alla tubercolina mammiferi per svelare le para-allergie micobatteriche (Qudar *e Coll*., 1968).



Prova tubercolinica con positività per PPD aviare nel suino

PROVE DI SENSIBILITÀ AD ANTIBIOTICI

I *test* di sensibilità sui micobatteri atipici (o non tubercolari) a lenta crescita sono di scarsa utilità clinica per diversi motivi:

- spesso gli isolati non sono clinicamente significativi;
- non esistono metodiche standardizzate per l'esecuzione dell'antibiogramma;
- nella gran parte dei casi non esiste correlazione fra i risultati ottenuti *in vitro* e la risposta del paziente al trattamento;
- per le specie di più frequente isolamento esistono già protocolli terapeutici che si sono dimostrati efficaci *in vivo* in numerosi studi controllati.

I *test* di sensibilità per i micobatteri a rapida crescita, invece, dovrebbero essere sempre eseguiti su tutti i primi isolati, una volta che se ne sia accertata la significatività clinica.

Le prove possono essere eseguite col classico metodo delle diluizioni in piastra o in terreno liquido. Il metodo della diffusione degli antibiotici in dischetti, sul tipo del *test* di Kirby-Bauer, non funziona bene con i micobatteri (Casal *e Coll*., 1987).

Una delle tecniche eseguibili in terreno solido prevede di allestire le diluizioni dei farmaci fra 0,25 e 128 mcg/ml in Middlebrook 7H10 Agar.

I micobatteri vengono fatti crescere in Brodo di Middlebrook 7H9 a +37 °C e diluiti con acqua distillata sterile fino a una torbidità pari al tubo 1 del torbidimetro di McFarland (circa 2 x 10^8 CFU/ml).

Questa sospensione, diluita 1/100, serve per inoculare ciascuna piastra di terreno agarizzato, servendosi di una spatola sterile a L per batteriologia.

Dopo incubazione a +37 °C per 2 settimane si leggono i risultati. Come al solito, la concentrazione minima inibente (MIC) corrisponde alla più bassa concentrazione di antibiotico presente nelle piastre capace di inibire completamente la crescita microbica.

Nel caso di *M. fortuitum* e *M. chelonae*, le colture dei ceppi da esaminare vengono incubate, rispettivamente, a +37 e +28 °C per 7 giorni in Dubos Oleic Agar Base.

La sospensione per la prova viene preparata diluendo in acqua distillata sterile i germi, staccati dalla piastra di terreno agarizzato, fino a un'opacità pari allo standard 1 di McFarland.

Le piastre di Mueller-Hinton Agar, contenenti le diluizioni degli antibiotici da 0.25 a 128 mcg/ml, vengono seminate con una diluizione 1/1000 della sospensione preparata. I risultati vengono letti dopo incubazione per 2-5 giorni a +37 e +28 °C.

Inderlind *e Coll*. (1987) provando vari metodi di allestimento della MIC per *M. avium* hanno, tra l'altro, sperimentato l'originale procedura di Vestal, che consiste nel collocare ciascun disco, impregnato d'un antibiotico diverso, entro un settore di piastra Petri divisa in quattro.

5 ml di terreno Middlebrook 7H10 vengono versati e lasciati solidificare in ciascun settore, dove poi si semina il ceppo in esame, coltivato in brodo di Middlebrook 7H9 e diluito a 2 x 10^9 batteri per ml. Il quarto settore non contiene antibiotici e serve da controllo.

La piastra, incubata a +37 °C per 21 giorni, viene esaminata e in caso di mancato sviluppo in un determinato quadrante, il ceppo si considera sensibile a quell'antibiotico.

Le prove possono avvenire anche allestendo microdiluizioni degli antibiotici in brodo, secondo Chairholder *e Coll*. del NCCLS (2000), come riferito anche nel lavoro di Brown-Elliott (2002) per la determinazione della MIC di gatifloxacina e ciprofloxacina verso *M. fortuitum* e *M. chelonae.*

La determinazione della MIC con metodi radiometrici è possibile con lo strumento BACTEC 460-TB.

La crescita batterica viene valutata in un'atmosfera confinata in funzione della capacità dei batteri a catabolizzare l'acido palmitico marcato con ^{14}C in brodo 7H12 e misurando automaticamente la CO_2 radioattiva prodotta (Rastogi *e Coll.*, 1993).

Moore *e Coll.* (2004) hanno messo a punto un metodo semplificato di prova della sensibilità ai farmaci, basato sull'osservazione microscopica della crescita in piastre *microtiter* a 96 pozzetti.

Questi contenevano il campione decontaminato, il brodo Middlebrook 7H9, un indicatore, acido oleico-albumina-destrosio-catalasi e gli inibitori polimyxina B / acido nalidixico / trimethoprim-azlocillina.

L'osservazione della crescita veniva fatta con un microscopio invertito (ingrandimento 40x) per un periodo di 40 giorni. Il germe veniva considerato sensibile verso una determinata sostanza se si vedeva crescita solo nei controlli privi di antibiotico.

ESAMI ISTOLOGICI

Come è noto, in alcuni casi l'allestimento di preparati istologici favorisce e completa la diagnosi di malattie batteriche, in quanto permette di evidenziare lesioni tipiche alle strutture e vedere i microrganismi colorati nei tessuti o all'interno delle cellule.

Nel caso della paratubercolosi del bovino, ad esempio, l'esito dell'esame istologico è indiscutibile.

Esaminando prelievi dalla porzione terminale del tenue, dalla valvola ileo-cecale e dai linfonodi, si fissano i pezzi in formalina al 10% e si colorano le sezioni con ematossilina-eosina.

È possibile rilevare i macrofagi e le cellule epitelioidi, contenenti nel citoplasma ammassi di bacilli. Con la doppia colorazione (la seconda con il metodo di Ziehl-Neelsen sulle sezioni d'organo) questi bacilli si confermano alcool-acido resistenti (Zavanella *e Coll.*, 1984).

Nelle infezioni cutanee, infine, l'esame istologico costituisce un ulteriore elemento di diagnosi nei casi in cui la coltura del microrganismo (ad esempio, *M. marinum*) non riesce e rimane solo l'evidenza della clinica e della risposta terapeutica (Ang *e Coll.*, 2000; Dodiuk-Gad *e Coll.*, 2007).

Di seguito sono riportate alcune nozioni pratiche per l'allestimento di preparat istologici finalizzati alla diagnosi di laboratorio, partendo da biopsie o da prelievi effettuati in sede di necroscopia su animali da esperimento.

NOTA TECNICA
(riferita in particolare alla sperimentazione sui topi esposta in precedenza)

La fissazione, che serve per immobilizzare i costituenti tissutali del campione, avviene ponendo il materiale per 2-3 giorni in formalina (soluzione al 10% in PBS o altro tampone fisiologico), osservando un rapporto di 1 a 6-8 volte il volume del liquido.
Segue la preparazione del campione per l'inclusione in paraffina, che si realizza attraverso tre fasi.
La prima fase (disidratazione) consiste in una serie di passaggi in alcool etilico con i seguenti tempi: alcool 50° (due cambi di un'ora ciascuno) – alcool 70° (un cambio di un'ora + un cambio di due ore) – alcool 95° (due cambi di 90 minuti) – alcool assoluto (due-tre cambi di un'ora ciascuno).
La seconda fase (chiarificazione) consiste nel porre il campione in xilolo per 1-3 ore, fino a che diventa diafano.
La terza fase (infiltrazione) consiste nel porre il campione in un contenitore con paraffina mantenuta fusa in un termostato a 56-59 °C per 6-9 ore, con due cambi.
Successivamente con appositi stampi e pinze pre-riscaldate è possibile includere il campione nella paraffina stessa, rivolgendo la superficie di taglio verso il basso.
Con il taglio al microtomo, regolato a 4-5 micron in ambiente a temperatura favorevole (30-35 °C sotto il punto di fusione della paraffina), si ottengono sezioni da stendere con pennellino in acqua distillata a 40-45 °C e quindi da posizionare su vetrini portaoggetti, dove asciugano in 2-3 ore in termostato.
Ogni colorazione in ambiente acquoso esige la preventiva reidratazione dei preparati con i seguenti lavaggi: xilolo (due passaggi di 2-3 minuti ciascuno) – alcool assoluto (1-2 minuti) – alcool 95° (1-2 minuti) – alcool 70° (2-3 minuti) – acqua distillata.

La classica colorazione ematossilina-eosina richiede i seguenti passaggi:
- emallume di Mayer (15 minuti)
- acqua distillata e poi di fonte, fino a che la sezione non è virata completamente all'azzurro (in 6-7 minuti)
- eosina (2-3 minuti)
- acqua distillata
- alcool 70° e alcool 95° (ciascuno per 30 secondi/un minuto)
- alcool assoluto (1 minuto)
- xilolo (3 minuti)
- balsamo (montaggio con coprioggetto)

Altre colorazioni

Colorazione con auramina O per esame in fluorescenza
(per la preparazione dei reagenti vedi esame microscopico diretto)

1. Dopo aver sparaffinato le sezioni di tessuto e averle portate in acqua distillata, colorarle con auramina O per 30 minuti a temperatura ambiente
2. Lavare con acqua corrente
3. Decolorare per 20 minuti con alcool-acido
4. Lavare con acqua corrente
5. Applicare il colorante di contrasto (permanganato) per 3 minuti
6. Lavare con acqua corrente

7. Far asciugare all'aria
8. Montare il coprioggetti su vetrino con balsamo

I micobatteri alcool-acido resistenti appaiono colorati in giallo-verde fluorescente su fondo verde scuro.

Colorazione col metodo di Dieterle (Brady *e Coll.*, 1998)
(per la preparazione dei reagenti vedi esame microscopico diretto)

Le sezioni sparaffinate con xilolo e idratate attraverso i vari alcool fino al passaggio in acqua, vengono poste per 30 minuti in soluzione di Wiley.

Dopo due lavaggi in acqua distillata, vengono messe per 5 minuti in soluzione al 10% zinco-formalina e quindi lavate due volte in acqua distillata.

Segue un passaggio di 5 minuti in soluzione A, preriscaldata a 70 °C con successivi due lavaggi in acqua distillata.

I vetrini vanno poi disidratati immergendoli in alcool assoluto e quindi posti per 3 minuti nella soluzione GUM MASTIC.

È necessaria un'asciugatura all'aria per 1 minuto per far essiccare il preparato, che poi va lasciato per 10-15 minuti in soluzione di sviluppo a 70 °C, fino a che il colore vira al bruno.

Dopo disidratazione con alcool assoluto, i vetrini vengono puliti con xilolo e sono pronti per essere montati con un coprioggetti e balsamo.

I micobatteri, come gli altri germi che assumono l'impregnazione argentica, prendono un colore bruno su sfondo giallastro.

UN PROBLEMA SPECIFICO: LA DIAGNOSI DI PARATUBERCOLOSI

Osservazioni del Centro Nazionale di Referenza per la Paratubercolosi Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna Sede di Piacenza

Per fare diagnosi di paratubercolosi possono essere utilizzati diversi test, diretti a mettere in evidenza lesioni caratteristiche (anatomopatologiche o istologiche), l'agente eziologico (coltura, PCR) o una risposta immunitaria, di tipo sia cellulo-mediato (reazione intradermica o gamma-interferon) che sierologico (ELISA, AGID).

1. Immunità cellulo-mediata

Nelle fasi iniziali di infezione da micobatteri, si sviluppa una immunità di tipo cellulo-mediato, sostenuta da linfociti *T helper 1* che, attraverso la produzione di gamma-interferon, stimolano i macrofagi, determinando una risposta protettiva nei confronti dell'infezione.

Il vantaggio dei *test* diretti a svelare questo tipo di risposta è quindi la precocità, dunque la capacità di svelare le nuove infezioni negli animali giovani; al contrario, gli animali in fase avanzata di infezione dimostrano spesso reazione scarsa o nulla.

Tale *test* dimostra infatti una bassa correlazione con la progressione dell'infezione e con l'entità dell'escrezione fecale; questo può essere dovuto al fatto che gli animali che manifestano una risposta cellulo-mediata significativa sono quelli che, con maggiore probabilità, riusciranno a confinare l'infezione e non presenteranno forme evolutive con elevata escrezione fecale e siero-positività (Chiodini *e Coll.*, 1984).

Un altro limite del *test* è rappresentato dalle frequenti risposte di tipo aspecifico, per la presenza di antigeni comuni tra la Johnina PPD e altri micobatteri ambientali, tra cui *Mycobacterium avium* subsp. *avium*.

L'utilizzo di questo tipo di *test* potrebbe essere sostanzialmente quello di monitorare la diffusione dell'agente eziologico in allevamento e quindi di formulare un giudizio sull'efficacia delle misure di ordine igienico sanitario messe in atto a protezione dei vitelli; al contrario, date le carenze di sensibilità e di specificità, tali *test* non sono indicati per stabilire lo stato di infezione di un animale, sia che si tratti di piani di controllo, che di *test* per l'esportazione (Huda *e Coll*., 2004).

Test *allergico intradermico*

Il *test* intradermico nel bovino prevede l'inoculazione di tubercolina PPD aviare o di PPD johnina, che dimostrano avere analoghi livelli di sensibilità e specificità (OIE, 2008). Consiste nell'inoculazione intradermica nella regione del collo di 0,1 ml di PPD.

La lettura avviene dopo 72 ore e la reazione è considerata positiva se si manifesta un incremento di spessore cutaneo di almeno 2 mm nel punto d'inoculo.

