

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Veterinarie

Ciclo **XXX**

Settore Concorsuale: **07/H3**

Settore Scientifico Disciplinare: **VET/05–MALATTIE INFETTIVE DEGLI ANIMALI DOMESTICI**

TITOLO TESI

“Studio comparativo in vitro dei meccanismi di sopravvivenza di *M.bovis* e *M.avium* subsp. *paratuberculosis*. Valutazione precoce, ai fini diagnostici, dei profili di espressione proteica di macrofagi infettati sperimentalmente”

Presentata da: **Benedetta Amato**

Coordinatore Dottorato

Prof.Arcangelo Gentile

Supervisore

Prof.Santino Prosperi

Esame finale anno 2018

Ai più grandi amori della mia vita:
le mie due famiglie,
i miei animali (Bati, Leo, Birba, Arturo, Rory, Rocky, Principessa,
Schettina, Bimba)
Domenico.
Semplicemente
Grazie

Indice

| | | |
|---|------|-----|
| Abstract | pag. | 5 |
| 1.Introduzione | pag. | 6 |
| 2.Classificazione | pag. | 8 |
| 3.Aspetti biochimici | pag. | 11 |
| 4.Immunopatogenesi tubercolosi bovina e paratubercolosi | pag. | 13 |
| 4.1- <i>Immunologia generale: immunità innata ed acquisita</i> | pag. | 13 |
| 4.2- <i>Patogenesi della tubercolosi bovina</i> | pag. | 23 |
| 4.3- <i>Patogenesi della paratubercolosi</i> | pag. | 31 |
| 5.Metodiche diagnostiche della tubercolosi bovina | pag. | 34 |
| 6.Metodiche diagnostiche della paratubercolosi | pag. | 45 |
| 7.Materiali e metodi | pag. | 49 |
| 7.1 <i>Individuazione di aziende bovine e caprine ufficialmente indenni da tubercolosi e paratubercolosi</i> | pag. | 49 |
| 7.2 <i>Prelievo midollo osseo</i> | pag. | 49 |
| 7.3 <i>Allestimento della coltura macrofagica</i> | pag. | 51 |
| 7.4 <i>Infezione sperimentale in vitro con ceppi di campo di Mycobacterium bovis e Mycobacterium avium subsp.paratuberculosis</i> | pag. | 54 |
| 7.5 <i>Prove supplementari-colorazioni</i> | pag. | 57 |
| 7.6 <i>Test Elisa</i> | pag. | 59 |
| 7.7 <i>Real time PCR</i> | pag. | 62 |
| 8. Risultati | pag. | 75 |
| 8.1 <i>Test Elisa</i> | pag. | 75 |
| 8.2 <i>RT-PCR</i> | pag. | 82 |
| 9. Discussione e Conclusioni | pag. | 89 |
| - Bibliografia | pag. | 101 |
| - Ringraziamenti | pag. | 113 |

ABSTRACT

La tubercolosi bovina e la paratubercolosi sono due patologie che costituiscono un'importante minaccia per la salute umana ed animale. Il presente lavoro si basa sullo studio dei prodotti proteici e dei profili di espressione genica di macrofagi di specie bovina e caprina infettati con ceppi di *M.bovis* e *M.paratuberculosis* a differenti concentrazioni. Lo scopo è quello di individuare potenziali biomarkers da utilizzare a scopo diagnostico e chiarire le fasi patogenetiche precoci relative all'interazione macrofago-micobatterio. A tal proposito sono stati standardizzati due protocolli di prelievo e messa a punto della coltura macrofagica successivamente infettata con ceppi di campo (singolarmente o in forma mista) di *M.bovis* and *M.paratuberculosis* a differenti molteplicità di infezione stabilite secondo diluizioni scalari. Il surnatante ed il pacchetto cellulare venivano prelevati a distanza di 24 h, 48 h ed 1 settimana e sottoposti al saggio ELISA ed alla RT-PCR. I risultati ottenuti hanno evidenziato un aumento precoce e costante dell'IL-6 nei macrofagi bovini infettati con *M.bovis* confermato da ulteriori analisi condotte su campioni di siero di animali naturalmente infetti. Inoltre è stata osservata un'azione modulante della risposta infiammatoria in caso di compresenza di entrambi i patogeni ed un'inibizione del trascritto del TNF α come meccanismo di sopravvivenza dei micobatteri nella specie bovina. E' stata inoltre riscontrata un'inibizione nella produzione dell'IL-10 nella specie bovina che viceversa non si evidenziava nell'infezione paratubercolare della specie caprina. Quest'ultima non ha rivelato alcuna produzione citochinica in risposta ad entrambi i micobatteri tuttavia risultava evidente l'aumento dell'espressione genica per l'IFN- γ . In aggiunta è stata registrata la produzione di IL-2 in entrambe le specie. In conclusione è stata identificata una profonda variabilità della risposta macrofagica ad entrambe le infezioni (nella loro forma singola o mista) legata alla specie animale, alla concentrazione dei micobatteri ed, infine, nel caso di *M.bovis*, a ceppi differenti.

1.INTRODUZIONE

M.bovis è responsabile della tubercolosi bovina, una malattia infettiva dal decorso tipicamente cronico-debilitante che presenta un ampio spettro d'ospiti tra cui l'uomo (Gortazar et al, 2003). Le politiche dell'UE al riguardo sono focalizzate sull'applicazione di programmi di eradicazione che, in alcune regioni italiane, soprattutto del Sud Italia (Campania, Puglia, Calabria, Sicilia), hanno trovato una difficile realizzazione anche in virtù delle peculiarità orografiche e zootecniche del territorio. Di fatto la tubercolosi bovina costituisce, ad oggi, un'emergenza sanitaria nella regione Sicilia (Decreto Assessoriale del 26 ottobre 2017).

La paratubercolosi, il cui agente eziologico è *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) è stata identificata come una delle più gravi infezioni croniche del tratto intestinale nei ruminanti responsabile di ingenti perdite economiche nel settore zootecnico (Cho et al, 2012). Tale patologia in Italia non viene ancora considerata comunemente come un problema di sanità pubblica ma lo potrebbe diventare molto presto in virtù delle varie ipotesi sul suo possibile ruolo in altre patologie infiammatorie umane a decorso cronico (Arrigoni et al, 2011).

Studi recenti hanno, infatti, rivelato un possibile coinvolgimento del Map nel morbo di Crohn [in quanto isolato dal 50 al 75% dei pazienti affetti da tale malattia (Mishina,1996)] nella patogenesi del diabete mellito tipo 1 (Cosu et al, 2011; Paccagnini et al, 2009; Rosu et al, 2009), nel colon irritabile (Scanu et al, 2007) ed ipotesi più recenti, sclerosi multipla (Cossu D,2011), malattia di Parkinson (Dow T., 2014) autismo (Dow, 2011), tiroidite di Hashimoto, (D'Amore et al, 2010).

In alcuni Paesi extraeuropei (Cina, Russia) l'importazione di formaggi prodotti in Italia richiede l'assenza di casi clinici da almeno 12 mesi negli allevamenti produttori di latte utilizzato come materia prima (www.ruminantia.it). Per tale motivo la Direzione Generale della Salute della Regione Lombardia così come la regione Emilia-Romagna hanno ritenuto necessario recepire l'accordo del 17 ottobre 2013 tra il Governo, le Regioni e le Province Autonome di Trento e Bolzano concernente le linee guida per l'adozione dei piani di controllo per l'assegnazione della qualifica sanitaria degli allevamenti nei confronti della paratubercolosi bovina finalizzato a

a) definire i criteri per le attestazioni sanitarie (certificazioni) necessarie per il commercio del latte e dei prodotti derivati ai fini dell'export;

- b) raccogliere dati statistici sull'incidenza dei casi clinici e sulla diffusione dell'infezione da *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* nel patrimonio bovino;
- c) fornire agli allevatori strumenti per prevenire e controllare l'infezione da *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* nei propri allevamenti.

2.CLASSIFICAZIONE

Da un punto di vista tassonomico la classificazione dei micobatteri segue il seguente schema:

| | |
|-------------------------|---------------------------------|
| REGNO | <i>Bacteria</i> |
| TIPO | <i>Actinobacteria</i> |
| CLASSE | <i>Actinobacteridae</i> |
| ORDINE | <i>Actinomycetales</i> |
| SOTTO ORDINE | <i>Corynebacterineae</i> |
| FAMIGLIA | <i>Mycobacteriaceae</i> |
| GENERE | <i>Mycobacterium</i> |

Tab.1. Classificazione tassonomica micobatterio

Attualmente si adotta una classificazione in “complessi” che raggruppa le specie presenti in natura (Rastogi et al, 2001).

Mycobacterium tuberculosis complex (MTC)

Mycobacterium avium complex (MAC)

M. tuberculosis

M. bovis

M. africanum

M. microti

M. bovis BCG

M. canetti

M. caprae

M. pinnipedii

M. aviumsubsp. avium

M. hominissuis (ambiente)

M. intracellulare (bestiame)

M. avium subsp. paratuberculosis

Mycobacteria other than tuberculosis (MOTT)

M. flavescens

M. scrofulaceum

M. goodii

M. kansasii

M. malmoense

M. terrae

M. leprae (unico patogeno obbligato)

M. marinum

M. xenopi

M. smegmatis

M. phlei

M. fortuitum

M. vaccae

M. chelonae

Tab.2. Classificazione in complessi del genere Mycobacteria

In realtà soltanto alcune di esse destano un particolare interesse dal punto di vista sanitario:

| | |
|---|--|
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | Più comunemente associato alla malattia nell'uomo; raramente e in condizioni di promiscuità può colpire anche gli animali originando così il fenomeno della <u>"zoonosi inversa"</u> . |
| <i>Mycobacterium bovis</i> | Può causare malattia evolutiva in un ampio spettro d'ospiti domestici e selvatici (bovino, capra, pecora, cavallo, suino, gatto, uomo, daini, cinghiali, ecc). |
| <i>Mycobacterium caprae</i> | Micobatterio altamente patogeno con uno spettro d'ospite equivalente al <i>M. bovis</i> . |
| <i>Mycobacterium avium</i> | Dotato di scarsa patogenicità riconosce come ospiti preferenziali i volatili ma può comunque infettare suidi, ruminanti domestici e selvatici ed uomo. In caso di reazione dubbia alla tubercolina bovina è sempre bene valutare un'eventuale cross-reazione. |
| <i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i> | E' responsabile nei ruminanti domestici e selvatici di una forma di enterite cronica proliferativa comunemente definita paratubercolosi o malattia di Johne. |
| <i>Mycobacteria Other Than Tuberculosis (MOTT)</i> | Costituiscono un gruppo molto esteso di micobatteri a carattere ubiquitario e saprofitico ed a patogenicità variabile. Possono essere anch'essi responsabili di false positività all'IDT. |

