



**SEZIONE DI
SALERNO**

S.S.18 Via delle Calabrie, 27 - 84132
Fuorni - Salerno

tel 089301833 - fax 089302699

CF 00292370632 PI 01239801218

*"Centro di Referenza Nazionale sull'igiene e le
tecnologie dell'allevamento e delle produzioni bufaline"*

REGIONE CAMPANIA

Prot. 2016. 0702419 27/10/2016 11,45

Mitt. : IZS SEZIONE DI SALERNO

Ass. : 520402 UOD Prevenzione e sanità pubbl...

Classifica : 20.1.19. Sottosec : 1-13 del 2011



p.c.

Giunta Regionale della Campania
Responsabile UOD Prevenzione e
Sanità Pubblica Veterinaria
Dr. Paolo Sarnelli

Direttore Generale IZSM
Dr. A. Limone
Sede

Direttore Sanitario IZSLER
Dr. G. Varisco
direzionesanitaria@izsler

Responsabile Centro di Referenza Nazionale
per la Tubercolosi da M. bovis
Dr.ssa Maria Pacciarini
maria.pacciarini@izsler

**Oggetto : Proposta di attività di approfondimento diagnostico sulla diagnosi di Tubercolosi
nella specie bufalina**

-Vista l'emissione del Decreto Dirigenziale n. 226 del 03/10/2016 riportante le Procedure
sull'applicazione della normativa comunitaria, nazionale e regionale per l'eradicazione della
tubercolosi bovina e bufalina;

-considerate le risultanze della riunione tenuta presso il Ministero della Salute in data 16 aprile
2016, in cui viene espresso parere favorevole all'utilizzo routinario della IDT comparativa nella
specie bufalina solo a seguito di studi di approfondimento della durata di almeno 24 mesi, e solo
dopo standardizzazione sul territorio delle operazioni di profilassi e delle operazioni al macello;

-sentito il Centro di Referenza Nazionale per la Tubercolosi da M.bovis sito presso l'IZSLER,
ed acquisita la disponibilità ad effettuare idonea formazione agli operatori di campo, con date da
concordare,

-condiviso quanto in allegato con la Direzione dell'Ente

si trasmette



**SEZIONE DI
SALERNO**

S.S.18 Via delle Calabrie, 27 - 84132

Fuorni - Salerno

tel 089301833 - fax 089302699

CF 00292370632 PI 01239801218

*"Centro di Referenza Nazionale sull'igiene e le
tecnologie dell'allevamento e delle produzioni bufaline"*

Giunta Regionale della Campania
Responsabile UOD Prevenzione e
Sanità Pubblica Veterinaria
Dr. Paolo Sarnelli

E p.c.

Direttore Generale IZSM
Dr. A. Limone
Sede

Direttore Sanitario IZSLER
Dr. G. Varisco
direzionesanitaria@izsler

Responsabile Centro di Referenza Nazionale
per la Tubercolosi da M. bovis
Dr.ssa Maria Pacciarini
maria.pacciarini@izsler

**Oggetto : Proposta di attività di approfondimento diagnostico sulla diagnosi di Tubercolosi
nella specie bufalina**

-Vista l'emissione del Decreto Dirigenziale n. 226 del 03/10/2016 riportante le Procedure
sull'applicazione della normativa comunitaria, nazionale e regionale per l'eradicazione della
tubercolosi bovina e bufalina;

-considerate le risultanze della riunione tenuta presso il Ministero della Salute in data 16 aprile
2016, in cui viene espresso parere favorevole all'utilizzo routinario della IDT comparativa nella
specie bufalina solo a seguito di studi di approfondimento della durata di almeno 24 mesi, e solo
dopo standardizzazione sul territorio delle operazioni di profilassi e delle operazioni al macello;

-sentito il Centro di Referenza Nazionale per la Tubercolosi da M.bovis sito presso l'IZSLER,
ed acquisita la disponibilità ad effettuare idonea formazione agli operatori di campo, con date da
concordare,

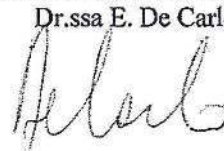
-condiviso quanto in allegato con la Direzione dell'Ente

si trasmette

una proposta di approfondimento diagnostico per la Tubercolosi nella specie bufalina, che prevede la collaborazione dell'IZS del Mezzogiorno e dell'IZS Lombardia ed Emilia Romagna, e si resta in attesa di un Suo riscontro.

Invio cordiali saluti

Il Responsabile Scientifico del CReNBuf
Dr.ssa E. De Carlo



TITOLO

Studio di approfondimento "Valutazione del test di intradermoreazione comparativo nella diagnosi della tubercolosi nel bufalo"

Responsabile: dott.ssa Esterina De Carlo, Dirigente Veterinario Responsabile del Centro di Referenza Nazionale sull'igiene e le tecnologie dell'allevamento e delle produzioni bufaline (CRenBuf)(IZSME).