Negli USA si considera, invece, positivo un aumento di spessore della cute di 3 mm o più. Il *test* può essere fatto contemporaneamente alla prova tubercolinica.

Da alcuni Autori questo *test* viene ritenuto utile per un *dépistage* iniziale della paratubercolosi, prima della comparsa clinica della malattia (Hole *e Coll*., 1959), mentre non viene ritenuto attendibile per identificare gli animali infetti (Thoen *e Coll*., 1979).

In ogni caso il *test* non è consigliabile per eliminare animali da allevamenti infetti, causa un'elevata percentuale di falsi positivi (Rankin, 1970).

La PPD johnina può essere sostituita con risultati comparabili dalla PPD aviare, anche se in passato qualche Autore riteneva quest'ultima dotata di minore specificità (Zorawski *e Coll*., 1972).

La *prova sistemica* consiste, invece, nell'inoculare intravena 2 ml di PPD Johnina. Negli animali sensibilizzati, dopo 3-5 ore si osserva un' innalzamento della temperatura, con massimo alla quinta-ottava ora. Un aumento di 0,8 °C è già un indice di positività.

Gli animali non infetti non manifestano alcuna reazione; quelli già ammalati, dopo un'ora dall'inoculo, mostrano depressione, perdita d'appetito, diarrea profusa.

La prova sistemica è valida per differenziare la malattia di Johne da altre cause di diarrea (Larsen, 1972).

Gamma interferon

Test in vitro finalizzati alla rilevazione della presenza di citochine (gamma-interferon) possono essere utilizzati per misurare la risposta cellulo-mediata e quindi per determinare un precedente stato di infezione o esposizione all'antigene.

I leucociti, raccolti dal *buffy coat* di campioni di sangue fresco eparinizzato, vengono esposti all'antigene; un *test* ELISA viene applicato per misurare il rilascio di gamma-interferon, utilizzato come indicatore dell'entità della risposta cellulo-mediata.

Il *test* ha delle intrinseche difficoltà operative, in quanto spesso risulta difficile assicurare che il periodo di tempo che intercorre tra il prelievo e l'analisi sia mantenuto all'interno dei limiti che garantiscono la vitalità delle cellule al momento del *test* e che quindi il *test* non risulti falsamente negativo.

2. Immunità umorale

Nelle fasi avanzate di infezione, all'immunità di tipo cellulo-mediato si sostituisce una risposta di tipo umorale, sostenuta da linfociti *T helper 2*.

Tale risposta, caratterizzata dalla presenza di IgG1 nel siero di sangue e nel latte, non è protettiva; la presenza di anticorpi indica infatti che la malattia si trova in uno stadio evolutivo ormai fuori controllo, con elevata probabilità di escrezione fecale.

Elisa

Il *test* sierologico attualmente più utilizzato è in ELISA che, grazie alla sua maggiore sensibilità e specificità, ma anche alla semplicità di esecuzione, ha sostituito la fissazione del complemento, sia in campo diagnostico che come prova di riferimento per l'esportazione.

La sensibilità del *test* è stata stimata mediante studi longitudinali (Whitlock *e Coll*., 2000), utilizzando come *gold-standard* la coltura fecale.

Complessivamente il singolo *test* applicato in un allevamento infetto riesce ad individuare il 25-38% degli animali infetti, ma la sensibilità appare strettamente correlata allo stadio di infezione.

Negli animali infetti in stadio iniziale, non escretori, la sensibilità è generalmente inferiore al 10%; negli animali escretori può variare dal 15% in caso di bassa escrezione, al 50% in caso di escrezione moderata, per arrivare al 75% in caso di escrezione elevata. Negli animali con forma clinica manifesta la sensibilità stimata si avvicina al 90% (Whitlock *e Coll*., 2000).

Il preadsorbimento dei sieri con *Mycobacterium phlei*, *step* previsto dal Manuale OIE, limitando la possibilità di reazioni crociate con altri micobatteri, ha notevolmente migliorato la specificità dei *kit* ELISA in commercio, che ha raggiunto valori superiori al 99% (Nielsen, 2008) .

Questo, unitamente al suo basso costo, alla rapidità di esecuzione (poche ore), e alla possibilità di applicazione al latte, ne fanno, insieme all'esame colturale delle feci, il *test* più utilizzato nell'ambito dei piani di controllo e di certificazione aziendale.

Immunodiffusione in gel *di agar*

Il *test* di immunodiffusione in *gel* di agar (AGID), di semplice e rapida esecuzione e di basso costo, a fronte di una specificità ottima, presenta una bassa sensibilità (Sweeney *e Coll.*, 2002), inferiore al *test* ELISA nelle fasi precliniche; per questo la sua applicazione, in campo bovino, è generalmente limitata alle forme cliniche.

Nei piccoli ruminanti viene ancora ampiamente utilizzato in associazione all' ELISA (Sweeney *e Coll*., 2002).

3. Diagnosi diretta

Esame anatomo-patologico

Le lesioni sono preferenzialmente localizzate a livello di ileo terminale e valvola ileo-ciecale, ma possono essere estese a tutto l'intestino, dal duodeno al retto.

Si osserva un caratteristico ispessimento, talvolta accompagnato da edema della mucosa intestinale, che assume un aspetto corrugato, che non scompare allo stiramento.

I linfonodi intestinali nel bovino sono aumentati di volume ed edematosi, mentre negli ovicaprini si può osservare necrosi caseosa e calcificazione. Non sempre esiste una correlazione tra entità dei sintomi e gravità delle lesioni anatomo-patologiche (Chiodini *e Coll*., 1984).

Esame istologico

Il prelievo deve riguardare siti multipli, comprendendo sia la parete intestinale che i linfonodi meseraici.

I preparati vanno colorati mediante colorazioni ematossilina-eosina e Ziehl-Neelsen.

Le lesioni tipiche consistono in un' infiltrazione della mucosa, della sottomucosa, delle placche del Peyer e della corticale dei linfonodi.

Si osservano cellule epitelioidi e cellule giganti multinucleate, in cui sono generalmente presenti batteri singoli o aggregati (OIE, 2008).

Esame microscopico

Consiste nell'osservazione microscopica di strisci eseguiti da feci o da tessuti, dopo colorazione di Ziehl-Neelsen.

Il risultato viene considerato positivo quando si rilevano uno o più aggregati di almeno tre bacilli di piccole dimensioni (0.5 x 1.5 μm), fortemente acido-resistenti (OIE, 2008).

Il *test* è rapido, economico e non richiede attrezzature particolari ma, data la sua bassa sensibilità, è opportuno riservarne l'utilizzo ai campioni prelevati da animali colpiti dalla forma clinica.

Inoltre l'esperienza dell'operatore è fondamentale per l'attendibilità della diagnosi; non è raro infatti ritrovare altri bacilli acido resistenti non appartenenti a MAP.

Per questo motivo, in caso di positività, è sempre opportuno confermare la diagnosi con un altro *test* (esame sierologico, colturale o PCR).

Esame colturale

Il principale vantaggio di questo *test*, rispetto a quelli di tipo indiretto, è quello di individuare gli animali con escrezione in atto, quindi i più pericolosi dal punto di vista epidemiologico; gli animali positivi alle colture fecali sono infatti quelli che con maggiore probabilità eliminano MAP, oltre che con le feci, con latte e colostro e il cui feto ha maggiori probabilità di nascere infetto.

Un altro vantaggio di questa metodica è che il ceppo di MAP isolato è successivamente disponibile per la tipizzazione mediante PCR e per l'eventuale sub-tipizzazione per studi di epidemiologia molecolare, mediante tecniche diverse (IS900-RFLP, PFGE, MIRU-VNTR) (Stevenson *e Coll*., 2010).

A fronte dei suoi vantaggi, che ne fanno il *test* d'elezione insieme all' ELISA nell'ambito dei piani di controllo, non si possono sottacere numerosi inconvenienti, quali:

- scarsa sensibilità negli animali in fase di infezione iniziale (23-29%) (Nielsen *e Coll*., 2008);
- lunghi tempi di attesa per la risposta (4-16 settimane per i ceppi bovini, fino a 8 mesi per i ceppi ovini);
- possibilità di transito passivo in animali allevati in ambiente contaminato (Sweeney *e Coll*., 1992);
- frequenti inquinamenti da muffe e batteri sporulati che resistono ai trattamenti di decontaminazione e che spesso ne inficiano il risultato. A questo proposito è opportuno ricordare che l'alimentazione degli animali con insilati o sottoprodotti ammuffiti o mal conservati ha una responsabilità diretta sull'attendibilità del risultato della coltura;
- costi elevati;
- necessità di attrezzature e personale specializzato dotato di esperienza;
- scarsa possibilità di standardizzazione, da cui derivano le notevoli differenze di sensibilità.

L'esame colturale delle feci prevede una fase di decontaminazione mediante esadecil-piridinio cloruro (HPC) e la semina successiva su opportuni terreni supplementati con Mycobactin J.

Il più usato è il terreno di Herrold al tuorlo d'uovo, ma, per i ceppi di difficile isolamento come i ceppi di origine ovina, vengono anche utilizzati i terreni Middlebrook (sia solido che liquido) e Löwenstein-Jensen.

Per convenzione gli animali si dividono in base al loro livello di escrezione fecale, che può risultare lieve (<10 UFC/ provetta), moderato (10-50 UFC/provetta), alto (50-100 UFC/provetta), o molto alto (>100 UFC/provetta) (Whitlock *e Coll*., 2000).

Questa informazione deve essere fornita all'allevatore e/o al veterinario da parte del laboratorio, in modo da disporre di ulteriori elementi per definire le priorità delle azioni di profilassi in azienda (isolamento, ordine di abbattimento, ecc.).

Un'alternativa, rispetto ai metodi colturali tradizionali su terreno solido, è il sistema BACTEC®, che utilizza un terreno di coltura liquido (Middlebrook 7H12) con aggiunta di tuorlo d'uovo e Mycobactin, in cui viene misurato automaticamente il rilascio di un radioisotopo ($^{14}CO_2$ marcato da palmitato) a seguito del metabolismo batterico.

Il sistema BACTEC® (Beckton Dickinson), riesce a rilevare la positività in un numero maggiore di campioni e in circa metà tempo rispetto ai metodi di coltura tradizionale (OIE, 2008).

Se la lettura automatica è un indubbio vantaggio in termini di tempo, soprattutto per quei laboratori che processano migliaia di campioni, è vero che, nel caso in cui l'apparecchiatura automatica fornisca un risultato positivo di crescita, è comunque necessario confermare l'identità della coltura mediante PCR.

Inoltre si tratta di una tecnica molto costosa, che prevedendo l'utilizzo di isotopi radioattivi non è alla portata di tutti i laboratori.

Per ovviare a questi svantaggi, sono state introdotte metodiche di tipo fluorimetrico (MGIT®, Beckton Dickinson) o basate sul consumo di gas da parte di micobatteri vitali nell'ambito del loro ciclo metabolico (Trek Diagnostic ESP II).

Metodi di biologia molecolare

Si basano sull'amplificazione mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) e sulla messa in evidenza, da vari substrati (feci, latte, tessuti) di IS900, una sequenza di inserzione di 1451 bp, presente da 14 a 20 volte nel genoma di MAP (Collins *e Coll*., 1989; Green *e Coll*., 1989).

Pur essendo tale sequenza specifica di MAP, sono state recentemente messe in evidenza, seppur in casi rari, sequenze IS900-*like* in ceppi di micobatteri non paratubercolari (Cousins *e Coll*., 1999; Englund *e Coll*., 2002; Taddei *e Coll*., 2008).

Atri *target* molecolari (IS*Mav*2, F57, ISMap*02*, *hspX*), unicamente presenti in MAP (OIE), non essendo presenti in un numero altrettanto elevato di copie nel genoma di MAP non raggiungono la sensibilità diagnostica di IS900, quando la PCR è applicata su materiali biologici (feci, latte, seme) dove il numero di micobatteri può essere molto limitato (Kavaji *e Coll*., 2007).

I vantaggi della PCR rispetto alle colture tradizionali sono essenzialmente i tempi di realizzazione (poche ore invece di 4-16 settimane, nel caso dei ceppi bovini) e la mancata influenza di eventuali contaminanti, che possono invece inficiare l'esito delle colture fecali, oltre alla possibilità di mettere in evidenza ceppi non coltivabili o difficilmente coltivabili, come accade per i ceppi di origine ovina e umana.

Nel passato uno dei maggiori svantaggi della PCR rispetto alla coltura fecale era la minore sensibilità. Questo era dovuto da una parte alla spessa parete di MAP, ricca in lipidi e cere, che impediva una estrazione efficace del DNA, e dall'altra alla presenza di sostanze inibenti la reazione PCR, presenti nelle matrici biologiche di interesse (feci, latte).

Recentemente, attraverso l'utilizzo di vari sistemi di rottura meccanica della parete abbinati a metodiche di separazione magnetica, si è riusciti a raggiungere livelli di sensibilità prossimi a quelli delle colture (Kavaji *e Coll.*, 2007).

Tuttavia i principali svantaggi della PCR sono:
- costi elevati;
- necessità di laboratori attrezzati e personale specializzato;
- possibilità di *cross*-contaminazioni durante le manipolazioni in laboratorio, in particolare quando vengano processati molti campioni con un' elevata percentuale di positività.

Allo stato attuale, l'utilizzo della PCR viene raccomandato:
- di *routine* nella tipizzazione dei ceppi isolati in coltura;
- nei casi in cui non si necessiti di una particolare sensibilità (diagnosi di un caso clinico o conferma al tavolo anatomo-patologico);
- qualora si evidenzi la necessità di una diagnosi rapida (compravendita, esportazione).