Tab.3. Rappresentazione schematica delle varie specie di micobatteri e della loro patogenicità (Guarda et al, 2005)

3.ASPETTI BIOCHIMICI

I micobatteri si classificano come patogeni, aerobi (anche se è stata individuata una potenziale attività metabolica anaerobica o comunque una micro-aerofilia), di forma generalmente bastoncellare diritta o leggermente ricurva, lunghi dai 2 ai 4 μ m e con un diametro tra i 0,3-0,5 μ m, immobili, asporigeni, acido/alcool resistenti. Citochimicamente Gram + ma che difficilmente si colorano con la colorazione di Gram per la particolare composizione della loro parete cellulare che presenta un alto contenuto in lipidi (lipopolisaccaridi e lipoproteine) e che viene sintetizzata direttamente dalla cellula parassitata tramite sintesi proteica (Fig. 1). Quest'ultima non solo fornisce protezione al batterio ma ne permette anche l'adesione ed il nutrimento. Oltre alla parete cellulare il microrganismo è dotato di altri mezzi di difesa i quali, agendo in sinergia, gli conferiscono la capacità di resistere nell'ambiente, agli antimicrobici ed al sistema immunitario dell'organismo ospite:

- Le cere-D e l'acido micolico ad alto peso molecolare come il "cord factor" (trealosio-6-6' dimicolato) (Fig. 2). Quest'ultimo, aumenta proporzionalmente alla virulenza dei micobatteri ed ha un effetto citotossico inducendo la formazione del granuloma per attivazione delle difese umorali e tissutali;

-I solfolipidi ed i lipoglicani che interferiscono sulla secrezione di citochine e sull'attività dei macrofagi

-La micobactina che chela il ferro ed è considerata un fattore di patogenicità vero e proprio (Hines et al, 1995; Farina e Scatozza, 1988).

I micobatteri si colorano pertanto con la Ziehl-Neelsen (i coloranti utilizzati sono la fucsina basica ed il blu di metilene) a partire da qualsiasi escreto e secreto biologico (anche da feci) ed assumono una caratteristica colorazione rossa su di uno sfondo blu al microscopio (Poli e Cocilovo, 2005).

Paratubercolosi

Il MAP presenta due diversi ceppi classificati secondo la specie nella quale sono stati rinvenuti per la prima volta: il ceppo "ovino" S (da sheep) o tipo I e quello "bovino" C (da cattle) o tipo II. Il ceppo di tipo I è riscontrato prevalentemente nelle pecore mentre il tipo II viene isolato nel bovino ed in altri ospiti suscettibili (ovini, caprini, conigli). I ceppi di tipo C sono relativamente facili da isolare e sono meno patogeni dei ceppi di tipo S più esigenti dal punto di vista colturale e in grado di provocare lesioni più gravi (Stevenson, 2010).

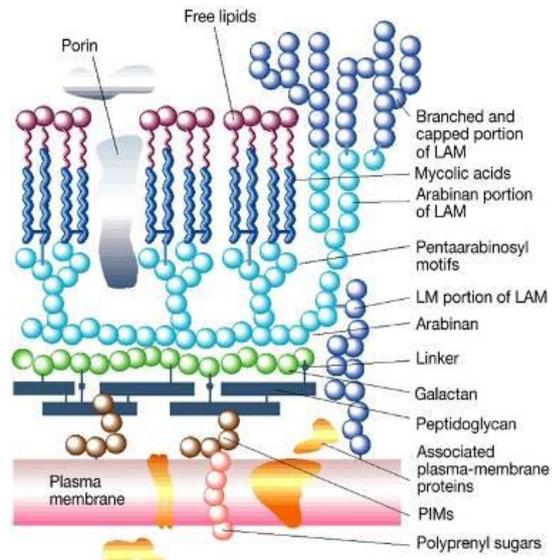


Fig.1. Rappresentazione schematica della parete di un micobatterio



Fig.2. Esempio di colonie di *Mycobacterium bovis* su terreno solido

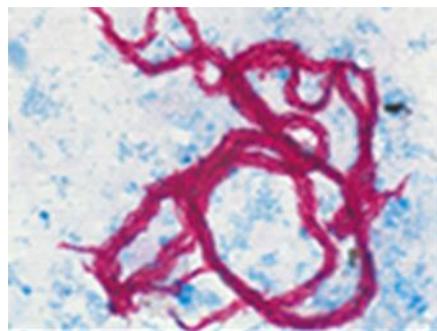


Fig.3. Fattore cordale, *Mycobacterium bovis*

4.IMMUNOPATOGENESI TUBERCOLOSI BOVINA E PARATUBERCOLOSI

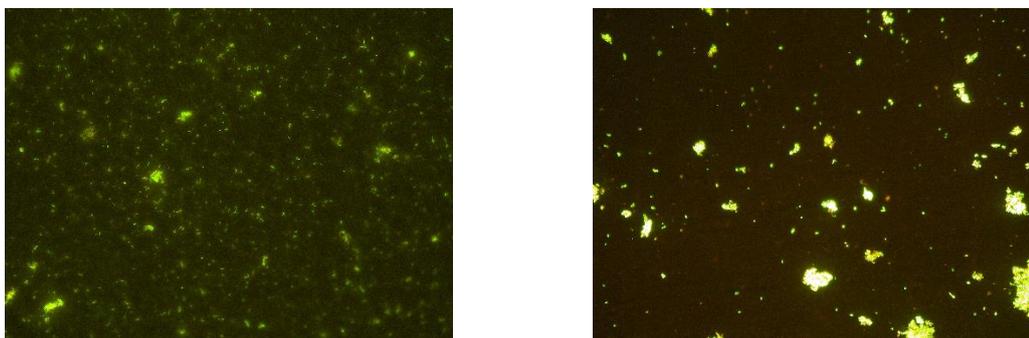


Fig.4. *Mycobacterium paratuberculosis/bovis* microscopio a fluorescenza

4.1-Immunologia generale

| Immunità | |
|---------------------------------|---|
| <i>Innata</i> | <i>- Acquisita</i> |
| aspecifica | - antigene-specifica |
| riconosce strutture comuni | - riconoscimento self-non self |
| sempre attiva | - è altamente diversificata (cellulo/anticorpo mediata) |
| sempre uguale | - potenziata da contatti antigenici ripetuti |
| previene l'infezione | - richiede l'infezione |
| non possiede cellule di memoria | - persiste a lungo tramite le cellule della memoria |
| è precoce | - è tardiva |

Tab.4. Distinzione immunità innata/acquisita

Immunità Innata

Le linee di difesa che l'organismo schiera quando un patogeno riesce a superare le barriere fisiche e biologiche (pelle, secrezioni delle mucose) sono rappresentate dall'oscillazione delle ciglia, dal ph acido dello stomaco, dalle

secrezioni di enzimi quali lisozima, fosfolipasi e dalla presenza di una microflora che inibisce la proliferazione dei batteri patogeni (microbioma o microbiota).

Si verifica, inoltre, l'attivazione aspecifica di alcuni componenti del sistema immunitario:

-Attivazione del Complemento via alternativa

-Attivazione dei Macrofagi

-Attivazione delle cellule NK

-Produzione di citochine (tra cui l'Interferone)

-Produzione di lattoferrina e transferrina (legano entrambe il ferro impedendo, così, che quest'ultimo possa essere utilizzato per la crescita batterica)

-Lisozima. Rompe la parete cellulare batterica

-Neutrofili (C)

Il complemento

Il complemento è formato da un insieme di proteine plasmatiche e di membrana che si attivano a cascata e che possono comportare o la lisi del patogeno o la sua fagocitosi.

Si conoscono tre vie di attivazione:

- Classica dettata dalla formazione del complesso antigene-anticorpo a cui il complemento si lega inducendone la lisi. Necessita della presenza dell'anticorpo per la sua attivazione (si riscontra nell'immunità specifica)
- Alternativa che si attiva tramite il frammento C3b. In questo caso il clivaggio del frammento C3 avviene senza il contributo degli anticorpi. (si riscontra soprattutto nell'immunità innata)
- Delle lecitine, la quale sfrutta la Mannose binding lectin presente sulla membrana di un gran numero di microrganismi per legarsi ed indurvi la lisi (si riscontra soprattutto nell'immunità innata)

Macrofagi

I macrofagi inducono la fagocitosi e la lisi dei patogeni sia in modo diretto che indiretto ovvero tramite il complemento o le immunoglobuline. Fungono, inoltre, da cellule presentanti l'antigene nell'immunità acquisita (il medesimo

ruolo è svolto dalle cellule dendritiche) e sintetizzano numerose interleuchine ed enzimi/sostanze/proteine.

| <i>Sostanze/enzimi/proteine prodotti dai macrofagi</i> | |
|--|---|
| ➤ <i>ossido nitrico e altri intermediari reattivi</i> | |
| ➤ <i>intermediari dell'ossigeno reattivi ROS</i> | <i>PEROSSIDO DI IDROGENO ANIONE SUPEROSSIDO IDROSSI RADICALE ACIDO IPOCLOROSO</i> |
| ➤ <i>Proteine cationiche ed enzimi Idrolitici</i> | <i>LISOZIMA, FOSFATASI ALCALINA, LATTOFERRINE, β- GLUCURONIDASI, ARILSULFATASI ECC...</i> |

Tab.5. Sostanze prodotte dalle cellule macrofagiche

Natural Killer

Le NK o grandi linfociti granulari sono linfociti citotossici ovvero che inducono la morte delle cellule sia che esse siano neoplastiche, infettate da agenti virali o semplicemente estranee all'organismo, mediante l'ausilio della perforina e della granulolisina. La perforina agisce inducendo la formazione di pori a livello della membrana plasmatica mentre la granulolisina altera la permeabilità cellulare. Segue il rilascio dei granzimi A, B, C che attivano la cascata delle caspasi a loro volta responsabili dell'apoptosi cellulare (morte programmata). Il riconoscimento di eventuali cellule da eliminare avviene tramite la valutazione di anomalie del MHC (Complesso Maggiore di Istocompatibilità), struttura proteica distinta in due sub categorie:

Tipo I: viene espresso da tutte le cellule nucleate dell'organismo

Tipo II: si riscontra solo nelle cellule presentanti antigene (macrofagi, cellule dendritiche, linfociti B) (Alberts et al, 2002).