Collaborazioni: dott.ssa Maria Pacciarini, Dirigente Biologo Responsabile del Centro di Referenza Nazionale per la Tubercolosi (CRN-TB) (IZSLER).

AREA DI INQUADRAMENTO:

Sanità Animale

DURATA:

24 mesi.

MOTIVAZIONI:

La tubercolosi bovina e bufalina (TB) è una patologia cronica a carattere zoonosico causata da *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) e *Mycobacterium caprae* (*M. caprae*) che determina gravi implicazioni di sanità pubblica e danni economici negli allevamenti colpiti.

Il controllo della tubercolosi nella specie bufalina è attualmente basato sull'identificazione degli animali infetti in vita attraverso il test dell'intradermoreazione (IDT) e conseguente abbattimento dei capi positivi e sul controllo, al macello, della presenza di lesioni compatibili alla TB.

La prova IDT prevede l'utilizzo dei derivati proteici purificati estratti da *M. bovis* (PPDB) e rappresenta un test diagnostico rapido, economico e con un buon rapporto tra costo ed efficienza del test, ma la sua specificità nel bufalo può essere compromessa da vari fattori, tra i quali il probabile contatto con micobatteri ambientali, considerata l'abitudine a rotolarsi nel fango, nonché conformazione, spessore e colore della cute, che richiedono particolare attenzione nell'esecuzione e interpretazione della prova.

La valutazione della reale specificità della prova IDT comparativa e/o della minore specificità della prova IDT singola, a causa di quanto detto sopra nonché a causa dell'applicazione di una prova biologica standardizzata in altra specie, ed in assenza di sufficienti studi a supporto effettuati nella specie bufalina, impongono ulteriori approfondimenti sia in campo che in laboratorio.

Su tali argomenti si è espresso anche il Ministero della Salute nell'ambito di una riunione avvenuta in data 16 aprile 2016, esprimendo parere favorevole all'utilizzo routinario della IDT comparativa nella specie solo a seguito di studi di approfondimento della durata di almeno 24 mesi, e solo dopo standardizzazione sul territorio delle operazioni di profilassi (inoculo e lettura della IDT singola e doppia), delle operazioni al macello atte a rilevare la presenza di lesioni e di prelievo dei campioni sia in soggetti con lesioni che in soggetti NVL, delle procedure di isolamento in laboratorio attraverso l'utilizzo di terreni liquidi e solidi e screening con test pcr. In ambito di tale riunione è stato peraltro previsto, su suggerimento della Commissione Europea, proprio al fine di espletare le giuste attività di ricerca e coordinare la standardizzazione delle procedure, che la prova comparativa venisse prevista solo nei casi di prima positività all'IDT singola e in presenza di personale



dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno e qualora necessario, del Centro di Riferenza Nazionale sulla tubercolosi dell'IZSLER.

L'adeguamento della normativa regionale alla normativa nazionale e europea, come richiesto dal Ministero della Salute in ambito della predetta riunione, ha condotto all'emanazione del Decreto Dirigenziale n. 226 del 03/10/2016 riportante le Procedure sull'applicazione della normativa comunitaria, nazionale e regionale per l'eradicazione della tubercolosi bovina e bufalina. In tale Decreto è stata pertanto prevista la presenza di personale dell'IZSM e, se necessario, del CRN per la Tubercolosi, sia durante l'esecuzione della IDT comparativa, sia al macello durante l'esame anatomopatologico e il prelievo degli organi. Le attività previste nel decreto permetteranno di effettuare, unitamente al coordinamento delle operazioni, anche i previsti rilevamenti d'ispezione di reazioni cutanee e lesioni, nonché il prelievo di materiale previsto per lo studio di approfondimento.

Conoscenze già disponibili

I metodi a disposizione per effettuare la diagnosi di tubercolosi bovina e bufalina sono suddivisibili in due grossi gruppi:

- Quelli utilizzati *in vivo*;
- Le prove di conferma *post-mortem*.

Tra queste ultime, il gold standard è l'esame microbiologico ovvero l'isolamento e l'identificazione dell'agente eziologico. A supporto dell'isolamento è possibile utilizzare anche altre tecniche, previste dalla normativa, che hanno tempi più rapidi di esecuzione.

I piani di profilassi si basano sull'utilizzo dei test *in vivo* per l'identificazione di animali positivi all'interno di una popolazione, poiché questo tipo di metodica rileva più precocemente i soggetti infetti in allevamento rispetto alla diagnosi *post mortem* al macello.

La diagnosi *in vivo*, pertanto, si basa principalmente sul rilievo della immunità cellulo-mediata.