4. Conclusioni

La scelta del *test* non può prescindere dalla conoscenza della patogenesi dell'infezione nelle sue varie fasi. Esiste un *test* preferenziale per ogni stadio di infezione, in rapporto al tipo di risposta caratteristico per quello stadio.

La conoscenza delle caratteristiche dei *test* disponibili in commercio (sensibilità nei vari stadi evolutivi, specificità, tempi di esecuzione, costi) può orientarne la scelta per ogni particolare situazione (piano di controllo o di risanamento, certificazione aziendale, *test* per compravendita, *test* per esportazione, diagnosi di forme cliniche, conferma al tavolo anatomopatologico).

I *test* che attualmente meglio si prestano all'applicazione in piani di risanamento e certificazione sono quelli diretti (coltura fecale e PCR) e l' ELISA, molto specifici, ma con marcati limiti di sensibilità, in particolare nelle fasi precoci dell' infezione.

Una strada per ovviare alla mancanza di sensibilità dei *test* è ripeterli o associare prove diverse.

Le sfide per il futuro potranno essere, attraverso l'utilizzo di nuove tecnologie:
1. ottenere dei *test* sierologici che, mantenendo la specificità di quelli già in commercio, riescano, attraverso l'utilizzo di antigeni espressi in fase precoce, ad avere una maggiore sensibilità;
2. ottenere antigeni purificati più specifici, ma altrettanto immunogeni rispetto alle PPD, da utilizzare nei *test* di valutazione dell'immunità-cellulo mediata e da applicare sugli animali giovani;
3. sviluppare *test* PCR a costi più ridotti ed automatizzabili, in modo da essere applicabili su vasta scala. I dati desunti da *ring test* internazionali e nazionali mostrano un'estrema variabilità delle *performances* dei *test* diagnostici PCR utilizzati da laboratori diversi, a causa di una scarsa standardizzazione dei protocolli operativi.

Data l'importanza crescente della patologia in campo veterinario e i suoi possibili legami con il Morbo di Crohn, emerge dunque la necessità di consolidare il ruolo di coordinamento dei laboratori operanti nel settore da parte del Centro di Referenza Nazionale, in modo tale da garantire ad ogni laboratorio la continua verifica della propria operatività, così come la creazione di *panel* di campioni standardizzati su cui poter effettuare prove di validazione secondo gli *standard* internazionali.

APPENDICE

NORME SPECIFICHE DI SICUREZZA IN LABORATORIO

Nella graduatoria di pericolosità dei microrganismi, solo i micobatteri del gruppo Tb complex (*tuberculosis*, *bovis*, *africanum*, *microti*) e le specie *leprae* ed *ulcerans* sono considerati di livello III, cioè ad elevato rischio infettante.
I micobatteri atipici e saprofiti, invece, sono collocati su un gradino più in basso, al livello II.
Tuttavia, nell'incertezza della specie introdotta con materiali sconosciuti, il laboratorio adotta verso tutti i micobatteri le misure di sicurezza previste per il livello III di pericolosità.
In pratica, i requisiti richiesti vengono raggiunti con le seguenti precauzioni:

- locali in depressione con filtrazione dell'aria in entrata e in uscita
- cappe a flusso laminare verticale classe II con filtrazione dell'aria espulsa
- centrifughe a tenuta di *aerosol*
- uso di dispositivi di protezione individuale (guanti, mascherine, propipette, ecc)
- vestiario a protezione totale di esclusivo uso interno al laboratorio
- materiale di consumo in plastica monouso (provette, pipette, ecc)
- disponibilità di disinfettanti adeguati per le superfici di lavoro e di prodotti per la sanificazione periodica dell'ambiente (fumigazione)
- autoclave a doppia porta per la decontaminazione del materiale usato
- distruzione dei rifiuti autoclavati mediante incineritore

TERRENI E REAGENTI

Sono riportate qui di seguito le composizioni e le modalità di preparazione in laboratorio dei più diffusi terreni adatti alla coltivazione dei micobatteri in generale, compresi quindi gli atipici.
Le quantità sono espresse in grammi, se non diversamente indicato.

Brodo ureasi
Terreno liquido per prova biochimica dell'urea

Estratto di lievito 0.1, potassio fosfato monobasico 9.1, sodio fosfato bibasico 9.5, urea 20, rosso fenolo 0.01, acqua distillata 1000 ml
pH finale = 6.8 ± 0.2
Sterilizzare per filtrazione (0.2 mmicron) e distribuire sterilmente in provette a ml 5
Colore del terreno: trasparente, rosa-giallastro
Conservabilità: in frigorifero a +4 °C per 3 mesi

Dorset
(formula originale di un terreno contenente solo uovo)

Lavare le uova ed immergerle in acido fenico al 5% per qualche minuto. Flambare le due

estremità, forarle con ago sterile, espellere il contenuto con aria sterile filtrata. Determinare il peso dell'uovo raccolto in un matraccio ed aggiungere 1/10 di acqua distillata sterile. Mescolare e filtrare su garza sterile. Distribuire in provette a becco di clarino (*slant*) e far coagulare in apparecchio coagulatore termostatato a 70 °C per 2 ore.

Dorset-Henley
Terreno liquido usato in particolare per la produzione di tubercoline e di Mycobactin da M. phlei

L-asparagina 14, potassio fosfato bibasico anidro 1.42, sodio citrato biidrato 0.9, magnesio solfato eptaidrato 1.5, ferro citrato ferrico 0.3, glucosio 10, glicerolo 50 ml, zinco solfato soluzione 1% 2.7 ml, rame solfato soluzione 1% 0.4 ml, calcio cloruro soluzione 1% 6.7 ml, cobalto nitrato soluzione 1% 0.13 ml, acqua distillata fino a 1000 ml
Sciogliere gli ingredienti separatamente in una piccola quantità d'acqua. Scaldare leggermente per sciogliere le soluzioni di asparagina e ferro citrato. Sterilizzare in autoclave a 115 °C per 25 minuti.

Dubos solido
Terreno usato per l'isolamento ed il mantenimento dei micobatteri

Miscela di sali: asparagina 2, casitone 0.5, fosfato disodico 2.5, fosfato monopotassico 1, citrato di ferro ammoniacale 50, magnesio solfato 0.5, calcio cloruro 0.5 mg, zinco solfato 0.1 mg, rame solfato 0.1 mg, Tween-80 0.2, acido oleico 0.025%, agar-agar 30
Far sciogliere 4.2 grammi della miscela di sali in 170 ml di acqua distillata, aggiungendo 10 ml di glicerina.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.
Raffreddare a circa 50 °C.
Aggiungere sterilmente 20 ml di albumina o di siero bovino addizionato con glucosio al 7.5%. Queste sostanze vanno sterilizzate a parte per filtrazione.
Distribuire in provette a 5-7 ml e far solidificare a becco di clarino.

EYA (Egg Yolk Agar)
Terreno di Herrold studiato per la crescita dei micobatteri tubercolari umani

Estratto di carne Liebig 3.0, peptone 10.0, sodio cloruro 5.0, agar-agar 10.0, acqua distillata 1000 ml
pH = 7.5 ± 0.2
Il tuorlo di un uovo prelevato in asepsi viene miscelato con 150 ml di terreno base sterilizzato e mantenuto fuso a 60 °C, in modo da ottenere una percentuale d'uovo di circa il 15%
Dopo raffreddamento a circa 40 °C, il terreno viene distribuito a 25 ml in piastre di Petri e lasciato solidificare.

Herrold
Terreno di uso generale per micobatteri. Con l'aggiunta di Mycobactin serve anche per coltivare M. paratuberculosis

Peptone 9, NaCl 4.5, agar-agar 15.3, estratto di carne 2.7, acqua distillata 270 ml. Mycobactin 150 mg (in 4 ml di etanolo), glicerolo 27 ml, verde malachite soluzione 2% 5 ml, tuorli d'uovo 6
Mescolare gli ingredienti, eccetto l'uovo e il verde malachite, scaldando a sufficienza per sciogliere l'agar-agar. Raffreddare a 56 °C e aggiungere 6 tuorli d'uovo e il verde malachite. Distribuire in provette con tappo a vite e far coagulare a becco di clarino (*slant*) a 85 °C per 2 ore

Kirchner
Brodo usato per isolamento e antibiogramma

Peptone 0.5, L-asparagina 5.0, solfato di magnesio 0.6, glicerolo 20 ml, potassio fosfato monobasico 2.0, sodio fosfato bibasico 7.5, sodio citrato 2.5, rosso fenolo 0.1, siero di vitello 100 ml
Supplemento antibiotico: polimixina B 40.000 U.I., anfotericina B 0.1, carbenicillina 0.02, trimethoprim 0.002
pH finale = 7.4 ± 0.2

IUTM
International United Tuberculosis Medium, terreno di uso generale contenente uovo

Potassio fosfato monobasico 4, magnesio solfato 0.4, L-asparagina 1, glicerina 20 ml, acqua distillata 1000 ml
Sterilizzare a 100 °C per 2 ore.
Previa accurata pulizia, si pongono delle uova (9-10) per 30 minuti in soluzione al 5% di carbonato di sodio più sapone, quindi si lavano in acqua fino a che siano completamente limpide.
Si rompono le uova e si getta in un matraccio sterile il contenuto, che viene agitato e filtrato su garza, in modo da ottenere circa 335 ml di liquido.
Si aggiungono 200 ml di soluzione di sali minerali e 6,6 ml di una soluzione di verde malachite al 2%.
Il terreno completo, distribuito in provette a 5-6 ml per provetta, viene fatto coagulare a 85 °C per 45 minuti in posizione inclinata a becco di clarino (*slant*).

Löwenstein-Jensen
Terreno all'uovo di uso generale

Potassio fosfato monobasico 2.5, magnesio solfato 0.24, sodio citrato 0.6, L-asparagina 3.6, amido di patata 30, verde malachite 0.4
Sospendere 37.3 g di polvere in 600 ml di acqua distillata con 12 ml di glicerolo. Scaldare in bagnomaria bollente e portare ad ebollizione. Autoclavare a 121 °C per 15 minuti e raffreddare a circa 50 °C.
Aggiungere 1000 ml di uova intere, aperte asetticamente ed omogeneizzate. Distribuire in provette con tappo a vite e coagulare a 85 °C per 45 minuti in posizione inclinata per ottenere il becco di clarino (*slant*).

MacConkey Agar senza cv (cristalvioletto)
Terreno per prove biochimiche

Peptone di carne 17, polipeptone 3, lattosio 10, sali biliari 1.5, sodio cloruro 5, rosso neutro 0.03, agar-agar 13.5, acqua distillata 1000 ml
pH finale = 7.1 ± 0.2
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Middlebrook 7-H-9 Broth
Brodo di coltura - Terreno selettivo liquido per l'isolamento dei micobatteri

Potassio fosfato monobasico 1, sodio fosfato bibasico 2,5, glutammato monosodico 0,5, sodio citrato 0,1, ammonio solfato 0,5, piridossina 0,001, ferro ammonio citrato 0,04, magnesio solfato 0,05, zinco solfato 0,001, rame solfato 0,001, biotina 0,5 mg, calcio cloruro 0,5 mg, destrosio 2 g, glicerolo 2 ml, acqua distillata 900 ml
pH finale = 6,6 ± 0,2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti, raffreddare a circa 50 °C e aggiungere sterilmente 100 ml di arricchimento ADC (sodio cloruro 0,85 g, albumina bovina 5 g, destrosio 2 g, catalasi 3 mg)

Middlebrook 7-H-10 Agar
Terreno selettivo solido in provetta per l'isolamento dei micobatteri

Magnesio solfato 0,05, ferro ammonio citrato 0,04, sodio citrato 0,4, ammonio solfato 0,5, glutammato monosodico 0,5, sodio fosfato bibasico 1,5, potassio fosfato monobasico 1,5, agar-agar 13,5, piridossina 1 mg, zinco solfato 1 mg, rame solfato 1 mg, biotina 0,5 mg, calcio cloruro 0,5 mg, verde malachite 0,25 mg, glicerolo 5 ml, acqua distillata 900 ml
pH finale = 6,6 ± 0,2
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti, raffreddare a circa 50 °C ed aggiungere sterilmente 100 ml di arricchimento OADC (sodio cloruro 0,85 g, destrosio 2 g, albumina bovina 5 g, catalasi 3 mg, acido oleico 0,06 ml)

Middlebrook 7-H-11 Agar
Terreno selettivo in provetta per l'isolamento dei micobatteri tubercolari

Digerito di caseina 1 g, magnesio solfato 0,05 g, ferro ammonio citrato ico 0,04 g, sodio citrato 0,4 g, ammonio solfato 0,5 g, glutammato monosodico 0,5 g, sodio fosfato bibasico 1,5 g, potassio fosfato monobasico 1,5 g, agar-agar 13,5 g, sodio cloruro 0,85 g, piridossina 1 mg, zinco solfato 1 mg, rame solfato 1 mg, biotina 0,5 mg, calcio cloruro 0,5 mg, verde malachite 0,25 mg, glicerina 5 ml, acqua distillata 900 ml
pH finale = 6,6 ± 0,2
Autoclavare a 121 °C per 10 minuti, raffreddare a circa 50 °C e aggiungere sterilmente 100 ml di arricchimento OADC (contenente sodio cloruro 0,85 g, destrosio 2 g, albumina bovina 5 g, catalasi 3 mg, acido oleico 0,06 ml

Ogawa
Terreno di coltura tamponato acido, simile a quello di Lowenstein-Jensen, ma privo di asparagina

Potassio fosfato monobasico 2, magnesio citrato 0.1, sodio glutammato 0.5, glicerolo 4 ml, acqua distillata 100 ml, uovo intero omogeneizzato 200 ml, verde malachite 2% soluzione acquosa 4 ml
pH finale = 6.4
Sciogliere gli ingredienti in acqua distillata e far bollire per 30 minuti. Raffreddare a temperatura ambiente ed aggiungere l'uovo omogeneizzato e la soluzione di verde malachite. Distribuire in provette a 6 ml e far coagulare a 85 °C per 45 minuti.