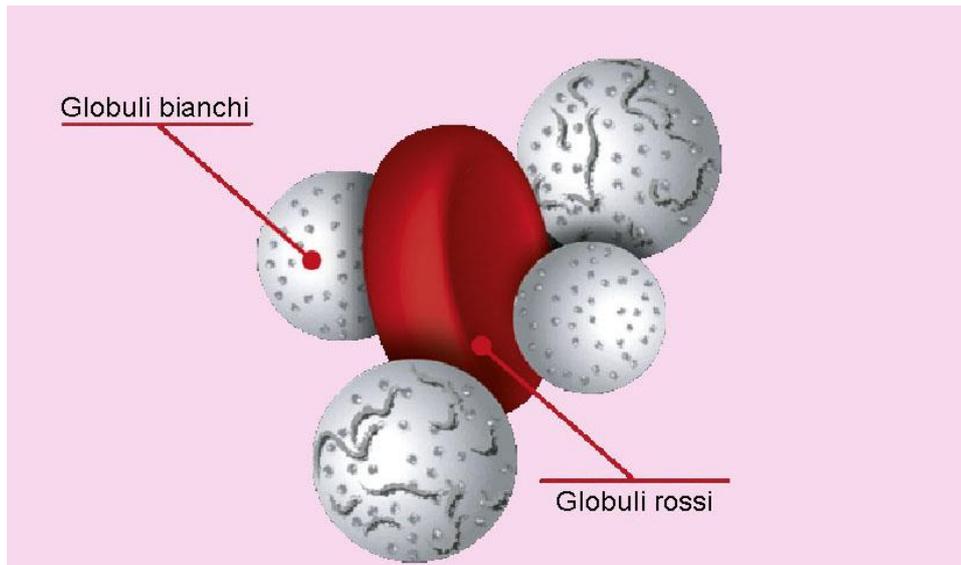


Fig.5. Esempio di cellule del sistema immunitario

Citochine

Le citochine sono proteine secrete dalle cellule del sistema immunitario in risposta ad uno stimolo esterno antigenico o ad un segnale intercellulare. Sono efficaci anche a basse concentrazioni e possiedono una notevole affinità per i recettori di membrana (strutture glicoproteiche poste sulla membrana delle cellule il cui compito è quello di tradurre il segnale indotto dalla citochina all'interno). Possono, inoltre, agire su diverse popolazioni cellulari contemporaneamente.

Le principali citochine coinvolte nella risposta innata sono descritte nella seguente tabella (Tab.6).

Tab.6. Principali citochine coinvolte nella risposta innata

| CITOCHINA | STRUTTURA | CELLULA PRODUTTRICE | FUNZIONE |
|--------------|-----------------------|--|---|
| IL 1 | Monomero (18 kD) | Macrofagi | Pirogena, Attivazione dei Linfociti T e Macrofagi (citochina pro-infiammatoria), tipica delle infezioni batteriche |
| IL 6 | Monomero (26 kD) | Linfociti, 3 Macrofagi | Attivazione linfociti T e B, mediatore risposta fase acuta, pro-infiammatoria |
| IL 12 | Eterodimero (75kD) | Neutrofili, Macrofagi | Differenziazione di Linfociti Attivazione di cellule NK |
| IL 16 | Omotrimero (13kD) | Linfociti T | Chemiotassi |
| TNF α | Omotrimero (17kD) | Macrofagi (maggiori produttori) Linfociti Mastociti Eosinofili | Infiammazione locale, cambiamenti di permeabilità, aumento temperatura (citochina pro-infiammatoria), induce l'apoptosi |
| IFN α | Monomero (18kD) | Linfociti | Attivazione risposta immunitaria nei confronti di patogeni di natura virale |
| IFN β | Monomero (20kD) | Fibroblasti Altre cellule | Attivazione NK Inibizione della replicazione dei virus |
| IFN γ | Omodimero | Linfociti Cellule NK | Attivazione risposta immunitaria mediante l'attivazione dei macrofagi |

La loro funzione è quella di stimolare ed attivare le varie popolazioni cellulari che compongono il sistema immunitario.

Neutrofili

I neutrofili agiscono attraverso

-fagocitosi e formazione di NET (neutrophils extracellular traps)

-degranulazione

A tal proposito producono 3 differenti tipologie di granuli:

- granuli azzurri o primari contenenti proteine ed enzimi ad azione battericida quali la mieloperossidasi, la difensina (peptide che svolge attività antimicrobica, antifungina ed in parte anche antivirale), la BPI (proteina che incrementa la permeabilità della cellula batterica)
- granuli secondari ricchi di lattoferrina e catelicidina (proteina tossica per i microrganismi che svolge anche attività costimolatoria)
- granuli terziari costituiti perlopiù da catepsine (enzimi proteolitici) e gelatinasi (Karthik et al, 2013)

Immunita' Adattativa

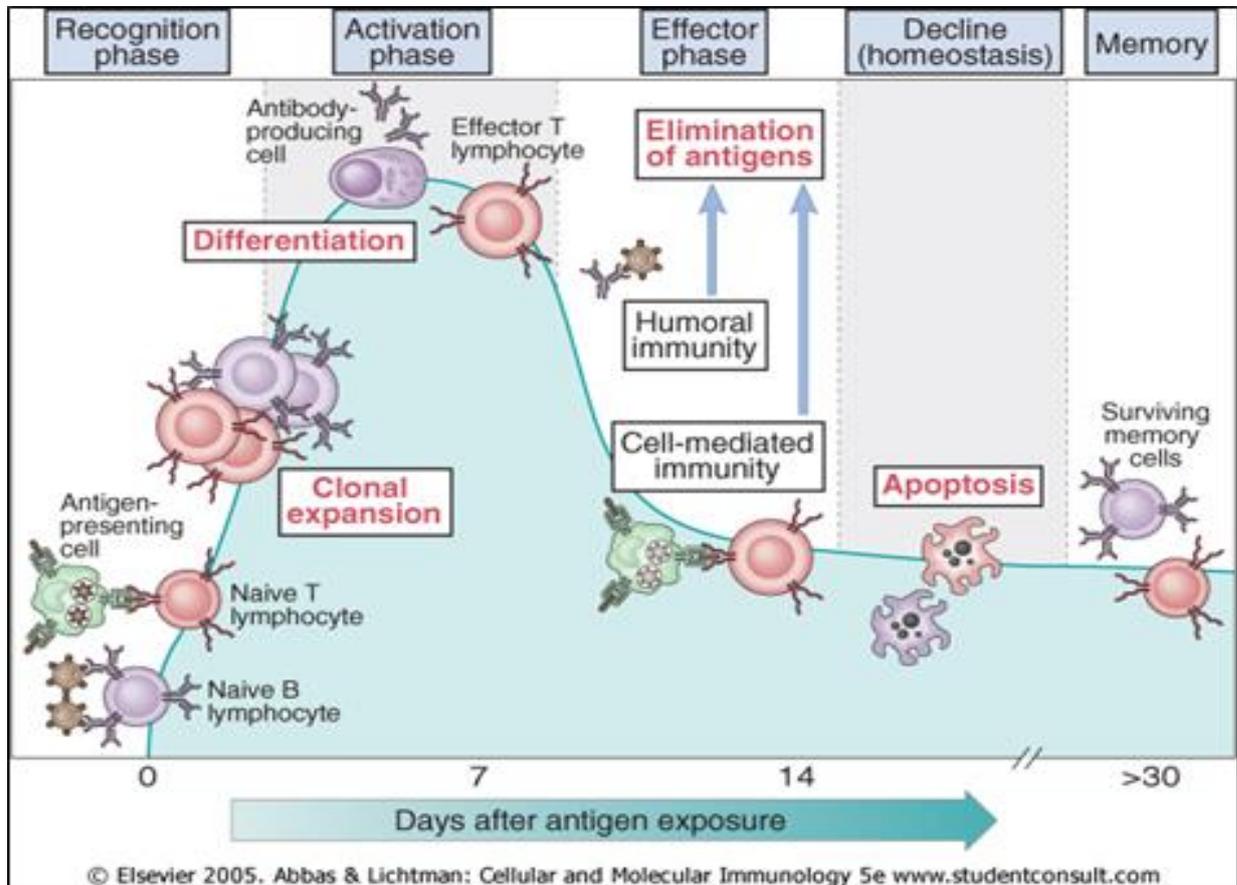


Fig.6. Interpretazione schematica dell'immunità adattativa (Robbins & Cotran, 2015)

Qualora i meccanismi dell'immunità innata si rivelassero insufficienti l'organismo sviluppa una risposta definita **adattativa o acquisita** altamente specifica. Quest'ultima si distingue in **cellulo-mediata** (cellule dendritiche, linfociti T) ed **anticorpo-mediata o umorale** (linfociti B, plasmacellule). L'attivazione di questo tipo di immunità ha inizio quando le cellule dendritiche così come i macrofagi e linfociti B (dette cellule APC ovvero cellule presentanti l'antigene) spongono le componenti antigeniche dei microrganismi con cui hanno interagito sulla loro superficie di membrana favorendo la proliferazione e l'attivazione dei linfociti secondo un processo di co-stimolazione che porta alla secrezione di IL-2 responsabile, quest'ultima, della clonazione e differenziazione dei T helper (CD4+) e dei linfociti citotossici CD8+ (McGavin and Zachary, 2011).

Di seguito vengono riportate le varie fasi che costituiscono la risposta adattativa:

Risposta cellulo-mediata

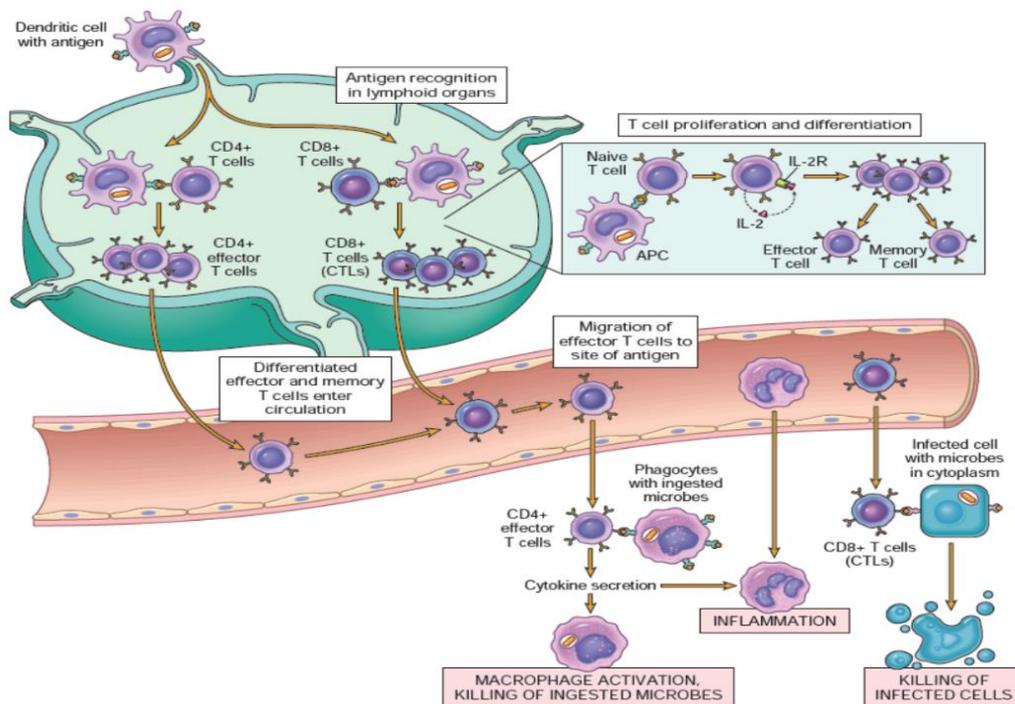


Fig.7. Processazione dell'antigene ed attivazione delle popolazioni linfocitarie CD4 e CD8 (Robbins & Cotran, 2015)