La premessa fondamentale è che non esiste, per la diagnosi di tubercolosi, un test con Se (sensibilità) e Sp (specificità) del 100%, come peraltro per tutte le malattie infettive.

I test riconosciuti dalla normativa attuale, sono l'intradermoreazione (IDT), l'esame ispettivo al macello, esame microbiologico, che rappresenta l'esame di conferma di focolai, ed una serie di prove ancillari a supporto della diagnosi, quali la PCR, l'esame isto-patologico, (DM. 592/95-DLvo 196/99) ed il γ -IFN test, come prova supplementare prevista dal Reg.CE n° 1226 del 8-7-2002.

L'intradermoreazione singola è un ottimo screening di stalla e va sempre considerato come il test di riferimento, ma questa tecnica diagnostica non è priva d'inconvenienti dovuti alla soggettività dell'interpretazione del risultato, oltre a possibili false reazioni generate da fenomeni di iporeattività e para-eteroallergie.

In bibliografia, nel bovino, per la IDT singola viene riportata una Se media dall'80 al 91% ed una Sp media del 96,8%, mentre per il bufalo mediterraneo ci sono pochi ed inconsistenti lavori in letteratura.

L'intradermoreazione comparativa in Europa, pur essendo consigliata dalla norma solo in caso di prova inconclusiva con inoculo singolo, nel Regno Unito ed Irlanda è usata come test di screening per i piani di eradicazione.

L'intradermoreazione o "test intradermico" è un metodo riconosciuto a livello internazionale per la diagnosi, *in vivo*, della TB bovina. Questo test si basa su una risposta di ipersensibilità ritardata (tipo IV) all'iniezione intradermica di un estratto proteico proveniente dal surnatante di colture batteriche definite tubercoline.

La PPD, utilizzata per l'inoculo, rappresenta il complesso della frazione idrosolubile dei prodotti di crescita e di lisi di *M. bovis* sottoposti a trattamento termico. La tubercolina bovina attualmente in uso in molti paesi è una preparazione ottenuta con il ceppo di *M. bovis* AN5, selezionato per la sua crescita ottimale in vitro.

Allo stesso modo, la tubercolina aviaria (PPDA) si ottiene, da colture del ceppo di riferimento di *M. avium subsp. avium*.

Quando la tubercolina viene inoculata nel derma di un animale non sensibilizzato da antigeni tubercolinici, non vi è alcuna significativa risposta infiammatoria locale. Al contrario, se la PPD viene inoculata in un animale il cui sistema immunitario è stato sensibilizzato da una precedente contatto con *M. bovis* o dall'esposizione ad antigeni cross-reattivi, si innescava una risposta infiammatoria esuberante con conseguente gonfiore nel sito di inoculazione che raggiunge la sua massima intensità dopo 72 h e regredisce rapidamente. Questa reazione di ipersensibilità ritardata è mediata da una popolazione di cellule T sensibilizzate e ha bisogno di 2-3 settimane dopo l'infezione per potersi sviluppare.

I criteri di esecuzione e interpretazione della prova diagnostica sono descritti ampiamente in tutte le norme inerenti la profilassi della TBC, sia nazionali che comunitarie. Circa 72 ore dopo l'inoculazione, il sito di iniezione deve essere esaminato e palpato per evidenziare qualsiasi prova di infiammazione.

Il test IDT può essere effettuato nella cute della regione medio-cervicale (IDT cervicale) dell'animale. Oltre alla valutazione soggettiva, che prevede l'osservazione visiva e la palpazione del sito di iniezione, deve essere misurato lo spessore delle pieghe cutanee con un cutimetro a molla immediatamente prima dell'iniezione della tubercolina e rivalutato dopo 72 h (più o meno 4-6 h).

Il test intradermico comparativo richiede un tempo maggiore di esecuzione perché prevede l'iniezione simultanea di entrambe le tubercoline, bovina ed aviaria.

L'interpretazione della prova comparativa si basa sull'osservazione che bovini infetti da *M. bovis* tendono a mostrare una reattività più evidente con la tubercolina bovina rispetto alla tubercolina aviaria, mentre le infezioni con micobatteri atipici (MOTT) sono caratterizzate da una maggiore reattività nel punto di inoculo della PPD aviaria.

Il test comparativo, quindi, consente una discriminazione tra animali infetti con *M. bovis* e quelli sensibilizzati da altri microorganismi come *M. avium complex* o micobatteri ambientali.

In letteratura è descritto che la scelta del test singolo e di quello comparativo può avvenire in relazione alla prevalenza della tubercolosi nel territorio e alla presenza di altre fonti di sensibilizzazione come per esempio, i micobatteri ambientali. In Italia l'utilizzo della prova comparativa è limitato ad approfondimenti successivi, qualora si sospetti una reazione falsamente positiva per la presenza di *M. avium*, paratubercolosi o massive infestazioni parassitarie e comunque se la reazione viene pertanto considerata dubbia.