Petragnani
Terreno all'uovo di uso generale

Latte fresco 150 ml, fecola di patata 6, peptone 1, patata (sbucciata e tagliata in pezzi) 1. Far bollire in bagnomaria agitando per i primi 10 minuti. Lasciar riposare un'ora in bagnomaria. Raffreddare a 45 °C e aggiungere il contenuto di 4 uova più il tuorlo di un quinto uovo, per un totale di circa 200 ml di uovo. Agitare per omogeneizzare e filtrare su garza sterile entro un matraccio. Aggiungere il 3% di glicerina neutra e il 4% di una soluzione acquosa al 2% di verde malachite. Mescolare e distribuire in provette in modo da formare uno *slant.* Coagulare per 30 minuti a 80-85 °C in coagulatore.

Petroff
Terreno di uso generale per micobatteri

Carne bovina tritata 500, soluzione di glicerina al 15% ml 500. Far macerare in frigorifero per 24 ore, quindi filtrare il liquido su garza sterile per ricavare un infuso di carne glicerinato.
Lavare le uova necessarie per ottenere circa 900 ml di prodotto. Immergere le uova in alcool a 70° per 10 minuti, quindi aprirle sterilmente, raccogliendo il contenuto in un matraccio sterile. Omogeneizzare e unire l'uovo all'infuso, nelle proporzioni di 100 ml di infuso contro 200 ml di uovo. Aggiungere ml 3 di violetto di genziana in soluzione all'1% in alcool 95°. Mescolare e distribuire in provette in modo da ottenere uno *slant*. Far coagulare a 85 °C per 30 minuti il primo giorno e nei due giorni successivi a 75 °C per 30 minuti.

Proskauer-Beck
Terreno di uso generale per micobatteri

L-asparagina 5, potassio fosfato monobasico 5, potassio solfato 5, glicerolo 20 ml, acqua distillata 930 ml, magnesio citrato 1.5, siero equino sterile 50 ml
Sciogliere a parte l'asparagina in poca acqua scaldando fino a soluzione limpida. Sciogliere separatamente gli altri ingredienti e aggiungerli all'asparagina sciolta, tranne il magnesio citrato. Mescolare. Aggiustare il pH a 7.0 ± 0.2 con NaOH 10N. Aggiungere il magnesio citrato.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 20 minuti. Distribuire sterilmente in provette

Stonebrink
Terreno di uso generale per micobatteri

Sodio piruvato 5, potassio fosfato monobasico 2, sodio fosfato monobasico 10, cristalvioletto 100 mg, verde malachite 800 mg, acqua distillata 400 ml, uova 800 ml
Mescolare sodio piruvato e potassio fosfato in 300 ml di acqua distillata fino a completo scioglimento. Aggiungere sodio fosfato fino a pH 6.5. Mescolare verde malachite e cristalvioletto in 100 ml di acqua distillata. Autoclavare a 121 °C per 20 minuti e, dopo raffreddamento a temperatura ambiente, aggiungere la miscela di coloranti.
Le uova (circa 20 per ottenere 800 ml) vanno lavate con alcool e aperte con forbici e guanti sterili, raccogliendone il contenuto in un matraccio mediante imbuto coperto da garza. Dopo miscelazione con la soluzione di sali e coloranti, il terreno, distribuito in provette con tappo a vite, va coagulato in posizione inclinata per 40 minuti a 80 °C

Controlli di qualità dei terreni e dei reagenti più usati

Nome	Parametro	Incubazione	Ceppi di controllo	Reazioni caratteristiche/Note
Löwenstein - Jensen	Fertilità	37 ± 2 °C, fino a 21 gg., aerobiosi	*Mycobacterium bovis* ATCC 19210	//
	Selettività	37 ± 2 °C, fino a 21 gg., aerobiosi	*Escherichia coli* ATCC 25922	Parziale inibizione; controllo in parallelo con coltura in BHI agar siero
Middlebrook 7H10 agar	Fertilità	37 ± 2 °C, fino a 21 gg., aerobiosi	*Mycobacterium bovis* ATCC 19210	//
Middlebrook 7H9 brodo	Fertilità	37 ± 2 °C, fino a 21 gg., aerobiosi	*Mycobacterium bovis* ATCC 19210	//
Stonebrink	Fertilità	37 ± 2 °C, fino a 21 gg., aerobiosi	*Mycobacterium bovis* ATCC 19210	//
	Selettività	37 ± 2 °C, fino a 21 gg., aerobiosi	*Escherichia coli* ATCC 25922	//
Brodo ureasi	Fertilità	37 ± 2 °C, 3 gg, aerobiosi	*Mycobacterium kansasii* ATCC 12478 *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841	Reazione positiva: viraggio al rosso porpora-violetto
		37 ± 2 °C, 3 gg, aerobiosi	*Mycobacterium bovis* ATCC 19210	Reazione intermedia: debole viraggio al rosso porpora (confronto con terreno non inoculato)
		37 ± 2 °C, 3 gg, aerobiosi	*Mycobacterium avium* ATCC 25291	Reazione negativa: assenza viraggio al rosso porpora (confronto con terreno non inoculato)
Reattivi nitrati micobatteri		37 ± 2 °C, 2 ore, aerobiosi	*Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841	Reazione positiva: viraggio al rosso porpora o assenza di viraggio anche dopo aggiunta di polvere di zinco
		37 ± 2 °C, 2 ore, aerobiosi	*Mycobacterium avium* ATCC 25291	Reazione negativa: assenza di viraggio al rosso porpora che compare dopo aggiunta di polvere di zinco
Reattivo tellurito micobatteri		37 ± 2 °C, 4 gg., aerobiosi	*Mycobacterium avium* ATCC 25291	Reazione positiva: comparsa di abbondante precipitato nero lucente (dopo aggiunta del reattivo a 5 ml di terreno Middlebrook 7H9 incubato a 37 ± 2 °C, 7-15 giorni, aerobiosi)
		37 ± 2 °C, 4 gg., aerobiosi	*Mycobacterium bovis* ATCC 19210	Reazione intermedia: comparsa di scarso precipitato nero lucente (dopo aggiunta del reattivo a 5 ml di terreno Middlebrook 7H9 incubato a 37 ± 2 °C, 7-15 giorni, aerobiosi)
		37 ± 2 °C, 4 gg., aerobiosi	*Mycobacterium kansasii* ATCC 12478	Reazione negativa: assenza di precipitato nero lucente (dopo aggiunta del reattivo a 5 ml di terreno Middlebrook 7H9 incubato a 37 ± 2 °C, 7-15 giorni, aerobiosi)
Reattivi pirazinamidasi		37 ± 2 °C, fino a 7 giorni, aerobiosi	*Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841	Reazione positiva: viraggio al rosa - rosa pallido (banda nell'agar)
		37 ± 2 °C, fino a 10 giorni, aerobiosi	*Mycobacterium bovis* ATCC 19210	Reazione negativa: assenza di viraggio

Nome	Parametro	Incubazione	Ceppi di controllo	Reazioni caratteristiche/Note
Reattivi arilsulfatasi		37 ± 2 °C, 3 giorni, aerobiosi	*Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841	Reazione positiva: viraggio al rosa pallido - rosso intenso
		37 ± 2 °C, fino a 14 giorni, aerobiosi	*Mycobacterium avium* ATCC 25291	Reazione negativa: assenza di viraggio
Reattivi catalasi termostabile		68 ± 1 °C, 20 minuti	*Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841	Reazione positiva: comparsa di bollicine alla superficie del liquido
		68 ± 1 °C, 20 minuti	*Mycobacterium bovis* ATCC 19210	Reazione negativa: mancata comparsa di bollicine alla superficie del liquido
Reattivo idrolisi Tween 80		37 ± 2 °C, fino a 10 giorni, aerobiosi	*Mycobacterium kansasii* ATCC 12478	Reazione positiva: viraggio del colore del substrato al rosa - rosso
		37 ± 2 °C, fino a 10 giorni, aerobiosi	*Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841 *Mycobacterium avium* ATCC 25291	Reazione negativa: nessun viraggio del colore del substrato
Reattivi niacina			*Mycobacterium tuberculosis* ATCC 27294	Prova positiva: viraggio immediato, o nel giro di alcuni minuti, al colore giallo
			Mycobacterium avium ATCC 25291	Prova negativa: assenza di viraggio
Reattivo utilizzazione del ferro			*Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841	Prova positiva: colonie marrone – ruggine con chiarificazione del terreno
			Mycobacterium bovis ATCC 19210	Prova negativa: colonie non pigmentate
Middlebrook 7H10 agar + T2H	Fertilità	37 ± 2 °C, 21 giorni, aerobiosi	*Mycobacterium kansasii* ATCC 12478	
	Selettività	37 ± 2 °C, 21 giorni, aerobiosi	*Mycobacterium bovis* ATCC 19210	
MacConkey Agar senza CV	Fertilità	37 ± 2 °C, 10 giorni, aerobiosi	*Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841	
	Selettività	37 ± 2 °C, 10 giorni, aerobiosi	*Mycobacterium kansasii* ATCC 12478	
Löwenstein – Jensen + 5% NaCl	Fertilità	37 ± 2 °C, 28 – 42 giorni, aerobiosi	*Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841	
	Selettività	37 ± 2 °C, 28 – 42 giorni, aerobiosi	*Mycobacterium kansasii* ATCC 12478	

Soluzioni

Alcool etilico a diverse gradazioni. Preparazione a partire da alcool a 95°.

Per ottenere alcool a →	90°	70°	50°
ml di acqua distillata da aggiungere a 100 ml di alcool a 95° →	5,5	35,7	90,0

Torbidimetria

Il metodo di misurazione più economico si serve del torbidimetro di McFarland, costituito da una serie di provette contenenti una soluzione di solfato di bario a diverse concentrazioni.

Ad esempio, la provetta contraddistinta dal numero 0,5 contiene 0,5 ml di una soluzione di cloruro di bario ($BaCl_2 . 2H_2O$) all'1,175% miscelati con 99,5 ml di acido solforico all'1%.

Questa preparazione, sigillata per evitare l'evaporazione, è conservabile per almeno sei mesi al buio a temperatura ambiente e va agitata prima dell'uso.

Il confronto fra lo *standard* ed il campione va fatto usando provette dello stesso calibro.

L'accuratezza della lettura col torbidimetro di McFarland può essere verificata misurando l'assorbanza (reciproco della densità ottica) con uno spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 625 nm, entro una cuvetta dello spessore di 1 cm.

Tubo McFarland	**Densità approssimativa dei batteri (in milioni/ml)**	**Densità ottica (D.O.) leggibile allo spettrofotometro a 625 nm con cuvetta da 1 cm**
0,5	>300*	0,08 – 0,1
1	300	0,16 – 0,2
2	600	0,32 – 0,4
3	900	0,48 – 0,6
4	1200	0,64 – 0,8
5	1500	0,8 - 1

*concentrazione *standard* del torbidimetro McFarland 0,5 = approssimativamente fra 10^7 e 10^8 CFU/ml

Determinazione del peso secco in una coltura batterica

Il peso di una coltura può essere determinato, se si parte da *slant*, sospendendo i batteri in 2 ml di soluzione fisiologica sterile (o trasferendo 2 ml di brodocoltura) entro un tubo di Fitch-Hopkins, da centrifugare a 2350 rpm per 20 minuti.

L'altezza della colonna di batteri sedimentati può essere misurata per confronto con la scala impressa nella parte inferiore dei tubi, graduata in mg/ml.