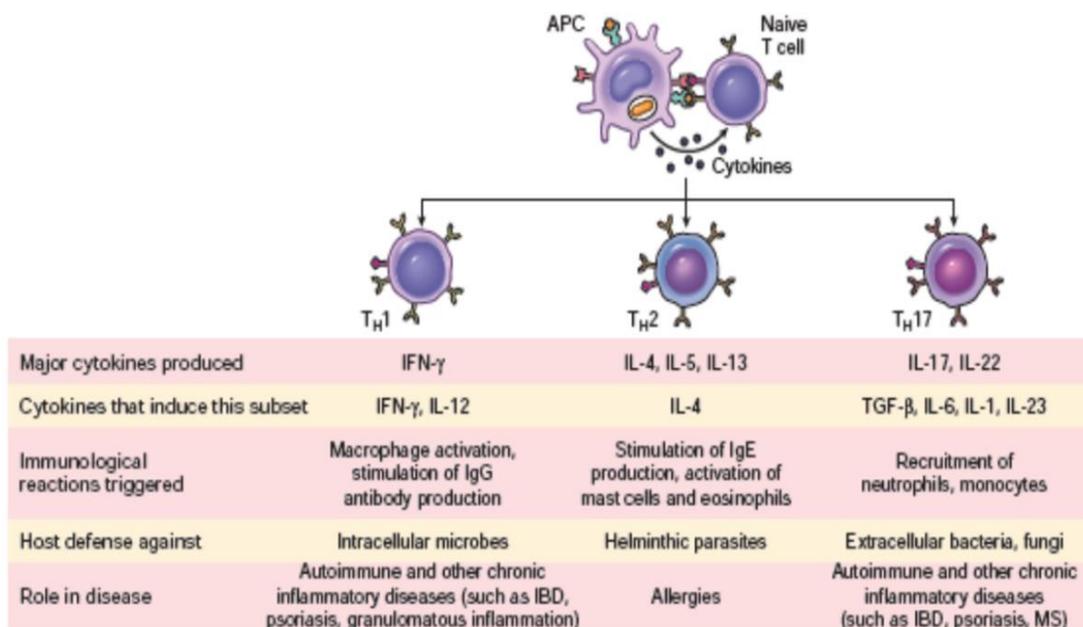


Fig.8. Differenziamento linfociti CD4 o helper nelle diverse sottopopolazioni (Th1, Th2, Th17) (Robbins & Cotran, 2015)

Mentre i CD4+ agiscono prevalentemente producendo citochine ed attivando altri componenti della risposta immunitaria quali i macrofagi il meccanismo d'azione dei CD8+ non si discosta da quello attuato dalle Natural Killer

provocando la distruzione della cellula infetta. Producono anch'essi IFN- γ , citochina deputata all'attivazione macrofagica.

Linfociti $\gamma\delta$

Si tratta di cellule di natura linfocitaria presenti in percentuali variabili in relazione alla specie. Ad esempio nei bovini costituiscono in media il 10-25% dei linfociti circolanti. Agiscono sia nell'immunità innata che in quella adattativa con 2 funzioni fondamentali:

-funzione di prima difesa per la quale non necessitano della presentazione dell'antigene

-funzione di regolazione e controllo dell'equilibrio locale (soprattutto a livello intestinale ma in generale in tutti gli organi cute inclusa) (Bottaccioli,2008).

Linfociti T regolatori

Si tratta di una popolazione di linfociti detti anche **suppressor** che intervengono al fine di limitare la risposta immunitaria e creare delle forme di tolleranza periferica impedendone così un'evoluzione distruttiva ai danni dell'organismo (Abbas et al, 2012).

Risposta umorale

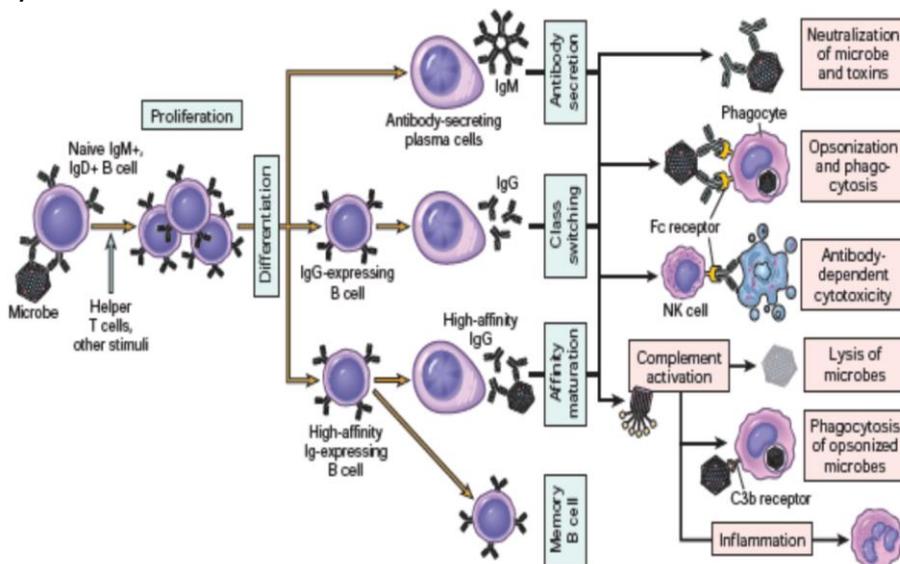


Fig.9. Schema riassuntivo attivazione risposta anticorpo-mediata (Robbins & Cotran, 2015)

L'attivazione delle cellule B induce la produzione di plasmacellule ovvero cellule replete di anticorpi differenti ad ognuno dei quali è associata una specifica funzione.

L'attivazione può essere

-T dipendente

-T indipendente

Le immunoglobuline prodotte sono

-Ig A tipicamente riscontrate a livello mucosale

-Ig G trasmesse mediante l'immunità materno fetale

-Ig M captano gli antigeni circolanti ed inducono la trasformazione del linfocita B in plasmacellule

-Ig E comuni nelle forme allergiche e parassitarie

Agiscono secondo 3 differenti meccanismi

-Opsonizzazione

-Neutralizzazione

-Attivazione del complemento

Al termine del processo avremo la formazione delle cellule di memoria altamente specifiche ed efficienti con attivazione rapida.

4.2-Patogenesi della tubercolosi bovina

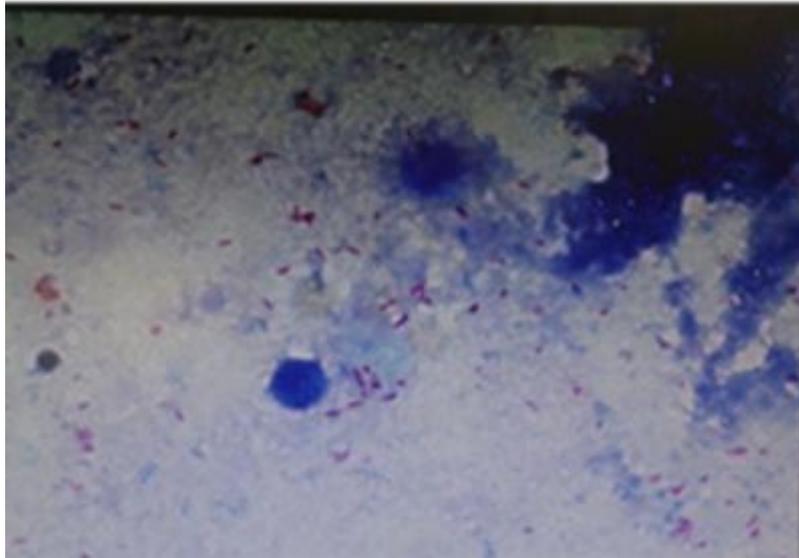


Fig.10. Ziehl Neelsen micobatteri e macrofagi

*La cellula-bersaglio è il **MACROFAGO***

*La lesione caratteristica della malattia è il **GRANULOMA o TUBERCOLO***

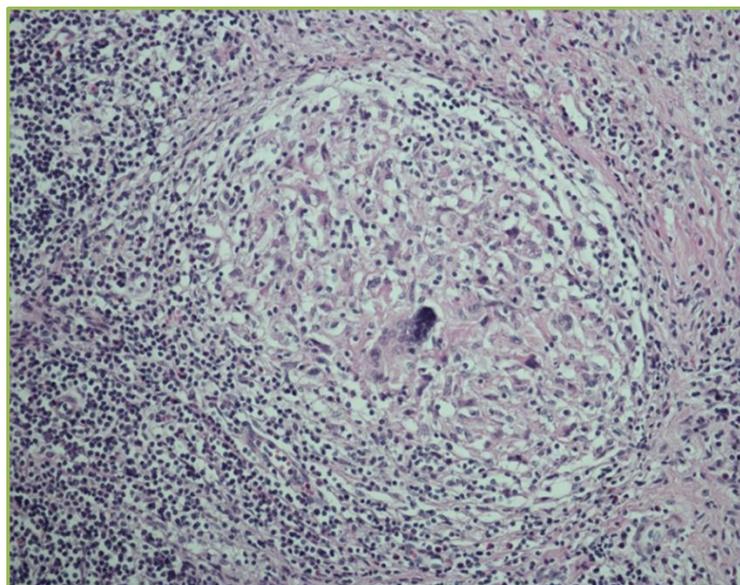


Fig.11. Istologico di granuloma tubercolare

La prima fase dell'infezione tubercolare si instaura nel momento in cui il micobatterio penetra all'interno dell'organismo ospite inducendo l'attivazione dell'immunità innata tramite l'interazione dei PAMP batterici (pathogen associated molecular patterns), che in questo caso sono costituiti per lo più da componenti lipidiche e lipoproteiche (LM=lipidomannani, LabMAN=mannosilipoarabidomannani, PIM=fosfati dilinositolomannosidi), con i PRR (pathogen recognition receptors) di cui ricordiamo i TLR (Toll-like receptors), presenti su macrofagi e cellule dendritiche.