Il test γ -interferon (γ -IFN), sviluppato negli anni 90 da ricercatori australiani, è un metodo di diagnosi *in vivo* che si basa sullo stesso principio dell'intradermoreazione, ma viene eseguito *in vitro*. Viene utilizzato in alcune regioni d'Italia e in molti paesi Europei per il bovino, come previsto dal D.L.vo 196/99 e dal Reg.Cee 1226/02, ai fini dell'eradicazione in allevamenti infetti. Nella prova intradermica l'antigene (ossia la PPDB e la PPDA nella prova comparativa) viene inoculato nell'animale per via intradermica, viene quindi processato e presentato al linfocita T che, in un animale sensibilizzato, produce e richiama citochine infiammatorie: la reazione allergene e linfocita T sensibilizzato provoca infatti l'attivazione del linfocita stesso e quindi la liberazione di messaggeri intercellulari (le linfocine), che a loro volta inducono movimenti di cellule che

vengono richiamate e bloccate al sito di inoculazione. Dopo 72 ore (ipersensibilità ritardata) si rilevano le modificazioni indotte al sito di inoculazione.

Il γ -IFN test si basa sulla stessa reazione tra linfocita T sensibilizzato e l'antigene presentato, con la differenza che questa reazione avviene *in vitro*. L'avvenuta reazione e il conseguente rilascio di γ -IFN, una delle interleuchine liberate, viene rilevato con metodo immunoenzimatico ELISA.

Per quanto riguarda l'elaborazione del risultato se la stimolazione con PPDB ha indotto più produzione di γ -interferone, il campione si considera positivo per *M. bovis* e verosimilmente ciò significa che l'animale è affetto da tubercolosi. Invece, se è la PPDA che ha indotto più produzione di γ -interferone allora il campione viene definito *avian reactor*, ma ciò non significa necessariamente che l'animale abbia avuto contatto con *M. avium*, bensì che può aver avuto contatto con altri micobatteri (MOTT).

Il test γ -IFN può essere ripetuto senza vincoli temporali poiché, a differenza dell'intradermoreazione, non interferisce sul profilo immunitario dell'animale.

Si deve, comunque tener presente che i campioni di sangue devono essere prelevati almeno a distanza di 45-60 giorni dalla prova tubercolinica, per il condizionamento che quest'ultima può generare sul sistema immunitario e quindi sulle cellule coinvolte nel γ -IFN test.

Nella pratica l'adozione del test del γ -IFN necessita di un unico intervento sull'animale col prelievo di sangue venoso eparinizzato (almeno 10 ml), il quale dovrà essere lavorato entro 8 ore dal momento del prelievo, senza essere refrigerato né congelato.

Il γ -IFN test si basa su criteri interpretativi oggettivi e quindi è soggetto a controlli di qualità, a procedure standard, ed infine è in grado di fornire l'esito in tempi relativamente brevi (24 ore).

Inoltre ha il vantaggio di poter essere adattato alle caratteristiche epidemiologiche del territorio.

Tra gli svantaggi c'è il costo molto elevato.

Dalla bibliografia si deduce che la Se media si attesta intorno all' 87% e la Sp media al 96%.

Per quanto riguarda la tubercolosi nella specie bufalina, vari riferimenti bibliografici segnalano focolai di *M. bovis* in più parti del mondo: Italia, Argentina, India, Brasile a testimonianza della naturale sensibilità della specie a contrarre l'infezione e sviluppare la malattia. In Italia, è stato più volte isolato *M. caprae*.

Gli insediamenti bufalini sono concentrati principalmente nel meridione d'Italia, dove il risanamento della TB è ancora in corso.

Inoltre, la pratica di allevare bovino e bufalo, frequentemente in promiscuità, pratica per fortuna di minor utilizzo in regione Campania, nonché il fatto di utilizzare gli animali fino a tarda età, vista la peculiare caratteristica di insistere negli allevamenti dopo molti parti e in buono stato di salute, sono tutti fattori che influenzano negativamente l'eradicazione della TB in questa specie.

A questo bisogna aggiungere le difficoltà di campo nell'esecuzione e soprattutto nell'interpretazione della prova intradermica: studi compiuti sulla valutazione della IDT nel bufalo d'acqua, attraverso inoculazione cervicale, caudale e doppia inoculazione, lo riportano come test sensibile e specifico in misura variabile.

Il γ -IFN, che più studi confermano avere delle buone performance, soprattutto in termini di specificità nella specie bovina, si è già manifestato un valido aiuto nella diagnosi della TB anche nella specie bufalina. Il test è ormai validato per l'utilizzo nella specie.