BIBLIOGRAFIA

1) Agnetti F., Zanoni R.G., Florio D., Latini M., Manuali E., Caffara M., Campo Dall'Orto B., Ghittino C., Fioravanti M.L. & Prearo M., Segnalazione di infezione da *Mycobacterium marinum* in spigole d'allevamento, Atti del XII Convegno Nazionale S.I.P.I., 29-30 Settembre – 1 Ottobre 2005, Cesenatico (FC), 23

2) Amerio P., Carmenini S., De Mori F. & Santone R., Micobatteriosi atipica da *Mycobacterium marinum*, Gior. Ital. Dermatol. Venereol. 1990, *125*, 147-149

3) Andrejew R., Attività catalasica dei micobatteri tubercolari, Ann. Inst. Pasteur 1962, 201-215

4) Andrejew R., Attività catalasica dei micobatteri tubercolari, Ann. Inst. Pasteur 1964, 503-518

5) Ang P. *e Coll.*, Retrospective study of *Mycobacterium marinum* skin infections, Int. J. Dermatol. 2008, *39*, 343-347

6) Argueta C. *e Coll.*, Isolation and identification of nontuberculous mycobacteria from foods as possible exposure sources, J. Food Protect. 2000, *63*, 930-933

7) Arrigoni N., Alborali L., Bertoletti I., Boldini M., Fabbi M., Invernizzi A., Lesini I., Luini M., Monaci C., Rosignoli C., Sacchi C., Tamba M., Belletti G.L., Survey on paratuberculosis prevalence in dairy herds of the Lombardia Region, J. Italian Assoc. Buiatrics 2006, *1*, 7-11

8) Aubry A. *e Coll.*, Antibiotic susceptibility pattern of *Mycobacterium marinum*, Antimicr. Agents Chemoth. 2000, *44*, 3133-3136

9) Austin B. & Austin D.B., Bacterial fish pathogens disease in farmed and wild fish, Ellis Horwood, Chicherster, England, 1993

10) Bailey e Scott, Diagnostic Microbiology, Elsevier, London, 1965

11) Beam R.E. *e Coll.*, Stimulatory effect of carbon dioxide on the primary isolation of tubercle bacilli on agar containing medium, Amer. J. Clin. Pathol. 1968, *50*, 395-397

12) Beard P. Henderson D., Daniel M.J., Pieir A., Buxton D., Grieg A., Hutchings M.R., McKendrick I., Rhind S., Stevenson K., Sharp J.M., Evidence of paratuberculosis in fox (*Vulpes vulpes*) and stoat (*Mustela* erminea), Vet. Rec. 1999, *145*, 612-613

13) Belletti G.L. e Zavanella M., L'esame colturale delle feci per la diagnosi di paratubercolosi, Sel. Vet. 1987, *28*, 891-896

14) Belloli A., Belletti G.L., Agosti M., Pozza O., Greppi G., Arrigoni N., Proverbio D., Avezza F., Chemioprofilassi nell'infezione sperimentale da *Mycobacterium paratuberculosis*, Atti Soc. It. Scienze Veterinarie 1990, *44*, 1413-1417

15) Biberstein E.L. *e Coll.*, Review of Veterinary Microbiology, Blackwell, Boston, USA, 1990

16) Blacklock Z.M. e Coll., *Mycobacterium asiaticum* as a potential pulmonary pathogen for humans. A clinical and bacteriological review of five cases, Amer. Rev. Respir. Dis. 1983, *127*, 241-244

17) Blasi A., Azione antimicobatterica in vitro dell'Isoxyl, Riv. Pat. Clin. Tuberc. 1964, *8*, 37

18) Bloch H., Studies on the virulence of tubercle bacilli: relationship of the physiological state of the organisms to their virulence, J. exp Med. 1950, *92*, 507

19) Bollo E., Ferroglio E., Dini V., Mignone W., Biollatti B., Rossi L., Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in lymph nodes of wild boar (*Sus scrofa*) by a target-amplified test system, J. Vet. Med. 2000, *47*, 337-342

20) Bollo E., Ferroglio E., La tubercolosi negli animali selvatici, Obiettivi e Documenti Veterinari 2002, *23*, 57-67

21) Bönicke R., Die differenzierung humaner and boviner Tuberkelbakterien mit Hilfe von Tiophen-2-carbonsäure-hydrazid, Naturwissenschaften 1958, *46*, 392

22) Boyd A.E. *e Coll.*, Limited added value of T-SPOT, Tb Blood Test in diagnosis active Tb. A prospective Bayesian, I. Inf. 2011, *62*, 456-461

23) Bozzetta E., Prearo M., Penati V., Pungkachonboon T. & Ghittino C., Isolamento e tipizzazione di micobatteri in pesci tropicali d'allevamento, Boll. Soc. It. Patol. Ittica 1995, *16*, 13-21

24) Bracco Lab. Ricerca - Ind. Chimica, Milano, Azione antitubercolare in vitro della piazofolina (morfazinamide), Min. Medica 1962, *44*, 1704

25) Brady J.G. *e Coll.*, Detection of mycobacterial infections using the Dieterle stain, Pediatric Developm. Path. 1998, *1*, 309-313

26) Brown-Elliott B. *e Coll.*, Comparison of in vitro activities of gatifloxacin and ciprofloxacin against four taxa of rapid growing Mycobacteria, Antimicr. Agents Chemoth. 2002, *46*, 3283-3285

27) Bruno D.W., Griffiths J., Mitchell C.G., Wood B.P., Fletcher Z.J., Drobniewski F.A. & Hastings T.S., Pathology attributed to *Mycobacterium chelonae* infection among farmed and laboratoryinfected Atlantic salmon *Salmo salar*, Dis. Aquat. Org. 1998, *33*, 101-109

28) Bull T.J. *e Coll.*, Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and witout Crohn's disease, J. Clin. Microbiol. 2003, *41,* 2915-2923

29) Cappa V., Calamari L., Belletti G.L., Arrigoni N., Zanardelli M., *Performances* e profilo metabolico in bovine con infezione subclinica da *Mycobacterium paratuberculosis*, Atti Società Italiana Buiatria, vol. XXI, Gardone Riviera (BS), 12-14 maggio 1989

30) Cappelletti C., Trattato di botanica, UTET, Torino, 1959

31) Caroli G. *e Coll.*, Osservazione sulla fluorescenza primaria di colture di micobatteri patogeni e saprofiti, Ann. Sclavo 1966, *8*, 52-61

32) Carson L.A. *e Coll.*, Growth characteristics of atipical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants, Appl. Environm. Microbiol. 1978, *36*, 839-846

33) Casal M.J. *e Coll.*, In vitro susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium africanum, Mycobacterium bovis, Mycobacterium avium, Mycobacterium fortuitum*, and *Mycobacterium chelonae* to ticarcillin in combination with clavulanic acid, Antimicr. Agents Chemoth. 1987, *31*, 132-133

34) Cattaneo C., Il comportamento dei micobatteri anonimi nelle prove di laboratorio in vitro, Giorn. Mal. Inf. Parass. 1963, *15*, 729

35) Chairholder G.L. *e Coll.*, Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae and other aerobic Actinomycetes; approved standard, NCCLS vol. 23, number 18, 2000

36) Chamberlin W.M., Naser S.A., Integrating theories of the etiology of Crohn's disease. On the etiology of Crohn's disease: questioning the hypotheses, Med. Sci. Monit. 2006, *12*, 27-33

37) Chee C. *e Coll.*, Latent tuberculosis infection treatment and T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* specific antigens, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2007, *175*, 282-287

38) Chiodini R.J., Van Kruiningen H.J., Merkal R.S., Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects, Cornell Vet. 1984, *74*, 218-262

39) Chiodini R.J., Van Kruiningen H.J., Merkal R.S., Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects, Cornell Vet. 1984, *74*, 218-262

40) Clifton-Hadley R. S., Wilesmith J.W., Richards M. S., Upton P., Johnston S., The occurrence of *M. bovis* infection in cattle in and around area subject to extensive badger *(Meles meles*) control, Epid. Inf. 1995, *114*,179-193

41) Cloud, J. L. H Neal, R. Rosenberry, C. Y. Turenne, M. Jama, D. R. Hillyard, and K. C. Carroll, Identification of *Mycobacterium* spp. by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries, J. Clin. Microbiol. 2002, *40*, 400-406

42) Collins M.T., *Mycobacterium pseudotuberculosis*: a potential food-borne pathogen?, J. Dairy Sci. 1997, *80*, 3445-3448, da Sel. Vet. 1999, 366-368

43) Collins M. D.M., Gabric D.M., De Lisle G.W., Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*, FEMS Microbiol. Lett. 1989, *209*, 267-271

44) Cooke M. M., Buddle B. M., Aldwell F. E., McMurray D. N., Alley M. R., The pathogenesis of experimental endo-bronchial *M. bovis* infection in brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*), New Zeal. Vet. J. 1999, *47*, 187-192

45) Corner L.A. *e Coll.*, Identification of *Mycobacterium bovis* isolates using a monoclonal antibody, Vet. Microbiol. 1988, *18*, 191-196

46) Cornil V., Megnin P., Tubercolose et diphetherie des gallinaces, CR Soc. Biol. 1884, *36*, 617-621

47) Corper H.J. *e Coll.*, Oxalic acid as a reagent for isolating tubercle bacilli and a study of the growth of acid-fast nonpathogens on different mediums with their reactions to chemical reagents, J. Lab. Clin. Med. 1930, *15*, 348-369

48) Cossu D. *e Coll.*, Association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with multiple sclerosis in Sardinian patients, PloS ONE 2011, *6*, e18482

49) Cottral G.E., Manual of standardized methods in veterinary microbiology, Cornell University Press, London, 1978

50) Cousins D.V., Whittington R., Marsh I., Masters A., Evans R.J., Kluver P., Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable by IS900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis, Mol. Cell. Probes 1999, *13*, 431-442

51) Covert T.C. *e Coll.*, Occurrence of nontuberculous Mycobacteria in environmental samples, Appl. Environm. Microb. 1999, *65*, 2492-2496

52) Coyle M.B. *e Coll.*, Laboratory aspects of "*Mycobacterium genavense*" , a proposed species isolated from AIDS patients, J. Clin. Microbiol. 1992, *30*, 3206-3212

53) Crump J.A. *e Coll.*, Invasive disease caused by nontuberculous mycobacteria,Tanzania, Emerging Inf. Dis. 2009, *15*, 53-55

54) Daniel T.M., The rapid diagnosis of Tuberculosis: a selective review, J. Lab. Clin. Med. 1990, *116*, 277-282

55) Davis D.E.,, *Mycobacterium tuberculosis*: a renewed challenge for the clinical microbiology laboratory, Clin. Micr. Newsl. 1992, *14*, 97-100

56) Davis B.D. – Dulbecco R., Trattato di Microbiologia, Piccin, Padova, 1981

57) De Lisle G. W., Mackintosh G. C., Bengins R. C., *M. bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer, Rev. Scient. Techn. OIE 2001, *20*, 86-111

58) De Ritis F., Patologia extra-polmonare da micobatteri tubercolari atipici, Giorn. Mal. Inf. Parass., 1963, *15*, 702

59) Dent C.H.R., Austr. Vet. J. 1985, *62*, 171, da Sel. Vet. 1986. *27*, 1198-1199

60) Dey B.P., Mycobacterioses in swine and their significance to public health, USDA, Beltsville, Maryland (USA), 1986

61) Dirksen G. Gründer H-D, Stöber M.: Medicina Interna e chirurgia del bovino. Ed. Italiana a cura di G. Sali, PVI ed., 2004

62) Dodiuk-Gad R. *e Coll.*, Nontubercolous mycobacterial infections of the skin. A retrospective study of 25 cases, J. Am. Acad. Dermatol. 2007, *57*, 413-420

63) Dorset M., The use of eggs as a medium for the cultivation of *Bacillus tuberculosis*, Am. Med. 1902, *3*, 555-556

64) Dubos R.J. *e Coll.*, Am. Rev. Tuberc. 1948, *58*, 698

65) Durnez L., Sadiki H., Katakweba A., Machang'u R.R., Karzwala R.R., Leirs H., Portaels F., The prevalence of *Mycobacterium bovis*-infection and atypical mycobacterioses in cattle in and around Morogoro, Tanzania. Trop. Anim. Health Prod. 2009, *41* 1635

66) Dvorska L. *e Coll.*, Isolation of *Rhodococcus equi* and atypical mycobacteria from lymph nodes of pigs and cattle in herds with the occurrence of tubercoloid gross changes in the Czech Republic over the period 1996-1998, Veterinarni Med. 1999, *44*, 321-330

67) Eddyani M. *e Coll.*, Potential role for fish in transmission of *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer): an environmental study, Appl. Environm. Microbiol. 2004, *70*, 5679-5681

68) Egamberdiyeva D., The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils, Applied Soil Ecology 2007, *36*, 184-189

69) Eltholth M.M., Marsh V.R., Van Winden S., Guitian F.J., Contamination of food products with *Mycobacterium avium paratuberculosis*: a sistematic review, J. Appl. Microb. 2009,*107*, 1061-1071

70) Englund S., Bolske G., Johansson K.E., An IS900-like sequence found in *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, FEMS Microbiol. Lett. 2002, *209*, 267-271

71) Erlich H., Am. Rev. Resp. Dis. 1960, *81*, 218

72) Falkinham J.O. *e Coll*., *Mycobacterium avium* in a shower linked to pulmonary disease, J. Water Health 2008, *6*, 209-213

73) Farina R. *e Coll*., Trattato di malattie infettive degli animali, UTET, Torino, 1995

74) Feller M., Huwiler K., Stephan R., Altpeter E., Shang A., Furrer H., Pfyffer G.E., Jemmi T., Baumgartner A., Egger M., *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect. Dis. 2007, *7*, 606-613

75) Ferroglio E., Rossi L., Brevi note informative sulla tubercolosi nel cinghiale e in altri mammiferi selvatici, Med .Vet. Prev. 1996, *12*, 8-9

76) Field K. *e Coll*., Lung disease due to more common nontubercolous Mycobacteria, CHEST 2006, *129*, 1653-1672

77) Fischeder R. *e Coll*., Occurrence of *Mycobacteria* in drinking water samples, Zbl. Hyg. 1991, *192*, 154-158

78) Florio D., Lozito P., Fioravanti M.L., Prearo M. & Zanoni R.G., Micobatteriosi nei pesci ornamentali d'importazione, Boll. Soc. It. Patol. Ittica 2003, *38*, 28-35

79) Francis-Floyd R. *e Coll*., Mycobacteriosis in fish, Fact Sheet VM-96, Univ. of Florida, 2002, *http:/edis.ifas.ufl.edu*.