Il tipo di recettore con cui i microrganismi vengono a contatto influenza non solo l'instaurarsi o meno di un processo infiammatorio ma anche la sopravvivenza del patogeno all'interno della cellula.

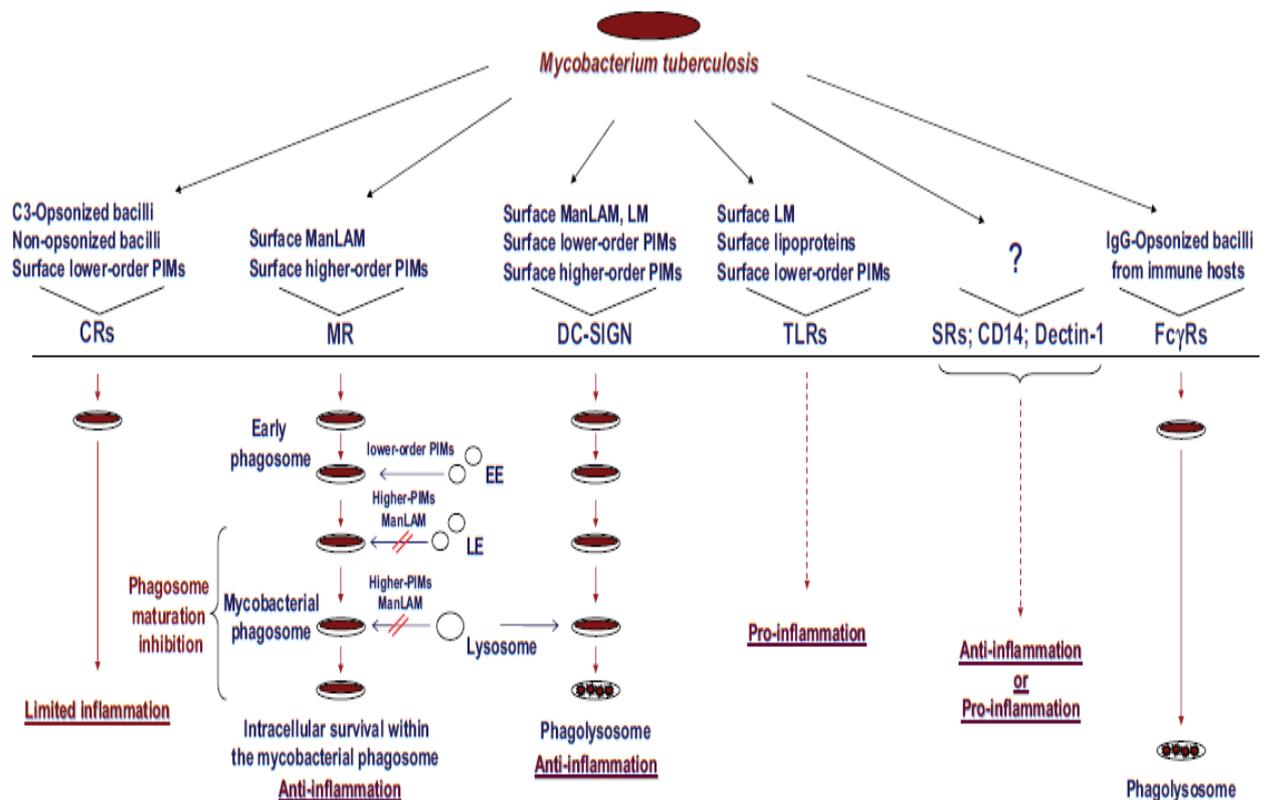


Fig.12. Riconoscimento e risposta del sistema immunitario a *M. tuberculosis* (Schlesinger et al, 2008).

Una volta avvenuto il riconoscimento, il macrofago fagocita il micobatterio ed attraverso la fusione delle estremità degli pseudopodi fa sì che rimanga confinato all'interno di una struttura simil vescicolare detta fagosoma. Seguono una serie di eventi di fusione e fissazione (Ca^{2+} dipendenti) a cascata il cui inizio

è caratterizzato dalla fosforilazione della sfingosina in sfingosina-1-fosfato fino all'evento culminante, che determina la maturazione vera e propria del fagosoma, rappresentato dalla fosforilazione del fosfatidilinositolo in fosfatidilinositolo3-fosfato. Durante questa fase avremo l'attivazione di una pompa protonica ATP dipendente che abbassa il pH all'interno del fagosoma. Quando si completa l'intero processo il fagosoma maturo entra in contatto con i lisosomi, organelli cellulari ricchi di idrolasi acide, il cui compito è quello di distruggerne il contenuto. Vengono, inoltre, prodotti intermedi reattivi di ossido nitrico e radicali liberi dell'ossigeno. I prodotti di questa "digestione" vengono raccolti all'interno di vescicole e rilasciati all'esterno della cellula mediante un processo di esocitosi. In realtà non sempre ciò avviene efficacemente in quanto il micobatterio ha sviluppato una serie di meccanismi che inibiscono o eludono la formazione del fagolisosoma. Quest'ultimi agiscono soprattutto interferendo nell'attivazione della pompa protonica e nella formazione del fosfatidilinositolo3-fosfato. Alterano, quindi, il normale processo di trasporto e la conseguente maturazione. Inoltre l'induzione di una completa e totale apposizione della parete batterica con la membrana del fagosoma, grazie all'ausilio del colesterolo, aiuta a ritardare i processi di degradazione della vescicola endosomiale e l'inibizione del reclutamento dell'ossido nitrico impedisce la digestione lisosomiale (Miller,2004).

Secondo l'evoluzione patogenetica della malattia parte delle componenti antigeniche dei patogeni degradati vengono processate ed esposte sulla superficie di membrana dei macrofagi e delle cellule dendritiche mediante l'ausilio del MHC-II, il quale, a sua volta, viene riconosciuto dai recettori delle cellule T del tipo CD4+ (TCR).

Il compito dei linfociti CD4+ non si limita soltanto al riconoscimento antigenico ma influenza notevolmente le fasi successive della risposta immunitaria mediante la produzione di citochine specifiche e l'attivazione dei monociti-macrofagi.

Il legame tra TCR (recettore dei linfociti) -MHC in associazione con fenomeni di co-stimolazione induce, infatti, la trasduzione del segnale dalla superficie all'interno delle cellule coinvolte. Ciò comporta un'attivazione di entrambe il che vuol dire anche espansione clonale e secrezione di citochine.

In base al tipo di citochine prodotte parleremo di risposta di tipo **Th1** (IL-2, INF- γ , TNF- β) o di tipo **Th2** (IL-4, IL-5, IL-13) per quanto riguarda i linfociti mentre i macrofagi rilasciano IL-12, diretta responsabile dell'attivazione dei CD4+. La funzione principale dei Th1 è quella, quindi, di stimolare la proliferazione e l'attivazione della linea monocitico-macrofagica andando così a potenziare un

tipo di immunità cellulo-mediata mediante la produzione di INF- γ . Quest'ultimo agisce anche inducendo la produzione di IgG, anticorpi con elevata affinità per i recettori Fc γ dei macrofagi e per le proteine del complemento, che favoriscono l'opsonizzazione dei microrganismi.

Inoltre, di concerto con il TNF- β determina l'insorgenza di un processo infiammatorio, mentre in associazione all'IL-2 promuove la differenziazione e l'attivazione dei linfociti CD-8+ che, esprimendo perforina e granulolisina (proteine), inducono la lisi dei macrofagi infetti (attività citotossica, citolitica).

Le citochine prodotte dai Th2 promuovono, viceversa, un tipo di risposta anticorpo-mediata inducendo l'espansione clonale dei linfociti B e la secrezione di elevate quantità di Ig M e Ig G.

Inoltre IL-4 e IL-13 antagonizzano l'attività del INF- γ e IL-10 sopprime la risposta macrofagica.

Lo scopo principale è quello di limitare e controllare il processo infiammatorio indotto.

Un ruolo chiave nel processo patogenetico della malattia è svolto anche dalla citochina TNF- α . Prodotta dai macrofagi e dalle cellule dendritiche, stimola un potenziamento dell'attività microbica indotta dai radicali dell'ossigeno (anioni superossido e perossido d'idrogeno).

Altro meccanismo di difesa messo in atto dall'organismo nei confronti del patogeno consiste nel determinare l'apoptosi delle cellule infette. Quando, infatti, la cellula va incontro ad una morte programmata perde gran parte della quantità di acqua contenuta all'interno il che comporta un aumento della tossicità che facilita, a sua volta, la distruzione del patogeno, inoltre ne previene la diffusione inglobandoli all'interno dei corpi apoptotici. Così intrappolati sono facilmente soggetti a degradazione.

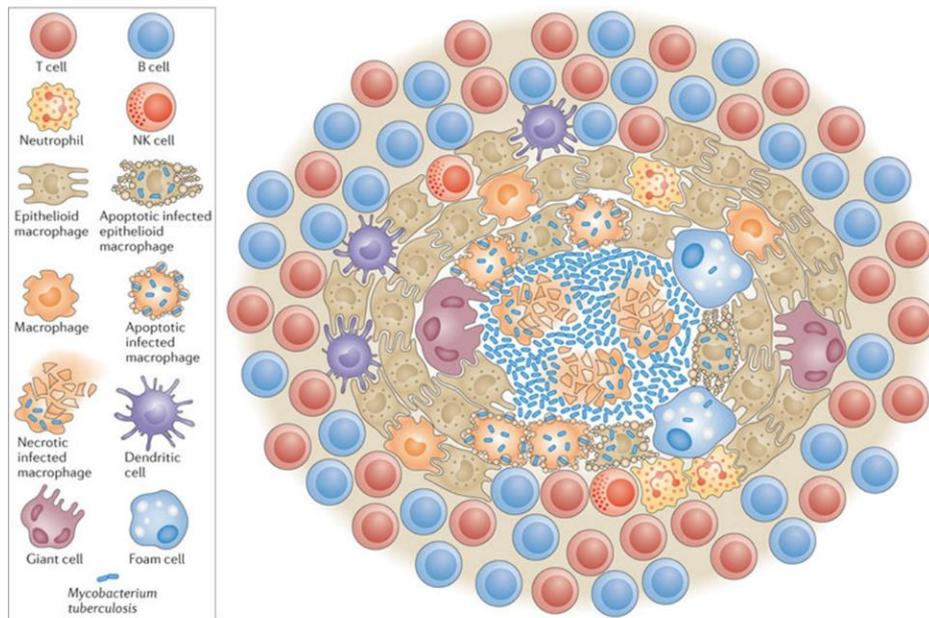
L'intensa attività pro-infiammatoria svolta dal sottotipo CD4+Th1 in associazione a quella citolitica e citotossica dei NK e dei CD8+ inducono un'attività distruttrice sui tessuti coinvolti creando un ambiente acido, ipossico e del tutto inospitale per il micobatterio (caratterizzato da più o meno estesi fenomeni di necrosi caseosa o caseum). L'organismo, nel tentativo di arginare la diffusione del patogeno e la distruzione dei tessuti, cerca di incapsulare il sito primitivo d'infezione. E' questo il momento in cui si forma la lesione patognomica di questa patologia: GRANULOMA O TUBERCULUM.