Infine, studi recenti hanno dimostrato che il test sierologico ELISA multi-antigene mostra una buona specificità e sensibilità e che, quindi potrebbe essere usato come test complementare ai test basati sulla risposta cellulo-mediata per il rilevamento del maggior numero di animali infetti allo scopo di accelerare il risanamento aziendale e di individuare animali non reattivi alla IDT.

OBIETTIVI:

- 1) Formazione degli operatori Medici Veterinari che operano in Area A, addetti all'esecuzione dell'Intradermoreazione e in Area B, addetti all'esecuzione dell'esame anatomopatologico e al prelievo degli organi da inviare al laboratorio
- 2) Armonizzazione e standardizzazione delle procedure in allevamento
- 3) Armonizzazione e standardizzazione delle procedure al macello
- 4) Armonizzazione e standardizzazione dell'esecuzione di indagine epidemiologica con schede dedicate
- 5) Analisi delle categorie animali soggette a cross-reazione
- 6) Studio dell'immunità locale e generale causa dell'insorgenza di reazioni anomale
- 7) Studio sulla presenza di agenti causa di cross reazioni
- 8) Acquisizione dei diametri di reazione cutanea a seguito di inoculazione di PPD bovina e PPD aviare

RISULTATI ATTESI:

- 1) Implementazione della sensibilità dell'esame anatomopatologico al macello e della ripetibilità della prova nei diversi stabilimenti della Regione
- 2) Implementazione della specificità della prova Intradermica attraverso la definizione della pratica più efficiente nella specie bufalina, attraverso il raffronto delle diverse prove utilizzate con il gold standard rappresentato dalla prova culturale
- 3) Implementazione dell'accuratezza nel rilevamento dei dati epidemiologici e di biosicurezza negli allevamenti
- 4) Individuazione dei fattori critici causa di cross-reazione
- 5) Definizione della prova in vita più adeguata da applicare a tutta la specie bufalina

METODO E MATERIALI:

Durante le operazioni di inoculazione di IDT comparativa sui capi risultati già positivi o dubbi alla IDT singola, verrà effettuato un prelievo per:

- 1) prova del γ -IFN attraverso stimolazione con PPD bovina e Aviare (CrenBuf)
- 2) prova ELISA Multiplex per TBC, specifico per la specie bufalina (CRN-TB)
- 3) prova ELISA per ParaTBC.

I colleghi verranno supportati in una valutazione collegiale dello stato di salute dei capi inoculati e si procederà alla detersione approfondita della zona di inoculo, e alla successiva inoculazione di entrambe le PPD segnando la zona di inoculo. Tutte le operazioni verranno eseguite seguendo le linee guida già pubblicate per la specie bufalina, in una zona di inoculo di forma quadrangolare di 5-6 cm, tra terzo anteriore e terzo mediano del collo escludendo zone di sfregamento con collari, gabbie, etc. L'area dell'inoculo andrà tricotomizzata se necessario. Verrà redatta una scheda segnando l'età dell'animale, la fase produttiva, la distanza dal parto, il numero di parti e precedenti patologie.



Lo scopo dell'approfondimento è quello di valutare la presenza di reattività non specifiche in animali positivi o dubbi provenienti da allevamenti U.I., comparare la specificità del test IDT singolo e comparativo nella specie bufalina nonché identificare le possibili cause di reattività aspecifica.

In fase di lettura delle IDT, dopo 72 ore dall'inoculo, indipendentemente dalla reazione, verranno effettuati:

- 1) tamponi della cute per ricerca dei MOTT (CRN-TBC)
- 2) prelievo di un campione di feci per ricerca di MOTT e *M. avium* paratuberculosis (CRN-TBC)
- 3) aspirato del/dei ponfi per la ricerca di MiRna

In caso di positività al test IDT comparativo, gli animali saranno inviati al macello. Qui i soggetti saranno sottoposti ad un accurato esame anatomico-patologico dal veterinario ASL, affiancato da personale dell'IZSM, per evidenziare la presenza di lesioni TB specifiche.

Sia in caso di assenza di lesioni che in caso di accertamento macroscopico del granuloma tubercolare, si eseguiranno prelievi di tessuti (tonsille, linfonodi mandibolari, retrofaringei, mediastinici, peribronchiali, periepatici, mesenterici, sovramammari) oltre che delle eventuali lesioni riscontrate, secondo le linee guida specifiche per la specie bufalina.

I campioni saranno raccolti in contenitori sterili con l'indicazione del tipo di tessuto prelevato, e prontamente inviati all'IZSM e al CRN-TBC per l'esecuzione dell'esame batteriologico e PCR per la ricerca di *M. bovis*.