80) Frerichs G.N., Mycobacteriosis and nocardiosis. In: Inglis V., Roberts R.I. & Bromage N.R.. "Bacterial Disease of Fish". Blackwell Scientific Pubblication, Oxford., UK., 1993, 219-233

81) Freudenberger R.S. *e Coll*., Cutaneous infection with rapidly-growing mycobacterial infection following heart transplant: a case report and review of the literature, Transplant Proc. 2006, *38*, 1526-1529

82) Gallo J.A.G., Veita F., Remon S., Delgado y.L., Micobacterias aisladas de bovinos que reaccionaron a las pruebas tuberculinicas. Rev. Cub. Cienc. Vet. 1983,*14*, 173

83) Gastambide-Odier M., Différentiation des espèces pathogènes de mycobactéries, Ann. Inst. Pasteur 1974, *72*, 221-237

84) Gastinel P., Infezione tubercolare sperimentale nella cavia, Précis de bactériologie médicale, Masson ed., Parigi, 1957

85) Gavaudan S., Bartolini C., Crotti S., DeCurtis M., Duranti A., Mancini P., Cagiola M., Barboni C.R., Micci E., Fisichella S., Mattozzi M., Foglini A., Tuberculosis in wild boar in Marche Region: cases report, *abstract* Atti VII th Conference of the European Wildlife Disease Association, 27-30 sept. 2006, Aosta, pag.53

86) Geoenendaal H., Nielen M., Jalvingh A.W., Horst S.H., Galligan D.T., Hesselink J.W., A simulation of Johne's disease control. Prev. Vet. Med. 2002, *54*, 225-245

87) Gerlach H., Bacteria. In: Ritchie B., Harrison G., Harrison L., Avian Medicine : Principles and applications. Brentwood, TN, HBD Intl. 1999, pp 949-983

88) Gerle H., Prakt. Tierarztl. 1975, *56*, 107, da Sel. Vet. 1975, *16*, 327

89) Ghittino Tecnologia e patologia in acquacoltura, Tip. Bono, Torino, 1985

90) Ghittino P.,Tecnologia e patologia in acquacoltura, vol. II – Patologia, ed. Bono, Torino,1985*,* 444 pp.

91) Ghozlan H.A., Utilization of beet molasses for riboflavin production by *Mycobacterium phlei*, J. Basic Microbiol. 1994, *34*, 157-162

92) Giavenni R., Micobatteri: un pericolo per i pesci ma anche per l'uomo, Aquarium 1981*,* *10*, 534-539

93) Giese S.B.., Ahrens P., Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture, Vet. Microbiol. 2000, *77*, 291-297

94) Gilmour N.J.L., Vet. Rec. 1976, *99*, 433-434, cit. da Zavanella *e Coll*. (1984)

95) Golan L. *e Coll*., *Mycobacterium avium paratuberculosis* invades human small-intestinal goblet cells and elicits inflammation, J. Inf. Dis. 2009, *199*, 350-354

96) Goudswaard J. *e Coll*., Vet. Rec. 1976, *98*, 461-462, cit. da Zavanella *e Coll*. (1984)

97) Grant I.R., Williams A.G., Rowe M.T., Muir D.D., Efficacy of various pasteurisation time-temperaure conditions in combination with homogenenisation on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. Appl. Environ. Microbiol. 2005, *71*, 2853-2861

98) Green E.P., Tizard M.L., Moss M.T., Thompson J., Winterborne D.J., McFadden J.J., Hermon-Taylor J., Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Croh's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*, FEMS Microbiol. Lett. 1089, *209*, 267-271

99) Greig A., Stevenson K., Henderson D., Perez V., Hugues V., Pavlik I., Hines M.E., McKendrick I., Sharp J.M., Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. J. Clin. Micorb. 1999, *37*, 1646-1751

100) Griffith D.E. *e Coll*., An officiale ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases, Am. J. Resp. Crit. Care Med. 2007, *175*, 367-416

101) Griffith D.E., Nontuberculous mycobacterial lung disease, Curr. Opinion Inf. Dis. 2010, *23*, 185-190

102) Guadagnini P.F. *e Coll*., Tubercolosi nei suini, un problema emergente. Diagnostica e prime misure di intervento in un focolaio d'infezione, Atti XXI Meeting SIPAS, Montichiari (BS), 3-4 marzo 1994

103) Hammer P., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk: risk considerations, Kieler Milchscheftl. Foschungsberichte 2008, *59*, 209-225

104) Hauduroy P., Un nouveau group de Mycobactéries: les Mycobactéries anormales, Ann. Inst. Pasteur 1955, *89*, 673

105) Henderson H.M., *Mycobacterium avium-intracellulare*, Curr. Opinion Inf. Dis. 1994, *7*, 225-230 da Sel. Vet. 1995, *36*, 744-746

106) Henry J.B., Diagnosi clinica e metodi di laboratorio , Delfino ed., Roma, 1996

107) Hilborn E.D. *e Coll.*, Persistence of nontubercolous mycobacteria in a drinking water system after addition of filtration treatment, Appl. Environm. Micr. 2006, *72*, 5864-5869

108) Hines N. *e Coll.*, Comparison of the recovery of *Mycobacterium bovis* isolates using the BACTEC MGIT, BACTEC 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11 solid media, J. Diagn. Invest. 2006, *18*, 243-250

109) Ho M.H. *e Coll.*, Atypical mycobacterial cutaneous infections in Hong Kong: 10-year retrospective study, Hong Kong Med. J. 2006, *12*, 21-26

110) Hole N.H. *e Coll.*, Vet. Rec. 1959, *71*, 1145-1149, cit. da Zavanella *e Coll.* (1984)

111) Holland S.M., Nontubercolous mycobacteria, Am. J. Med. Sci. 2001, *321*, 49-55

112) Hoop R.K., Böttger E.C., Ossent P., Salfinger M., Mycobacteriosis due to *Mycobacterium genavense* in six pet birds, J. Clin. Microbiol. 1993, *31*, 990-993

113) Hoop R.K., Böttger E.C., Pfyffer G.E., Etiological agents of mycobacterioses in pet birds between 1986 and 1995, J. Clin. Microbiol. 1996, *34*, 991-992

114) Horsburgh C.R. *e Coll.*, Environmental risk factors for acquisition of *Mycobacterium avium* complex in persons with human immunodeficiency virus infection, J. Inf. Dis. 1994, *170*, 362-367

115) Horsburgh C.R., Epidemiology of disease caused by nontubercolous mycobacteria, Semin. Respir. Infect. 1996, *11*, 244-251

116) Houlihan M., Isolation of *Mycobacterium kansasii* from calf reactors in a TB-restricted dairy herd, Vet. Rec. 2010, *166*, 272

117) Huda A., Jungersen G., Lind P., Longitudinal study of interferon-gamma, serum antibody and milk antibody responses in cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Vet. Microb. 2004, *104*, 43-53

118) Ichiyama S. *e Coll.*, The isolation of *Mycobacterium avium* complex from soil, water and dust, Microbiol. Immunol. 1988, *32*, 733-739

119) Inderlied C.B. *e Coll.*, The *Mycobacterium avium* complex, Clin. Microbiol. Rev 1993, *6*, 266-310, da Sel. Vet. 1994, *35*, 278-282

120) Inderlind C. *e Coll.*, Determination of *in vitro* susceptibility of *Mycobacterium avium* complex isolates to antimicrobial agents by various methods, Antimicr. Agents Chemoth. 1987, *31*, 1697-1702

121) Jemmi T. *e Coll.*, *Mycobacterium avium* a new emerging foodborne pathogen ? , MAN 1996, *14*, 283-288

122) Johne H.A., Frothingham L., Ein eigenthuemlicher Fall von Tuberkulose beim Rind, Dtsch. Ztschr. Tiermed. Path.1985, *21*, 438-454

123) Jones W.D. *e Coll.*, The use of MacConkey's agar for differential typing of *Mycobacterium fortuitum*, Am. J. Med. Technol. 1964, *30*, 187-195

124) Joubert L. *e Coll.*, Diagnostic differentiel bactério-immunologique des mycobactéries au laboratoire, Mycobacterioses 1975, *49-50*, 47-53

125) Jourmans G.A., Effetti della viomicina in vitro, Am. Rev. Tuberc. 1951, *25*, 63

126) Jubb T.F., Galvin J.W., Herd testing to control bovine Johne's disease. Proc.7th ICP, Melbourne, 14-18 febbraio 1999

127) Judge J., Greig A., Kyriazakis I., Hutchings M.R., Risk of inter-species *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* transmission from rabbit to livestock via the faecal-oral route, Proceedings of 8th ICP, 2005, 632-637

128) Karlson A.G., Acid-fast bacilli. The importance of their proper classification, Minnesota Med. 1958, *41*, 721

129) Kavaji S., Taylor D.L., Mori Y., Whittington R.J., Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture, Vet. Microb. 2007, *125*, 36-48

130) Kay M.K. *e Coll.*, Tatto-associated *Mycobacterium haemophilum* skin infection in immunocompetent adult, Emerg. Inf. Dis. 2011, *17*, 1734-1736

131) Kilburn J.O. *e Coll.*, Differential identification of Mycobacteria. V. The tellurite reduction test, Am. Rev. Resp. Dis. 1969, *99*, 94-100

132) Kirchner I., Zbl. Bakt. I. Orig. B 1929, *71*, 685

133) Klavonn W. *e Coll.*, Zur Eignung verschiedener kommerziell erhältlicher ELISA-Systeme für den Antikorpernachweis bei *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-ausschaidenden tieren, Tier. Umschau 2001, *56*, 648-654

134) Koehne G., Maddux R., Britt J., Rapidly growing Mycobacteria associated with bovine mastitis, Am. J. Vet. Res. 1981, *42*, 1238

135) Kohler H., Gierke F., Seidler T., Ziller M., Control of paratuberculosis by vaccination – a systematic reviw and meta-analysis, Proceedings of 8th ICP, Minneapolis (USA), 9-14 agosto 2009

136) Konemann E.W., Testo atlante di microbiologia diagnostica, 2a. ed. , Delfino, Roma, 1995

137) Konno K., Science 1956, *124*, 985

138) Koppers N. *e Coll.*, Aviare Mykobakteriose durch nicht identifizierbare Stamme, J. Vet. Med. 1991, *B38*, 3 -10

139) Krasnow I. *e Coll.*, Comparison of method for tuberculosis bacteriology, Appl. Micr. 1969, *18*, 915-917

140) Krishnaswami H. *e Coll.*, The role of Ziehl-Neelsen and fluorescent stains in tissue sections in the diagnosis of tuberculosis, Ind. J. Tub. 1969, *21*, 18-21

141) Kubica G.P. *e Coll.*, Laboratory methods for clinical and public health mycobacteriology, CDC, Atlanta, Georgia (USA), 1967

142) Kubica G.P. *e Coll.*, Studies on the catalase activity of acid-fast bacilli. 1. An attempt to soubgroup these organisms on the basis of their catalase activities at different temperatures and pH, Am. Rev. Resp. Dis. 1960, *81*, 387-391

143) Kubica G.P. *e Coll.*, The arylsulphatase activity of acid-fast bacilli. 3. Preliminary investigation of rapid growing acid-fast bacilli, Am. Rev. Resp. Dis. 1961, *83*, 737-740

144) Kullavaniyaja P. *e Coll.*, *Mycobacterium marinum* cutaneous infections acquired from occupations and hobbies, Int. J. Dermatol. 1993, *32*, 504-507

145) Kunimoto D.Y. *e Coll.*, Analysis of *Mycobacterium avium* complex isolates from blood samples of AIDS patients by pulsed-field gel electrophoresis, J. Clin. Microbiol. 2003, *41*, 498-499

146) La Placa M., Principi di microbiologia medica, Esculapio, Bologna, 1985

147) Labombardi V.J., Pseudo-outbreak of *Mycobacterium fortuitum* due to contaminated ice machines, Am. J. Inf. Control 2007, 30, 184-186

148) Lagadic M. *e Coll.*, Techniques de culture de *Mycobacterium paratuberculosis*, Rev. Med. Vet. 1983, *159*, 801

149) Lansdell W., Dixon B., Smith N. & Benjamin L., Isolation of several *Mycobacterium* species from fish, J. Aquat. Anim. Health 1993, *5*, 73-76

150) Larsen A.B. *e Coll.*, Susceptibility of horses to *Mycobacterium paratuberculosis*, Am. J. Vet. Res. 1972,33, 2185-2189

151) Larsen A.B. *e Coll.*, Susceptibility of the lemming to *Mycobacterium paratuberculosis*, Am. J. Vet. Res. 1979, *40*, 1657

152) Le Dantec C. *e Coll.*, Chlorine disinfection of atipical mycobacteria from a water distribution system, Appl. Environm. Microbiol. 2002, *68*, 1025-1032

153) Lee A. *e Coll.*, Identification of non-tubercolous mycobacteria: utility of the GenoType Mycobacterium CM/AS assay compared with HPLC and 16S rRNA gene sequencing, J. Med. Microbiol. 2009, *58*, 900-904

154) Lennette E.H. *e Coll.*, Manual of clinical microbiology, 2nd ed. ASM, 1974, Washington, USA

155) Lennette E.H. *e Coll.*, Manual of clinical microbiology, 3rd ed. ASM, 1974, Washington, USA, 1980

156) Lennox A.M., Mycobacteriosis in companion psittacine birds: a review, J. Avian Med. Surg. 2007, *21*, 181-187

157) Lescenko P., Maltova L., Dvorska L., Bartos M., Vavra O., Navratil S., Novotny L. & Pavlik I., Mycobacterial infection in aquarium fish, Vet. Med. Czech. 2003*, 48*, 71-78

158) Lesslie I.W., Birn K.J., Tuberculosis in cattle caused by the avian type tubercle bacillus, Vet. Rec. 1967, *80*, 559