Il tubercolo può essere singolo o multiplo, isolato o confluyente. Macroscopicamente si presenta come una formazione nodulare di grandezza variabile da un grano di miglio (miliare) a diversi centimetri di diametro.

La consistenza cambia in base allo stadio evolutivo delle lesioni (dura e bernoccoluta quando si determina la calcificazione, più cedevole in caso di necrosi caseosa), il colore vira dal grigio al bianco giallastro; al taglio è generalmente stridente per la deposizione di sali di calcio (la fosfatasi alcalina, contenuta nei macrofagi e rilasciata durante la loro rottura, libera l'acido fosforico presente nei tessuti il quale, a sua volta, si unisce con il calcio plasmatico e tissutale formando un sale specifico: il fosfato tricalcico che tende a precipitare e depositarsi) e dal tipico aspetto caseo-sclero-calcifico (Abrami et al, 2013).

Da un punto di vista citologico è costituito da aggregati di

- ✓ -Macrofagi infetti e non presenti anche sotto forma di cellule epitelioidi (macrofagi attivati) o di cellule giganti di Langhans (date dalla fusione di più macrofagi)
- ✓ -Linfociti CD4+ Oltre alle funzioni sopra citate questa popolazione linfocitaria è, inoltre, responsabile del reclutamento dei fibroblasti
- ✓ -Linfociti CD8+
- ✓ -Cellule dendritiche
- ✓ -Linfociti B in piccole concentrazioni
- ✓ -Neutrofili in piccole concentrazioni
- ✓ Fibroblasti che vanno a formare un vallo fibroso di demarcazione della lesione



Nature Reviews | Immunology

Fig.13. Struttura granuloma (Ramakrishnan, 2012)

Da un punto di vista patogenetico si distinguono 5 differenti stadi che ne scandiscono l'evoluzione.

I° stadio: i macrofagi attivati distruggono la maggior parte dei bacilli che inglobano

II° stadio: i bacilli sopravvissuti si moltiplicano all'interno dei macrofagi non attivati in maniera esponenziale

III° stadio: Il tubercolo inizia a sviluppare un nucleo necrotico caseoso

IV° stadio: nei soggetti che non riescono a contenere in maniera efficace l'infezione assisteremo ad una progressione della lesione ed un danno tissutale sempre più esteso. In quelli in cui, invece, si attiva una risposta immunitaria efficace, si forma attorno alla lesione necrotica primitiva un cordone di macrofagi attivati che fagocitano e distruggono qualsiasi micobatterio che fuoriesce dal nucleo caseoso impedendo, così, a quest'ultimi di raggiungere i vasi emo-linfatici e di diffondere in altri organi e tessuti.

V° stadio: si verifica nel momento in cui si assiste ad una colliquazione della necrosi e conseguente generalizzazione della malattia.

Volendo rapportare la tipologia di granuloma alla progressione della malattia, dal punto di vista anatomico-patologico distingueremo:

- il tubercolo grigio della grandezza di una capocchia di spillo, con alone iperemico, tipico della generalizzazione fulminante;

- il tubercolo miliare della grandezza di un grano di miglio di colore grigio con al centro un'area giallastra dovuta al caseum;
- il tubercolo caseoso, che costituisce la fase immediatamente successiva al tubercolo grigio e si presenta dalla grandezza di una noce avellana con tendenza a confluire ed aumentare di dimensione (in questo caso la necrosi è abbondante e la capsula si assottiglia parecchio);
- il tubercolo caseo-calcifico, di dimensioni simili al precedente; al taglio rivela un contenuto più asciutto, friabile e stridente. E' stato osservato che quest'ultimo si forma dopo 35 giorni dall'inizio dell'infezione nel bovino e dopo 58 nell'uomo.

L'evoluzione fibrosa è così chiamata per la prevalenza di fibre connettivali ed elastiche sul contenuto caseoso.

Nel caso in cui la lesione evolva ulteriormente per azione delle proteasi e delle desossiribonucleasi assisteremo alla formazione della cosiddetta "necrosi colliquativa" che comporta la perdita dei limiti anatomici dei distretti interessati e l'istituzione di aree comuni di raccolta del materiale. (a livello polmonare avremo la formazione delle cosiddette "caverne") (Abrami et al, 2013; Sierra Plana and Ibarra, 2004).

Il ruolo del granuloma è quello di limitare sia i danni tissutali che la diffusione del patogeno nell'ambiente.

Per alcuni autori (Bold et al, 2009; Muse Davis and Ramakrishnan 2009) costituisce la sottile linea d'equilibrio tra ospite e patogeno. Secondo Davis durante la fase iniziale della malattia i micobatteri usano il locus ESX-1/RD1 della virulenza al fine di reclutare un quantitativo maggiore di macrofagi dove poter replicare liberamente. Per sopravvivere all'interno della cellula ospite in un ambiente così ostile degradano, inoltre, mediante l'uso di lipasi specifiche, gli acidi grassi assunti dalla cellula come il triacilglicerolo (TAG) formando i cosiddetti Foamy Macrophages. Probabilmente la degradazione avviene in un modo che ricorda molto l'autofagia.

Nel caso in cui vengano riscontrati i Lipid Bodies (LB) il bacillo risulterà dormiente, non replicante.

Questo concetto risulta fondamentale per introdurre una delle caratteristiche più temibili del micobatterio: la **LATENZA**, ovvero la capacità di porsi in uno stato di apparente "dormienza o inattività" qualora la sua sopravvivenza sia

gravemente minacciata. I meccanismi con cui si verifica ciò sono tutt'oggi poco chiari.

Purtroppo quello della latenza non è l'unico punto oscuro nell'immunopatogenesi della tubercolosi. Poco o nulla si sa, ad esempio, sullo switch della risposta immunitaria dal tipo Th1 al tipo Th2. Il soggetto infetto può, infatti, mantenere per anni l'infezione sotto controllo qualora il suo sistema immunitario funzioni in maniera efficace. In condizioni di stress legato a patologie concomitanti o a condizioni parafisiologiche quali lattazione, gravidanza, ecc si può assistere ad un cambiamento nella risposta linfocitaria dal tipo Th1 al Th2 che comporta la stimolazione del sistema umorale. Sono state avanzate ipotesi anche su altri fattori che favorirebbero questo fenomeno tra cui la concentrazione antigenica (più è alta più aumenta la probabilità di sviluppare una risposta di tipo Th2) nonché la co-stimolazione (alti livelli si associano ad una espansione clonale di Th2 notevole).

Questo evento caratterizza la fase terminale della malattia, in quanto gli anticorpi non riescono a contenere la diffusione del patogeno che provoca lesioni multiple diffuse, invalidanti e destruenti a più organi e apparati.

L'infezione tubercolare: i periodi

Periodo dell'infezione primaria in cui si ha la formazione del complesso primario (lesioni granulomatose che si formano nel punto di ingresso del patogeno e nei corrispondenti linfonodi regionali). Se interessa tessuto e linfonodi viene definito COMPLETO, se, invece, coinvolge solo i linfonodi si dirà INCOMPLETO.

A questo punto la lesione può andare incontro a diversi destini:

- Incapsulamento ed inibizione della moltiplicazione batterica con persistenza del microrganismo nei tessuti infetti (latenza)
- Guarigione
- Batteriemia che può a sua volta determinare

-*Generalizzazione precoce o acuta* la quale può esitare nella morte dell'animale per collasso delle resistenze o evolvere nel periodo post-primario

-*Generalizzazione protratta* che si differenzia dalla precedente per l'immissione in circolo per lunghi periodi (2-3 anni) di un ridotto numero di micobatteri. Dà origine alla forma NODULARE-NODOSA.

Reinfezione. Parliamo di reinfezione quando un soggetto viene nuovamente infettato in un lasso temporale successivo alla sua completa guarigione. L'evoluzione sarà perciò identica a quella dell'infezione primaria.

Periodo dei processi post-primari. E' caratterizzato da lesioni circoscritte ad un solo organo che diffondono localmente a lenta evoluzione ed ad andamento cronico. Può avere origini:

-esogene nel caso in cui l'animale entri nuovamente a contatto con escreti, secreti, materiale infetto o inalati polveri contenenti bacilli tubercolari. Tale condizione viene definita SUPERINFEZIONE.

-endogene per ESACERBAZIONE di focolai già esistenti ma quiescenti. I microrganismi diffondono attraverso vie endocanalicolari, endocavitarie preformate (dotti galattofori, dotti epatici, bronchi...) o per contiguità e continuità (tra lobo renale e lobo renale, dal peritoneo all'utero) in quanto né i vasi sanguigni né quelli linfatici sono interessati dal processo morboso. Infatti i linfonodi regionali degli organi colpiti non presentano alterazioni macroscopiche evidenti. Infine questo tipo di lesione non calcifica ma è per lo più tendente alla colliquazione.

Collasso delle resistenze. Si determina nel momento in cui il sistema immunitario dell'organismo-ospite raggiunge una condizione di anergia, di conseguenza i micobatteri diffondono indisturbati attraverso la via linfoematogena provocando lesioni e disfunzioni multiorgano che coinvolgono anche i rispettivi linfonodi (Guarda et al, 2005).