Un'aliquota dei suddetti campioni sarà raccolta durante l'esame anatomopatologico per le indagini istopatologiche, che saranno eseguite dal CRN-TBC.

A seguito di positività all'esame batteriologico, l'IZSM provvederà ad effettuare sopralluoghi congiunti all'ASL al fine di uniformare le procedure di rilevamento dei dati di biosicurezza da inserire nell'indagine epidemiologica. A tal fine verranno predisposte apposite schede di rilevamento dati.

La prova del γ -IFN verrà effettuata utilizzando:

- "Phosphate Buffered Saline" (PBS controllo negativo, senza antigeni);
- 30 μ g di PPDB e 30 μ g di PPDA Lelystad;
- 10 μ g di PPDB e 10 μ g di PPDA Italiane (prodotte presso l'IZS di Perugia);
- Antigeni ricombinanti (Cocktail peptidi Prionics e ricombinanti IZSLER)
- Mitogeno (PWM della Prionics) alla concentrazione finale di 1 mg/ml.

La rilevazione quantitativa di γ -IFN sarà effettuata con un test ELISA BOVIGAM® (life technologies) come previsto dal protocollo concordato tra CReNBuf e CRN-TBC e già validato e accreditato.

Il test ELISA Multiplex per il rilevamento di anticorpi anti-TB prevede l'analisi dei sieri con 4 diverse proteine ricombinanti (MPB70, MPB83, ESAT6 e CFP10) e con le tubercoline PPDB e PPDA. Il test verrà eseguito presso CRN-TBC.

Il test ELISA per paraTBC verrà eseguito con Kit IDVET e verrà eseguito presso l'IZSM.

L'esame batteriologico verrà eseguito presso l'IZSM e il CRN-TBC sia per il rilevamento di *M. bovis*/*M. caprae* che per MOTT su campioni di feci, tamponi cutanei, acqua e lettiera, linfonodi o altri organi raccolti al macello.

Nella fase finale del progetto si procederà alla raccolta dei dati definitivi, alla valutazione dei risultati della ricerca, e alla stesura della relazione finale del progetto.



Laddove i dati e le informazioni raccolte fossero ritenute adatte e sufficienti, i risultati della ricerca saranno divulgati attraverso la stesura di un protocollo per la diagnosi di TBC nella specie bufalina, pubblicazioni scientifiche, partecipazioni a congressi, organizzazione di seminari e incontri scientifici.

Attività di formazione

Tutte le attività dovranno essere precedute da specifica formazione dei Medici Veterinari operanti in regione, sia in area A che in Area B, al fine di armonizzare e standardizzare le procedure di inoculo e lettura, e dell'esame anatomopatologico e prelievo di organi. Le attività formative saranno organizzate con il supporto dell'IZS del Mezzogiorno e dell'IZSLER, sia con lezioni magistrali che di campo. Si prevede una lezione frontale dedicata all'Area A e una dedicata all'Area B. Lo stesso dicasi per le lezioni in campo, da concordare con L'IZSLER per la disponibilità dei giorni.

Pertanto nello svolgimento dello studio il CReNBuf svolgerà le seguenti attività:

- Coordinamento delle attività di prelievo nelle provincie coinvolte e organizzazione degli incontri periodici con il personale coinvolto e con il CRN-TBC
- Sopralluoghi negli allevamenti e nei macelli di pertinenza
- Esecuzione del test γ -IFN
- Esecuzione del test ELISA per paraTBC
- Esame dei miRNA sugli aspirati
- Stesura della relazione finale sui risultati ottenuti
- Attività di divulgazione dei dati ottenuti

La sede provinciale di Caserta svolgerà le seguenti attività:

- Sopralluoghi negli allevamenti e nei macelli di pertinenza
- Esecuzione del test ELISA per paraTBC
- Invio al CReNBuf dei sieri e dei restanti campioni da inviare al CRN-TBC per l'esecuzione del test ELISA e degli esami batteriologici
- Invio al CReNBuf dei prelievi ematici per la prova del γ -IFN

La sede di Portici svolgerà le seguenti attività:

- Esecuzione dell'esame batteriologico per M.bovis/caprae e preparazione dell'aliquota di omogenato per l'IZSLER
- Esame istopatologico: invio tessuto fissato in formalina tamponata 10%
- Sopralluoghi nei macelli di pertinenza, ove necessario
- Supporto alla formazione del territorio



Il CRN per la TBC dell'IZSLER svolgerà le seguenti attività:

- Formazione degli operatori del territorio con lezioni frontali e in campo;
 - Supporto nei macelli, ove necessario;
 - Supporto in campo nella lettura dei test di intradermoreazione, ove necessario;
 - Esecuzione del test Elisa per la rilevazione degli anticorpi anti-TB;
 - PCR ed esame microbiologico per la ricerca diretta di MTB complex e M. spp. da organi, tamponi e feci, campioni ambientali
-
- Genotipizzazione dei ceppi isolati
 - Esame istopatologico