159) Lewis F.M. *e Coll.*, Fish tank exposure and cutaneous infections due to *Mycobacterium marinum*: tuberculin skin testing, treatment, and prevention, Clin. Inf. Dis. 2003, *37*, 390-397

160) Lillini E., Bitonti G., Gamberale F., Cersini A., Prevalence of bovine paratuberculosis in the Latium region (Italy), pagg. 638-644, 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen, 14-18 august 2005

161) Lucchesi M., Il comportamento dei micobatteri anonimi nella patologia sperimentale, Giorn. Mal. Inf. Parass. 1963, *15*, 739

162) Luetkemeyer A. *e Coll.*, Comparison of an interferon-γ release assay with tuberculin skin testing in HIV infected individuals, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2007, *175*, 737-742

163) Lui G., Interferon gamma release assay for differentiating tuberculosis among pneumonia cases in acute healthcare setting, J. Inf. 2011, *62*, 440-447

164) Magnusson M., Specificity of micobacyerial sensitins. i. Studies on guinea pigs with purified "tuberculin" prepared from mammalian and avian tubercle bacilli, *Mycobacterium balnei* and other acid-fast bacilli, Amer. Rev. Resp. Dis. 1961, *83*, 57-68

165) Malkin J. *e Coll.*, Olecranon bursitis secondary to *Mycobacterium kansasii* infection in a patient receiving infliximab for Behçet's disease, J. Med. Microbiol. 2009, *58*, 371-373

166) Mandler F., Osservazioni sulle anomalie dei micobatteri isolati dall'uomo, Giorn. Mal. Inf. Parass. 1963, *15*, 743

167) Mantovani G., Ispezione degli alimenti di origine animale, UTET, Torino, 1961

168) Marchandin H. *e Coll.*, Pacemaker surgical site infection caused by *Mycobacterium goodii*, J. Med. Microbiol. 2009, *58*, 517-520

169) Mariani B., Micobatteriosi broncopolmonare da ceppi cosiddetti atipici od anonimi, Giorn. Mal. Inf. Parass. 1963, *15*, 718

170) Mariani B., Potere patogeno sperimentale sulla cavia e sul topo, Giorn. Mal. Inf. Parass 1964, *16,* 18

171) Marks J., A new practical classification of the *Mycobacteria*, J. Med. Micr. 1976, *9*, 253-261

172) Marusic A. *e Coll.*, *Mycobacterium xenopi* pulmonary disease. Epidemiology and clinical features in non-immunocompromised patients, J. Inf. 2009, *58*, 108-112

173) McCorry T.P., McCormick C.M., Hughes M.S., Pollock J.M., Neill S.D., *Mycobacterium non chromogenicum* in nasal mucus from cattle in a herd infected with bovine tuberculosis, Vet. Microbiol. 2004, *99*, 281

174) Mediel M.J. *e Coll.*, Isolation of *Mycobacteria* from frozen fish destined for human consumption, Appl. Environm. Microbiol. 2000, *66*, 3637-3638

175) Merkal R.S. *e Coll.*, A new mycobactin, mycobactin J, from *Mycobacterium paratuberculosis*, Current Microbiol. 1982, *7*, 333-335

176) Merkal R.S., Diagnostic methods for detection of paratuberculosis (Johne's disease). Proc. 74th meeting U.S. Annual Health Ass., 1970

177) Merkal R.S., Paratuberculosis: advances in cultural, serologic and vaccination methods, J.A.V.M.A. 1984, *184*, 939

178) Meyer B. *e Coll.*, Efficacy of glucoprotamin containing disinfectants against different species of atypical mycobacteria, J. Hosp. Infect. 1999, *42*, 151-154

179) Michel A.L., *Mycobacterium fortuitum* infection interference with *Mycobacterium bovis* diagnostics: natural infection cases and pilot experimental infection, J. Vet. Diagn. Invest. 2008, *20*, 501

180) Middlebrook G. *e Coll.*, Virulence and morphological characteristics of mammalian tubercle bacilli, J. exp. Med. 1947, *86*, 175

181) Middlebrook G. *e Coll.*, J. Exp. Med. 1957, *86*, 175

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

183) Mijs W., De Haas P., Rossau R., Van der Laan T., Rigouts L., Portaels F., Van Soolingen D., Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and '*M. avium* subsp. *hominissuis*' for the human/porcine type of *M. avium*, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002, 52,1505-1518

184) Miller N. *e Coll.*, Evaluation of Gen-Probe *Mycobacterium tuberculosis* direct test and PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens, J. Clin. Microbiol. 1994, *32*, 393

185) Mishina D. *e Coll.*, On the etiology of Crohn's disease, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, *93*, 9816-9820

186) Mohney L.L., Poulus B.T., Brooker J.H., Cage G.D. & Lightner D.V., Isolation and identification of *Mycobacterium peregrinum* from the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*, J. Aquat. Anim. Health 1998, *10*, 83-88

187) Moore D.A. *e Coll.*, Microscopic observation drug susceptibility assay, a rapid, reliable diagnostic test for multidrug resistant tuberculosis suitable for use in resource poor settings, J. Clin. Microbiol. 2004, *42*, 4432-4437

188) Motarjemi Y. *e Coll.*, Emerging foodborne pathogens, Woodhead, Cambridge, UK, 2006

189) Moyle A.I., Culture and cell procedure for control of paratuberculosis, J.A.V.M.A. 1975, *166*, 689

190) Nakhjavani F.A. *e Coll.*, Direct detection of *Mycobacterium* sp in respiratory specimen with rpoB-PCR and comparison with concentration fluorochrome staining, Res. J. Med. Sci. 2006, *1*, 68-71

191) Naser S. *e Coll.*, Culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease, Lancet 2004, *364*, 1039-1044

192) Nash K.A. *e Coll.*, Intrinsic macrolide resistance in rapidly growing *Mycobacteria*, Antimicr. Agents Chemoth. 2006, *50*, 3476-3478

193) Nassal J., Recenti vedute sulla tubercolosi aviare, Zbl. Vet. Med. 1963, *10*, 209 da Sel. Vet. 1963, *4*, 459-460

194) Nauta M.J. *e Coll.*, Human exposure to *Mycobacterium paratuberculosis* via pasteurized milk: a modelling approach, Vet. rec. 1998, *143*, 293-296 da Sel. Vet. 1999, 442-444

195) Nenoff P. *e Coll.*, Mycobacteriosis in mangrove killifish (*Rivulus magdalenae*) caused by living fish food (*Tubifex tubifex*) infected with *Mycobacterium marinum*, Dtsch. Tierarztl. Wchschr. 2006, *113*, 230-232

196) Nielsen S.S., Toft N., A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe, Prev. Vet. Med. 2009, *88*, 1-14

197) Nielsen S.S., Toft N., Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-γ assay and faecal culture techniques. Vet. Microbiol. 2008, *129*, 217-235

198) Nielsen S.S., Toft N., Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-γ assay and faecal culture techniques, Vet. Microb. 2008, *129*, 217-235

199) Noga E.J., Fish Disease. Diagnosis and treatment, Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, Missouri, 1996, 340 pp.

200) OIE Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals, ed. 2008, Chapter 2.1.11: Paratuberculosis (Johne's disease)

201) Oudar J. *e Coll.*, Rev. path. gén. comp. 1966, *66*, 477, da Sel. Vet. 1967, *8*, 12-13

202) Pacciarini M.L., Boniotti B., Zanoni M.G., Alborali G.L., Tagliabue S., Sala G., Gaffuri A., Rilevamento di micobatteri *Mycobacterium tuberculosis* complex in popolazioni di cinghiale (*Sus scrofa*) in Lombardia, L'Osservatorio 2006, *9*, 14-15

203) Pagnier I. *e Coll.*, Emerging *Mycobacteria spp.* in cooling towers, Emerging Inf. Dis. 2009, *15*, 121-122

204) Parent L.J., Salam M.M., Appelbaum P.C. & Dossee J.H., Disseminated *Mycobacterium marinum* infection and bacteriemia in a child with severe combined immunodeficiency, Clin. Infect. Dis. 1995, *21*, 1325-1327

205) Parodi A. *e Coll.*, Micobatteri nei carnivori: epidemiologia della tubercolosi nel cane e nel gatto, Rec. Med. Vet. 1965, *141*, 421 da Sel. Vet. 1977, *7*, 77-81

206) Parra A. *e Coll.*, Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections of pigs and wild boars using a molecular approach, Vet. Microbiol. 2003, *97*, 123-133

207) Pavlik L. *e Coll.*, Mycobacterial infections in cattle and pigs caused by *Mycobacterium avium* complex members and atypical mycobacteria in the Czech Republic during 2000, Veterinarni Med. 2005, *50*, 281-290

208) Pelczar M., Microbiology, Tata, New Delhi, 1977

209) Petricevic S. *e Coll.*, Veterinarski Glasnik 1977, *31*, 247 da Sel. Vet. 1980, *21*, 118-119

210) Petroff S.A., Some cultural studies on the tubercle bacillus, Bull. John Hopkins Hosp. 1915, 276-279

211) PHLS, Anonymous Mycobacteria in England and Wales – I. Prevalence and methods of identification, Tubercle 1962, *43*, 432-438

212) Pozniak A. *e Coll.*, Recently recognized Mycobacteria of cinical significance, J. Inf. 1999, *38*, 157-161

213) Prearo M., Campo Dall'Orto B., Penati V., Pavoletti E., Locatelli L., Panzieri C. & Ghittino C., Micobatteriosi ittiche, patologie emergenti e dominanti in pesci ornamentali, Boll. Soc. It. Patol. Ittica 2004, *39*, 18-29

214) Prearo M., Giorgi I., Pezzolato M., Gasparri F., Audino V., Varello K. & Bozzetta E., Infezione da *Mycobacterium marinum* in persico spigola (*Morone chrysops x M. saxatilis*) d'allevamento, Atti del XIV Convegno Nazionale S.I.P.I. Castiglione della Pescaia (GR), 15-16 novembre 2007, 13

215) Prearo M., Latini M., Proietti M., Mazzone P., Campo Dall'Orto B., Penati V. & Ghittino C., Casi di micobatteriosi nei pesci rossi d'acquario, Boll. Soc. It. Patol. Ittica 2002, *33*, 30-43

216) Prince K.A. *e Coll.*, Isolation of *Mycobacterium gordonae* from poultry slaughterhouse water in Sao Paulo State, Brazil, Rev. Argent. Microbiol. 2005, *37*, 106-108

217) Proskauer B. *e Coll.*, Beitrag zur Ernährugs physiologie der Tuberkelbazillen, Zeitschr. Hyg. 1894, 18, 128-152

218) Pund R. *e Coll.*, Contamination of fishery products with mycobacteria, Arch. Lebens. 2008, *59*, 185-191

219) Qudar J. *e Coll.*, Bull. Soc. Sci. Vet. Med. Comp. Lyon 1968, *70*, 121, da Sel. Vet. 1970, *11*, 412-413

220) Rankin J.D. in Meissner G., Mykobacterien und mikobakterielle Krankheiten, Fischer Verlag, Jena, 1970, 323-354

221) Rastogi N. *e Coll.*, In vitro activity of roxythromycin against 16 species of atypical Mycobacteria and effect of pH on its radiometric MICs, Antimicr. Agents Chemoth. 1993, *37*, 1560-1562

222) Rastogi N., Legrand E., Sola C., The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis, Rev. Scient. Techn. OIE 2001, *20*, 21-54

223) Ratnamohan T.N. *e Coll.*, A technique for the purification of *Mycobacterium paratuberculosis* from the ileal mucosa of infected cattle, Austral. Vet. J. 1986, *63*, 185

224) Reisner B.S. *e Coll.*, Use of Gen-Probe Accuprobes to identify *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium gordonae* directly from BACTEC TB broth cultures, J. Clin. Microbiol. 1994, *32*, 2995

225) Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare SANCO/B3/R16/2000, adopted 21 march 2000, Possible links between Crohn's disease and Paratuberculosis resistance to disinfectants, Appl. Environm. Microbiol. 1978, *36*, 839-846

226) Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977, *74*, 5463-5467

227) Reuss V. *e Coll.*, Berl. Munch. Tier. Wschr. 1968, *81*, 400, da Sel. Vet. 1970, *11*, 164

228) Richards W.D. *e Coll.*, Mycobacterial agglutination-inhibition test, Appl. Micr. 1972, *24*, 318-322

229) Ricken K.H. *e Coll.*, Tierarztl. Praxis 1977, *5*, 115 da Sel. Vet. 1979, *20*, 992-993

230) Ristola M.A., Von Reyn C.F., Arbeit R.D., Soini H., Lumio J., Ranki A., Buhler S., Waddell R., Tosteson A.N.A., Falkinham J.O. & Sox C.H., High rates of disseminated infection due to non-tuberculous mycobacteria among AIDS patients in Finland, J. Infect. 1999, *39*, 61-67

231) Robbi C., Rossi I., Nardelli S., Marangon S., Vincenzi G., Vicenzoni G., Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in dairy farms in north eastern Italy, pagg. 457-460, 7th International Colloquium on Paratuberculosis, Bilbao 11-14 june 2002

232) Roberts R.J., Patologia dei pesci, Edizioni Agricole Calderini, Bologna, Italia, 1990

233) Rosu V., Ahmed N., Paccagnini D., Gerlach G., Fadda G., Hasnain S., Zanetti S., Sechi S., Specific immunoassays confirm associ ation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with Type-1 but not Type-2 diabetes mellitus, PLoS ONE 2009, *4*, 1-10

234) Runyon E.H. *e Coll*., Distinguishing Mycobacteria by the niacin test, Amer. Rev. Tuberc. 1959, *79*, 663-665