4.3-Patogenesi della paratubercolosi

Rispetto alla tubercolosi bovina dove non esiste un'età di maggiore suscettibilità il meccanismo patogenetico che sfrutta *M. paratuberculosis* per infettare l'ospite identifica un periodo di maggiore recettività alla malattia tra le 4-8 settimane di vita fino a sei mesi di età (Marcato, 2002). Mentre *M. bovis* si diffonde in modo prevalente per via aerogena e la sede più comune di infezione sono i polmoni ed i rispettivi linfonodi, la via più sovente utilizzata da *M.paratuberculosis* è quella **orale/alimentare** e l'organo target che viene interessato in sede primaria è l'**intestino**. Nei giovani soggetti, il colostro e il latte contaminato vengono trasportati direttamente in abomaso attraverso la doccia esofagea e l'ambiente acido di questo organo favorisce la solubilità del ferro legato alle lattoferrine aumentandone la biodisponibilità per il MAP. *M. paratuberculosis* è, infatti, caratterizzato da una peculiarità che lo contraddistingue anche dagli altri micobatteri: esso è privo di un sideroforo

(mycobactin) in grado di captare il ferro extracellulare (indispensabile per il metabolismo) dall'ambiente circostante e trasportarlo a livello intracellulare. I micobatteri transitano, quindi, lungo il duodeno, a livello del quale la biodisponibilità di ferro aumenta grazie all'azione di una reduttasi localizzata a livello dell'orletto a spazzola della mucosa e denominata citocromo b duodenale che trasforma il ferro ferrico in ferro ferroso onde favorirne il superamento passivo della barriera mucosale. Una volta giunti nell'ileo terminale sono veicolati dalle cellule M delle placche del Peyer (sottopopolazione del tessuto linfoide specializzato MALT) e trasportati a livello sub-epiteliale (Sweeney, 2011). L'adsorbimento alle cellule M avviene attraverso l'interazione tra un complesso di fibronectine batteriche ed integrine presenti sulla superficie delle cellule M (Quinn et al, 2012). Quest'ultime inoltre sarebbero sprovviste di lisosomi ed enzimi idrolitici permettendo un trasporto senza alterazioni (Miller et al, 2007). A livello sub-epiteliale i micobatteri vengono, quindi, fagocitati dai macrofagi e dalle cellule dendritiche e trasportati ai linfonodi satelliti (Momotami et al, 1988) (Fig.14). Una volta che il macrofago è stato colonizzato, il MAP, come tutti i micobatteri, tende ad eludere la distruzione intracellulare operata dagli enzimi lisosomiali e fagosomiali e dai prodotti derivati dall'ossigeno come l'ossido nitrico e lo ione superossido persistendo all'interno della cellula ospite ed utilizzandola come "cavallo di Troia" (Holstetter,2003; Sangri et al,1999; Schorey and Cooper, 2003). I macrofagi che riescono a processare l'antigene ed esporlo sulla superficie attivano i linfociti. In alcuni soggetti, una risposta immunitaria cellulo-mediata del tipo Th1, come avviene in corso di infezione tubercolare, risulta sufficiente per controllare l'invasione del batterio non permettendo lo sviluppo di segni clinici e dando vita ad un'infezione subclinica che persisterà per tutta la vita; in quei soggetti in cui si sviluppa una risposta di tipo Th2 promuovendo la sintesi delle interleuchine 4, 5 che favoriscono la risposta umorale (Siguroardottir et al, 2004) seguirà un'esacerbazione della malattia (Tiwari et al., 2006). Le placche del Peyer, che costituiscono quindi la porta d'ingresso del bacillo, presentano il massimo sviluppo anatomico-funzionale alla nascita per poi regredire con l'età (Vialard et al, 2003), il che spiega il motivo per cui la maggiore recettività alla malattia si ha quasi esclusivamente negli animali giovani.

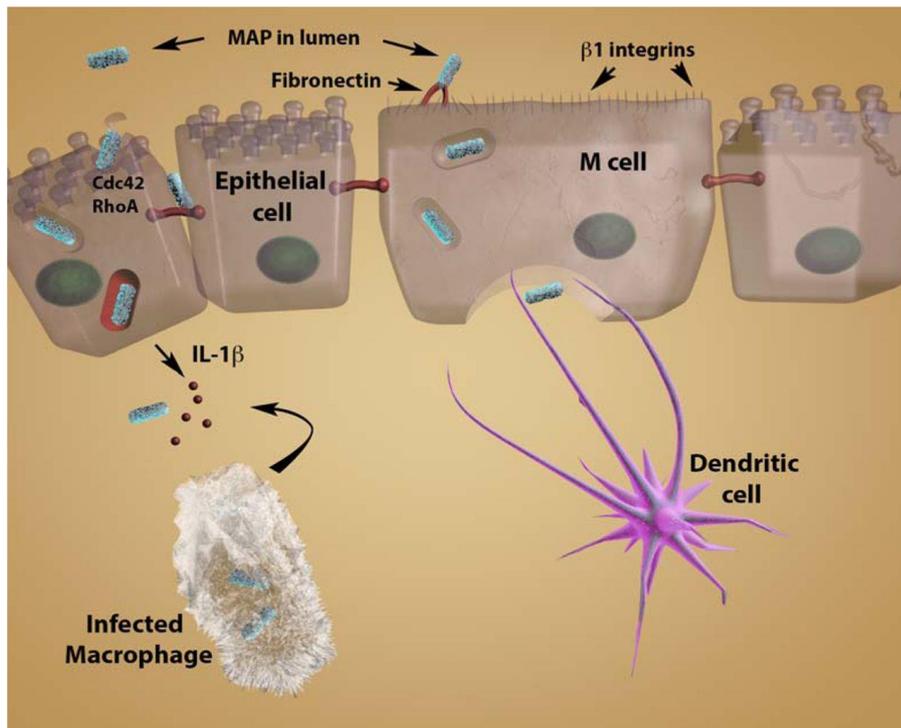


Fig.14. Penetrazione di *M. paratuberculosis* nella sottomucosa intestinale (Bannantine and Bermudez, 2013)

I soggetti che eccezionalmente contraggono la malattia in età adulta possono ugualmente divenire eliminatori ma con probabilità nettamente inferiori di manifestare la forma clinica (Vialard, 2003). Il periodo di incubazione varia dai diciotto mesi ai cinque anni e dipende dalla carica infettante iniziale e dalla suscettibilità dell'animale. Dal punto di vista isto-patologico, i primi segni di infiammazione si osservano approssimativamente al 45° giorno post-infezione e sono caratterizzati da piccoli granulomi costituiti dall'accumulo di macrofagi circondati da infiltrato linfocitario (Juste and Perez, 2011). Nei tessuti della parete intestinale di digiuno terminale ed ileo e nei linfonodi meseraici, che rappresentano gli organi bersaglio, il MAP può persistere per anni in stato di quiescenza all'interno dei macrofagi. La diffusione avviene per via linfatica, con il classico interessamento di mucosa, vasi linfatici e linfonodi meseraici, e per via ematica a cui segue il coinvolgimento di organi quali fegato, milza, utero, rene, mammella e gonadi maschili. In questo caso le lesioni che ne conseguono sembrerebbero di minima entità e del tutto eccezionali (Farina e Scatozza, 1988, Gwó et al, 1997; Hines et al, 1987).

5.METODICHE DIAGNOSTICHE DELLA TUBERCOLOSI BOVINA

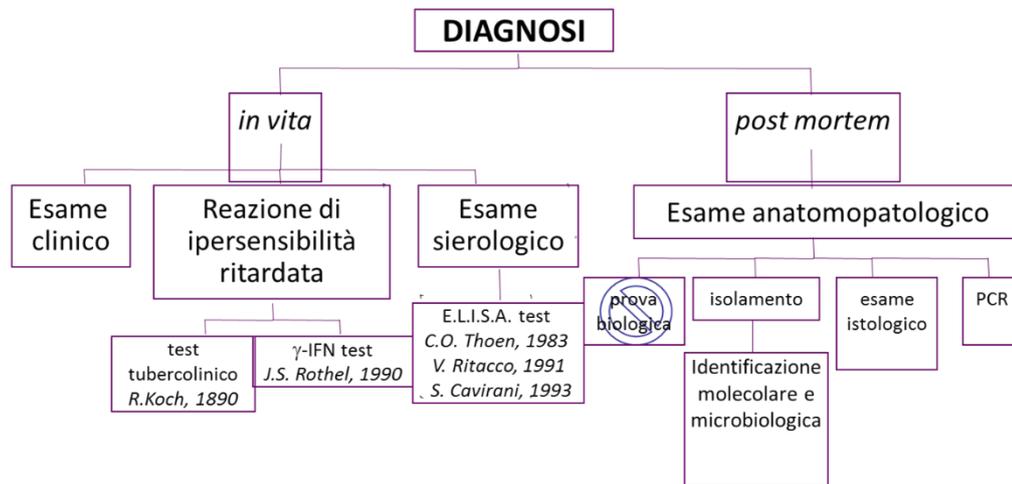


Fig.15. Tecniche diagnostiche utilizzate in caso di infezione da *M.bovis*

La strategia ottimale per il controllo della TB nel bovino e nelle altre specie animali si basa sulla rilevazione accurata, mediante appositi ausili diagnostici, degli animali infetti da *M.bovis* e sul loro successivo abbattimento.

Il test ufficiale utilizzato nei programmi di eradicazione di tutto il mondo è l'intradermoreazione (IDT) (OIE, 2009).

L'esattezza diagnostica di una prova è soprattutto definita nei termini della sua relativa sensibilità (SE) e specificità (SP), che sono calcolati, rispettivamente, dalle percentuali di animali infetti e non infetti correttamente diagnosticati.

In pratica la sensibilità è la proporzione di animali malati che risultano positivi al test mentre la specificità è espressa dalla proporzione degli animali sani fra quelli che risultano negativi al test (Bottarelli e Ostanello, 2011).

La prova ideale di screening dovrebbe avere il 100% di SE e SP ma nessuna prova diagnostica raggiunge questa percentuale e l'intradermoreazione non è un'eccezione.

TEST INTRADERMICO/ SKIN TEST

Si basa sulla risposta immunitaria all'inoculazione in sede intradermica di un preparato solubile denominato "Purified Protein Derivative" (PPD) derivato

dalla coltura in vitro di *M. bovis* nella forma singola; *M. bovis* e *M. avium* in quella comparata. I criteri di esecuzione ed interpretazione della prova diagnostica sono descritti nel Regolamento CE n. 1226/2002 (Allegato B). Tale test evidenzia tuttavia dei limiti legati alla sensibilità (più bassa rispetto al gamma interferon) a favore di una specificità pari al 99% (Goodchild et al, 2015), alle interferenze date dalla coinfezione con micobatteri del gruppo avium, dalle variazioni quali-quantitative delle PPD utilizzate.

TEST DEL GAMMA-INTERFERON (γ - IFN test)

Tale saggio in vitro basato sull'immunità cellulo-mediata venne sviluppato negli anni '90 da ricercatori Australiani per la diagnosi di TB in bovini di concerto all'IDT caudale (Wood e Rothel, 1994) e validato successivamente nelle condizioni di campo (Archetti et al., 1996; Wood et al., 1991). Il test si basa sulla presenza di linfociti T sensibilizzati in vivo verso antigeni di *M. bovis*/*M.avium* che una volta stimolati in vitro mediante tubercolina bovina(PPDB) ed aviaria(PPDA) secernono precocemente (da 2 a 4 settimane dall'infezione) ed in grandi quantità una linfocina il gamma-interferon (γ -IFN). Tale linfocina viene successivamente quantizzata in un saggio immunoenzimatico (ELISA a sandwich) con anticorpi monoclonali.