Si chiederebbe il supporto Regionale al fine di contribuire nelle seguenti attività:

- Coordinamento delle attività sul territorio per l'esecuzione delle prove e dei prelievi previsti dal progetto ad opera di Medici Veterinari del Servizio Sanitario Nazionale attraverso la gestione dei flussi informativi tra territorio e IZSM
- Coordinamento delle attività formative
- Attività di divulgazione dei dati ottenuti



Per l'esecuzione del presente studio di approfondimento si prevede che vengano impiegate le risorse umane come di seguito riportate in tabella:

NOME	Laboratorio/Sezione di	QUALIFICA	Rapporto di lavoro	MESI UOMO
De Carlo Esterina	CRN igiene e tecnologie dell'allevamento e delle produzioni bufaline (CReNBuf)	Dirigente Veterinario	Dipendente	6
Martucciello Alessandra	U.O. Sierologia /CReNBuf)	Dirigente Veterinario	Dipendente	6
Fraulo Pasquale	U.O. Microbiologia degli Alimenti/CReNBuf)	Dirigente Veterinario	Dipendente	6
Viscito Anna	Laboratorio di sierologia / CReNBuf)	Tecnico di Laboratorio	Dipendente	6
De Donato Immacolata	Laboratorio di sierologia / CReNBuf)	Tecnico di Laboratorio	Dipendente	4
Pesce Antonella	Sezione di Caserta	Dirigente Veterinario	Dipendente	6
Garofalo Francesca	U.O. Microbiologia degli Alimenti-Sezione di Caserta	Dirigente Veterinario	Dipendente	6
Michele Napolitano	U.O. Sierologia-Sezione di Caserta	Dirigente Veterinario	Dipendente	6
	CRN igiene e tecnologie dell'allevamento e delle produzioni bufaline (CReNBuf)	Dirigente Veterinario	Tempo Determinato	12
	Da definire	Dirigente Veterinario	Tempo Determinato	12
				TOTALE 70

NOME	Laboratorio/Sezione di	QUALIFICA	Rapporto di lavoro	MESI UOMO
Maria Lodovica Pacciarini	Centro di Referenza Nazionale per la Tubercolosi (IZSLER)	Dirigente Biologo	Tempo indeterminato	2
Maria Beatrice Boniotti	Centro di Referenza Nazionale per la Tubercolosi (IZSLER)	Dirigente Biologo	Tempo indeterminato	2
Mariagrazia Zaroni	Centro di Referenza Nazionale per la Tubercolosi (IZSLER)	Dirigente Veterinario	Tempo indeterminato	2
Lucia Gibelli	Centro di Referenza Nazionale per la Tubercolosi (IZSLER)	Dirigente Veterinario	Tempo indeterminato	2
Mery Boifava	Centro di Referenza Nazionale per la Tubercolosi (IZSLER)	Tecnico di laboratorio	Tempo indeterminato	4
Anna Mangeli	Centro di Referenza Nazionale per la Tubercolosi (IZSLER)	Tecnico di laboratorio	Tempo indeterminato	2
Andrea Moneta	Centro di Referenza Nazionale per la Tubercolosi (IZSLER)	Tecnico di laboratorio	Tempo indeterminato	4
	Centro di Referenza Nazionale per la Tubercolosi (IZSLER)	Laureato/i Scienze Biologiche/ Biotecnologie/ Veterinaria	Borsa di studio	18
				36

Le attività descritte prevedono per lo svolgimento, per entrambe le UU.OO, quanto riportato in tabella:

VOCI DI SPESA	UNITA' 1 (IZSME)	UNITA' 2 (IZSLER)	TOTALE
- attrezzature	0	0	0
- materiale di consumo	25.000	15.000	40.000
- personale non dipendente	148.000	32.000	180.000
- missioni	4.000	5.000	9.000
- spese generali (max. 10%)	2.000	2.000	4.000
(1) TOTALE	179.000	54.000	233.000

Handwritten signature

Cronogramma delle attività

Fasi	1	2-20	20-23	24
I				
II				
III				
IV				

Fase 1: Formazione e I riunione

Fase 2: Accertamenti per TBC sui oggetto degli approfondimenti, e svolgimento della seconda riunione

Fase 3: Valutazione dei dati/risultati definitivi

Fase 4: Stesura della relazione finale sui risultati

Bibliografia di riferimento essenziale:

1. Bezos, J. Casal C., Romero B., Schroeder B., Hardegger R., Raebler A. J., Lopez L. Rueda P., Dominguez L. 2014. Res. Vet. Sci. 97: 544-552.
2. Cagiola M., Feliziani F., Severi G., Pasquali P., Rutili D., (2004) "Analysis of possible factors affecting the specificity of the gamma interferon test in tuberculosis-free cattle herds", Clin. And Diagn. Lab. Immunol. 11(5), 952-956.
3. Casto B., Pacciarini M., Donati C., Nassuato, C., Zoppi S., Moresco A., Dondo A., Rossi F., Bergagna S., Boniotti M.B. 2010. Utilizzo di un test ELISA multi-antigene per la diagnosi sierologica di tubercolosi bovina. XII Congresso Nazionale SIDLV, Genova, 27-29 Ottobre 2010.
4. De Klerk L., Michel A.L., Grobler D.G., Bengis R.G., Bush M., Kriek N.P.J., Hofmeyr M.S., Griffin J.F.T., Mackintosh C.g. 2006 "An experimental intratonsillar infection model for bovine tuberculosis in African buffaloes, *Syncerus caffer*". Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 73:L293-303.
5. de la Rua-Domenech R., Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. (2006) Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. Res Vet Sci. Oct; 81(2):190-210.
6. Domingo M.L., Liebana E., Carrera J., Vilafranca M., Casal J., Aranaz A., Altimira J., Vidal D., Marco A., Planell J.M., Mateos AS., Dominguez L. 1995. "Eficacia comparativa de la intradermorreaccion y de la prueba de liberation de γ -interferon para el diagnostico de la tuberculosis bovina en prueba de campo" Medicina Veterinaria 12: 307-317.
7. Dondo A., Gorla M., Scicluna M.T., Amadori M., Lodetti E. (1993) "Comparative evaluation of skin test and gamma interferon (IFN) assay for the diagnosis of TB in cattle. Vet.It. 28, 14-19.
8. Fujimura Leite C.Q., Morita Y., Dhakal M., Besnet B., Sato T., Nagai A., Kato M., Kozawa S., Kimura H. Isolation of *Mycobacterium* spp. from milking buffaloes and cattle in Nepal. J.Vet.med.Sci. 69(8): 819-825, 2003.
9. Gonzales Llamazares O.R., Gutierrez martin C.B., Nistal D.A., Redondo V.A.D.P., Dominguez Rodriguez L., Rodriguez Ferri E.F. 1999 "Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon-gamma assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain" Vet. Microbiol. 70: 55-66.
10. Guanziroli M., Cienita M.E., Zumarraga M., Romano M.I: Isolation of *Mycobacterium bovis* from water buffalo (*Bubalus bubalis*, Linne 1758) of the North East of Argentine. Rev.Vet. 21, Sup.1, 2010.
11. Kanameda M., Ekgatit M., Wongkasemjit S., Sirivan C., Pachamasiri T., Kongkrong C., Buchaphan K., Boontarat B. "An evaluation of tuberculin skin tests to diagnose tuberculosis in swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*)" Prev.Vet.Med. 39(2): 129-135, 1999.
12. Javed T.M., Shahid L.A., Farooqi F. A., Akhtar M., Cardenas G.A., Wasiq M., Cagiola M. (2010) "Risk factors associated with the presence of positive reactions in the SCCIT test in water buffalo around two cities in Punjab, Pakistan" Acta Tropica 115:242-247.
13. Jha V.C., Morita Y., Dhakal M., Besnet B., Sato T., Nagai A., Kato M., Kozawa K., Yamamoto S., Kimura H. 2007 "Isolation of *Mycobacterium* spp. From milking buffaloes and cattle in Nepal" J.Vet.Med.Sci. 69(8):819-825.
14. Man Bahadur Pun, Tanka Prasad Prasai, Mermagya Dhakal, Vijay Kant Jha, K7urishna Bahadu5r Shrestha, Vijay Chandra Jha. 2004. « Single intradermal tuberculin tests of milking buffaloes and cows in Nepal ». The Vet. Rec., January 24, 124
15. Vitale N., Zoppi S., Rossi F., Dondo A., Bergagna S., Ippolito C., Petruccioli G., Gorla M., Garrone A., Ferraro G., Chiavacci L. "Valutazione dell'accuratezza diagnostica del γ -interferon test per la tubercolosi bovina in assenza di gold standard" XII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., 27-29 ottobre 2010, Genova.
16. Wood P.R., Jones S.L." Bovigam tm : an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis", Tuberculosis (2001) 81 (1/2), 147-155
17. Zarden C.F.O., Marassi C.D., (2013) " A complementary diagnosis of naturally occurring tuberculosis in water buffaloes (*bubalus bubalis*) in Rio de Janeiro using a MPB70-Elisa", Trop. Anim.Health Prod 45:1203-1206