235) Runyon E.H. *e Coll*., in Lennette E.H. *e Coll*. (1980)

236) Runyon E.H., Meeting Nat. Tuberc. Ass., Kansas City, Mai 1957

237) Salogni C., Cervellione F., Zanoni M., Gelmetti D., Alborali G.L. (2008), Descrizione di un focolaio di micobatteriosi da *Mycobacterium marinum* in trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) caratterizzato da elevata mortalità, Atti XIV Convegno Nazionale S.I.P.I., Erice (TP), 22-24 Ottobre 2008, 29

238) Salogni C., Zanoni M., , Tagliabue S., Pacciarini M.L., Giovannini S., Alborali G.L., Isolamento di *Mycobacterium marinum* da lesioni granulomatose in carpe (*Cyprinus carpio*) da ripopolamento, Ittiopatologia 2009, *6*, 43-50

239) Salogni C., Zanoni M., Covi M., Pacciarini M.L. & Alborali G.L. (2007), Infezione da *Mycobacterium marinum*: descrizione di un focolaio di malattia in trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) e trota fario (*Salmo trutta*) d'allevamento, Ittiopatologia 2007, *4*, 227-237

240) Sauton B., Sur la nutrition minérale du bacille tuberculeux, C.R. Acad. Sc. 1912, *155*, 860-861

241) Schaefer W.B., Incidence of the serotypes of *Mycobacterium avium* and atipical mycobacteria in human and animal diseases, Amer. Rev. Resp. Dis. 1968, *97*, 18-23

242) Schalk, A.F. , Roderick L.M., Fousr H.L., Harshfield G.S., Avian tuberculosis: Collected studies, North Dakota Agric. Exp. Stn. Tech. Bull. 1935, 279

243) Schliesser T. *e Coll*., Arch. Lebens. 1970, *21*, 84, da Sel. Vet. 1971, *12*, 61

244) Schliesser T., Schweizer Arch. Tierheilk. 1968, *111*, 328, da Sel. Vet. 1969, *10*, 650-651

245) Schliesser T., Weber A., Studies on the tenacity of *Mycobacteria* of the Runyon Group III in sawdust litter, Zentralbl. Veterinarmed. B 1973, 20, 710-714

246) Schreiber S., Rosenstiel P., Albrecht M., Hampe J., Krawczak M., Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease, Nat. Rev. Genet. 2005, *6*, 376-388

247) Schweiger O. *e Coll*., Am. Rev. Tuberc. 1958, *77*, 146

248) September S.M. *e Coll.*, Diversity of nontuberculoid *Mycobacterium* species in biofilms of urban and suburban drinking water distribution systems, Appl. Environm. Microb. 2004, *70*, 7571-7573

249) Serraino A., Marchetti G., Sanguinetti V., Rossi M. C., Zanoni M. G., Catozzi L., Bandiera A., Dini W., Mignone W., Pranzetti F., Gori A., Monitoring of trasmission of tuberculosis between wild boars and cattle: genotypical analysis of strains by molecular epidemiology techniques, J. Clin. Microbiol. 1999, *37*, 2766-2771

250) Seth M. *e Coll.*, Biomarker discovery in subclinical infections of cattle, PlosONE 2009, *4*, 5478

251) Sherman D.M. *e Coll.*, Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle, JAVMA 1984, *185*, 179-182

252) Shih J.Y. *e Coll.*, Nontubercolous mycobacterial isolates : clinical significance and disease spectrum, J. Formos. Med. Assoc. 1997, *96*, 621-627

253) Shimizu K. *e Coll.*, Slowly growing scotochromogenic Mycobacteria isolated from a bovine nodular thelitis lesion, Japan J. Microbiol. 1974, *18*, 269-261

254) Shin S.J. *e Coll.*, New method for reduction in bacterial contamination rate of fecal cultures for *M. paratuberculosis*, 5th Int. Symp. W.A.V.L.D., Guelph, Canada, 1989

255) Spagnolo N. *e Coll.*, Frequenza di micobatteri non-tubercolari in campioni clinici, Igiene Moderna 1988, *90*, 676-685

256) Steingart K. *e Coll.*, A systematic review of commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis, Thorax 2007, *62*, 911-918

257) Stevenson K. *e Coll.*, Occurrence of *Mycobacterium paratuberculosis* across host species and european countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants, BMC Microbiology 2009 (*in press*)

258) Stevenson K., Alvarez J., Bakker D., Biet F., De Juan L., Denham S., Dimareli Z., Dohmann K., Gerlach G.F., Heron I., Kopecna M., May L., Pavlik I., Sharp J.M., Thibault V.C., Willemsen P., Zadoks R.N., Greig A., Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* across host species and european countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants, BMC Microb. 2010, *9*, 212

259) Stinear T. *e Coll.*, Identification of *Mycobacterium ulcerans* in the environment from regions in Southeast Australia in which it is endemic with sequence capture-PCR, Appl. Environm. Microb. 2000, *66*, 3206-3216

260) Streeter R.N. *e Coll.*, Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows, Am. J. Vet. Res. 1995, *56*, 1322-1324, da Sel. Vet. 1996, 422-423

261) Streeter R.N., Hoffsis G.B., Bech-Nielsen S., Shulaw W.P., Rings D.M., Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows, Am. J. Vet. Res.1995, *56*, 1322-1324

262) Sutton, JB., Gibbes H., Tuberculosis in bird, Transactions Pathological Society of London 1884, *35*, 477-481

263) Sweeney R.W., Paratuberculosis (Johne's disease). Vet. Clin. North Am.1996, *12*, 305-470

264) Sweeney R.W., Whitlock R.H., Hamir A.N., Rosenberger A.E., Herr S.A., Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected animals. Am. J. Vet. Res. 1992, *53*, 1312-1314

265) Sweeney R.W., Whitlock R.H., Hamir A.N., Rosenberger A.E., Herr S.A., Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected animals, Am. J. Vet. Res. 1992, *53*, 1312-1314

266) Taber R.A. *e Coll.*, *Mycobacterium scrofulaceum*: a bacterial contaminant in plant tissue culture, Plant Science 1991, *78*, 234-236

267) Tacquet A. *e Coll.*, L'utilisation de détergents pour l'isolement de mycobactéries à partir de produits pathologiques. Etude comparative. Applications pratiques, Ann. Inst. Pasteur Lille 1963, *16*, 21-30

268) Taddei R., Barbieri I., Pacciarini M.L., Fallacara F., Belletti G.L., Arrigoni N., *Mycobacterium porcinum* strains isolated from bovine bulk milk: implications for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection by PCR and culture, Vet. Microbiol. 2008, *130*, 338-347

269) Taddei R., Belletti G.L., Beltrami A., Tamba M., Arrigoni N., Ricerca di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) da feci bovine: confronto tra quattro differenti metodi PCR, pagg. 37-38, VIII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., Perugia, 9-10 novembre 2006

270) Tarshis M.S. *e Coll.*, Am. Rev. Tuberc. 1952, *65*, 278

271) Tarshis M.S., J. Lab. Clin. Med. 1959, *54*, 630

272) Tell L.A., Woods L., Cromie R.L., Mycobacteriosis in birds, Rev. Sci. Tech. 2001, *20*, 180-203

273) Thoen C.O. *e Coll.*, Micromethod for serotyping strains of *Mycobacterium avium*, J. Clin. Microbiol. 1975, *1*, 469-471

274) Thoen C.O. *e Coll.*, Rev. Inf. Dis. 1981, *3*, 960, da Sel. Vet. 1983, *24*, 904-906

275) Thomson J. R., Mollison N., Matthews K. P., An investigation of mastitis due to *S. agalactiae, S. uberis, M. smegmatis* in a herd, Vet. Rec. 1988, *122*, 271

276) Thorel M.F., La tuberculose et les mycobacterioses, Bull. Mens. Soc. Vet. Prat. Fr. 1994, *78*, 409-422, da Sel. Vet. 1995, *36*, 487-489

277) Thorel M.F., Taxonomic and genomic research on mycobactin-dependent mycobacteria. In: Paratuberculosis Diagnostic methods, their practical application and experience with vaccination. Proceedings of the Third International Colloquium on Paratuberculosis, International Association for Paratuberculosis, Orlando, Florida, USA, 225-235, 1991

278) Tison F. *e Coll.*, Récherche, isolement et étude du bacille tuberculeux et des autres mycobactéries en pratique courante, Crouan ed., Lille, 1072

279) Toda T.Y. *e Coll.*, A simple urease test for the classification of Mycobacteria, Amer. Rev. Resp. Dis. 1960, *83*, 757-761

280) Tortoli E. *e Coll.*, *Mycobacterium genavense* in AIDS patients, report of 24 cases in Italy and review of the literature, Eur. J. Epidemiol. 1998, *14*, 219-224

281) Tortoli E., Bartolini A., Bozzetta E., Burrini C., Lacchini C., Mantella A., Penati V., Simonetti M.T.& Ghittino C., Identification of the newly described *Mycobacterium poriferae* from tuberculosis lesions of snakehead fish (*Channa striatus*), Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 1996, *19*, 25-29

282) Truant A.L., Commercial Methods in clinical microbiology, ASM, Washington, USA, 2002

283) Twort e Ingram, cit. da Belletti e Zavanella, Sel Vet. 1987, *28*, 891-896

284) Twort F.W., Ingram G.L.Y., Further experiments with Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosae bovis johne, with vaccines prepared with this microorganism, Zentralbl. Bakt. Parasit. 1913, *B67*, 126-135

285) Viallier J. *e Coll*., Epidèmiologie des infections à mycobactéries atypiques, Pneum. Coeur 1972, *28*, 55-65, cit. da Shimizu *e Coll*. (1974)

286) Viallier J. *e Coll*., Isolement de mycobactéries atypiques à partir de ganglions de porc et de bovines presumes sains, Bull. Soc. Sci. Vet. Med. Comp. 1976, *78*, 273-276

287) Virtanen S., A study of nitrate reduction by Mycobacteria, Acta Tuberc. Scand. 1960, *48* suppl., 1-119

288) Wayne L.G. *e Coll*., Classification and identification of mycobacteria. I. Test employing Tween 80 as substrate, Am. Rev. Resp. Dis. 1964, *90*, 588-597

289) Wayne L.G. *e Coll*., Finding the "hidden positive" in tuberculosis eradication programs. The role of the sensitive trisodium-phosphate benzalkonium (Zephiran) culture technique, Amer. Rev. Resp. Dis. 1962, *86*, 537-541

290) Wetzstein M., Greenfield J., Mastitis caused by a *Mycobacterium sp*., Can. Vet. J. 1992, *33*, 826

291) Whipple D.L. *e Coll*., Modification in the technique cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*, Proc. Int. Coll. Res. Paratuberculosis, Ames, Iowa, 1983

292) Whitlock R.H., Wells S.J., Sweeney R.W., Tiem J. Van, ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method, Vet. Microbiol. 2000, *77*, 387-389

293) Whittington R.J., Windsor P.A., In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis, Vet. J. 2009, *179*, 60-69

294) Wilson Taylor A., Observations on the isolation of *M. johnei* in primary culture, J. Path. Bact. 1950, *62*, 647

295) Windsor P.A., Whittington R.J., Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease, Vet. J. 2009 *184*, 37-44

296) Winthrop K.L *e Coll*., Pulmonary disease associated with nontuberculous mycobacteria, Oregon, USA, Emerg. Inf. Dis. 2011, *17*, 1759-1761

297) Yachida S., Shimizu K., Hirose T., Sato M., Studies on mycobacteria isolated from skin lesion tuberculosis of the bovine udder, Jap. J. Vet. Sci. 1973, *35*, 357

298) Yorgensen B., Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry, Vet. Med. 1999, *29*, 267-270

299) Youmans G.P. *e Coll.*, Increase in resistance of tubercle bacilli to streptomycin: preliminary report. Proc. Staff Meet. Mayo Clin. 1946, *21*, 126-127

300) Zanoni R., Tecnica di fissaggio, inclusione in paraffina e colorazione ematossilina-eosina per esame istologico di organi, *com. pers.*, Padova, 1964

301) Zavanella M. *e Coll.*, Produzione e controllo di uno *standard* nazionale di tubercolina PPD bovina, Arch. Vet. It. 1972, *25*, 363-368

302) Zavanella M. *e Coll.*, *Test* diagnostici per la paratubercolosi bovina, Sel. Vet. 1984, *25*, 281-284

303) Zavanella M., Analisi critica dei metodi colturali, biochimici e biologici di differenziazione tra micobatteri tubercolari tipici e atipici (o anonimi). Ricerca su 50 stipiti di micobatteri tubercolari isolati dall'uomo, tesi di laurea in Scienze Biologiche, Università degli Studi di Padova, Istituto di Patologia Generale (Direttore: Prof. M. Aloisi, Relatore: Prof. M. Cappellato), Anno accademico 1964-65

304) Zorawski C. *e Coll.*, Bull. Vet. Inst. Pulavy 1972, *16*, 41-42, cit. da Zavanella *e Coll.* (1984)

305) Zorawski C. *e Coll.*, Properties of *Mycobacterium avium* and atypical mycobacteria isolated from animals in Poland, Med. Vet. Poland 1976, *32*, 661-664

Finito di stampare da

Tipografia Camuna S.p.A. - Breno (Bs)
Centro Stampa di Brescia

nel mese di gennaio 2012

Informazione ecologica:
pubblicazione stampata con assenza di esalazioni alcooliche
Sistema Cesius® brevetto **Philip Borman Italia**

ISBN 978-88-97562-03-0