La prova del γ -IFN è commercializzata in un kit commerciale brevettato sotto il nome di Bovigam (Prionics, Svizzera) (Fig. 16).



Fig. 16. Confezione di Bovigam

Condizioni del campionamento:

- I campioni devono essere prelevati da animali non sottoposti a recente prova tubercolinica (DEVONO PASSARE DA 42 A 60 GIORNI DALL'ULTIMA PROVA);
- La quantità di sangue raccolta deve essere di almeno di 10 ml, è opportuno mantenere le condizioni di sterilità;
- L'anticoagulante della provetta di raccolta deve essere Litio eparina;
- I campioni devono giungere a laboratorio entro 8-12 ore dal prelievo, durante il trasporto i campioni non devono essere refrigerati o congelati.

Giorno 1:

- stimolazione del sangue intero con tuberculina PPD ed incubazione per 16 ore
- centrifugazione e raccolta del plasma

Giorno 2:

- esecuzione del saggio immuno-enzimatico ed interpretazione dei risultati.

Il saggio viene interpretato basandosi sul confronto tra la produzione dell'IFN- γ in seguito a stimolazione a tuberculina PPD bovina ed a tuberculina PPD aviare.

Positive = OD bovine PPD-nil antigen ≥ 0.1 **and**
OD bovine PPD – avian ≥ 0.1

Negative = OD bovine PPD – nil antigen < 0.1 **or**
OD bovine PPD- avian PPD < 0.1

Fig.17 Criterio interpretativo dei risultati secondo il kit Bovigam

L'impiego di questo esame in associazioni al test intradermico ha dato ottimi risultati in quanto consente di accelerare notevolmente i tempi della bonifica sanitaria in allevamenti sede di focolaio. Al tempo stesso ha rivelato un limite non trascurabile in quanto quest'ultimo deve essere effettuato entro tre ore, al massimo otto dal prelievo di sangue e questo nella pratica non sempre può essere assicurato.

L'analisi del γ -IFN è ampiamente considerata una prova più sensibile dell'intradermoreazione in quanto rileva una percentuale notevole di bovini infetti che sfuggono alla prova della tuberculina (Neill et al, 1994a; Monaghan et al, 1997; Wood e Jones, 2001; Pollock et al, 2005) dal momento che identifica gli animali in una fase più precoce dell'infezione rispetto all'intradermoreazione (Pollock et al, 2005).

Sia il γ -IFN che l'intradermoreazione non rilevano i bovini infetti che versano in uno stato di depressione della risposta immunitaria cellulo-mediata (anergia) ovvero negli stadi più avanzati della malattia (Fig.18).

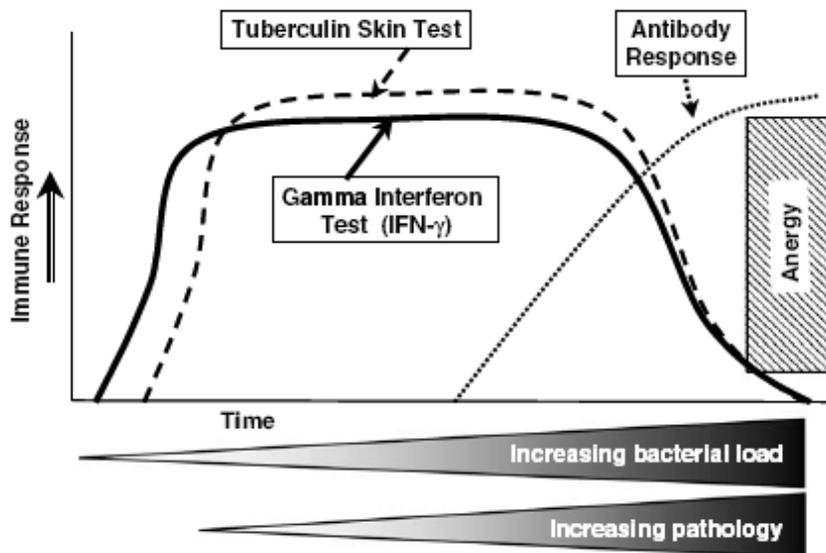


Fig.17. Test diagnostici e risposta immunitaria

Il principale motivo per cui la prova dell'IFN- γ non viene utilizzata per lo screening di massa nella diagnosi della TB è che in un Paese o in una regione dove la prevalenza di TB animale è bassa (come spesso succede nei paesi sviluppati), si rischierebbe di dover macellare un numero troppo alto di bovini non infetti (Monaghan et al, 1997; Lauzi et al, 2000; Pollock et al, 2001).

Attualmente questo test può essere utilizzato di routine come ausilio alla prova dell'intradermoreazione comparata sui bovini risultati reattivi alla IDT cervicale in allevamenti indenni dall'infezione (prova in serie) oppure in parallelo con l'IDT cervicale in allevamenti infetti per eliminare il più precocemente possibile un maggior numero di positivi ed impedire che l'infezione si diffonda in allevamento.

I vantaggi del test possono essere così riassunti:

- può essere ripetuto;
- vi è un unico ingresso del Veterinario Ufficiale in stalla con un notevole risparmio dei costi;
- può essere accorpato ad altri interventi di profilassi (brucellosi, leucosi);
- è più sensibile, ma in genere meno specifico dell'intradermoreazione, anche se la specificità può essere modulata intervenendo sulle soglie di reazione e sugli antigeni impiegati, in funzione dello status zoonosanitario dell'azienda e della situazione epidemiologica sul territorio;

- segue procedure standard e non risente dei problemi legati alla soggettività della lettura da parte dell'operatore;
- ha tempi rapidi di esecuzione (referto in 24 ore).

Inoltre si è rivelato uno strumento estremamente utile per svelare la presenza di tubercolosi negli allevamenti in cui vengono praticati trattamenti fraudolenti atti a mascherare la reazione intradermica ufficiale poichè non risente dei trattamenti immunosoppressori.

Il test mostra anche alcuni limiti importanti:

- la reattività dei capi infetti non è costante nel tempo ma il test rappresenta una “fotografia” della risposta sistema immunitario in quel dato frangente
- vi può essere secrezione aspecifica di gamma-interferon (sangue prelevato durante infezioni virali o esposto ad endotossina batterica nelle provette)
- la co-infezione da micobatteri del gruppo avium/intracellulare può diminuire la sensibilità e la specificità del test così come accade nell'intradermoreazione (Alvarez et al, 2009)
- il test necessita di estrema accuratezza nell'esecuzione dell'analisi
- il test risente di variazioni nella composizione quali-quantitativa delle tuberculine PPD impiegate (Guarda e Bollo, 2005).

ALTRE PROVE DIAGNOSTICHE AUSILIARIE

ELISA

Oggi il limite dei test per la rilevazione di anticorpi specifici nel siero è quello di essere altamente specifici ma molto meno sensibili del test PPD. Allo stato attuale non è stato ancora individuato un cocktail antigenico ottimale per lo sviluppo di un saggio ELISA (Banerjee et al, 2003). Pertanto tali test immunologici possono essere utilizzati come strumenti di indagine accessori, non sostitutivi dei saggi di immunità cellulo-mediata in vivo ed in vitro. Il problema più rilevante da un punto di vista pratico è la calibrazione dei livelli di sensibilità e specificità di tali test in funzione degli antigeni diagnostici prescelti, ovvero conciliare due esigenze che, nel caso dell'infezione da *M. bovis*, risultano fortemente contraddittorie.

DIAGNOSI POST MORTEM DI TUBERCOLOSI BOVINA

Iter diagnostico tradizionale di tubercolosi bovina

In Italia gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali sono coinvolti nella diagnosi di tubercolosi bovina per quanto riguarda gli eventuali approfondimenti

diagnostici post mortem, ritenuti necessari dopo una prova tubercolinica dubbia o per conferma di lesioni sospette al macello.

Tre sono le sedi fondamentali per l'attività di sorveglianza ed eradicazione della tubercolosi bovina:

- 1) l'allevamento con la prova di intradermoreazione;
- 2) il macello con l'ispezione delle carcasse, dei visceri ed il prelievo dei campioni;
- 3) il laboratorio con l'esecuzione e l'interpretazione delle prove diagnostiche.

Il D.M. 592/95 concernente il Piano Nazionale per l'eradicazione della tubercolosi negli allevamenti bovini e bufalini riconosce le prove diagnostiche ufficiali, delinea le tecniche di isolamento ed identificazione dei micobatteri, e propone l'utilizzo di tecniche istopatologiche, immunoistochimiche e molecolari per l'evidenziazione delle lesioni e di eventuali micobatteri su materiale fresco e tessuti fissati di animali macellati.

Esame istologico

Si esegue su campioni di linfonodi ed organi che vengono conferiti con il sospetto di tubercolosi eseguendo dapprima un esame ispettivo d'insieme e quindi una serie di tagli trasversali a distanza di pochi millimetri uno dall'altro, al fine di evidenziare eventuali lesioni miliari. Viene successivamente campionata una sezione per ciascun linfonodo ed organo comprendente le lesioni macroscopiche osservate.

In assenza di lesioni riconoscibili, si campiona almeno una sezione di linfonodo od organo inviato.

Secondo le normali tecniche istologiche si procede all'inclusione in paraffina e si eseguono delle sezioni seriate (almeno 4); una sezione verrà colorata con Ematossilina-Eosina e le rimanenti tre con colorazione Ziehl-Neelsen.

Se l'osservazione al microscopio della sezione colorata con Ematossilina-Eosina rivela la presenza di lesioni granulomatose compatibili con micobatteriosi, si procede all'osservazione dei vetrini colorati secondo la Ziehl-Neelsen per identificare la presenza/assenza di batteri acido resistenti. Attualmente la colorazione con Auramina in fluorescenza viene spesso affiancata alla Ziehl-Neelsen perché ritenuta più sensibile, anche se il metodo in fluorescenza non è ancora stato sostituito nell'ambito delle procedure ufficiali.

Esame colturale

I campioni che pervengono alle sezioni diagnostiche degli IZS per la conferma di tubercolosi possono appartenere alle seguenti tipologie:

1. animali regolarmente macellati in cui sono state riscontrate lesioni sospette per tubercolosi;
2. animali sospetti per tubercolosi con prove diagnostiche in vita positive o dubbie;
3. animali provenienti da allevamento con focolaio aperto che possono o non possono presentare lesioni sospette per tubercolosi.

In presenza di lesioni compatibili con la tubercolosi bovina (tubercolosi –like), vengono prelevati l'organo sede di lesione ed il linfonodo tributario.

In assenza di lesioni evidenti sono prelevati i seguenti linfonodi: retrofaringei, mediastinici, peribronchiali, meseraici, sopramammari, mesenterici, mandibolari; per un quadro diagnostico maggiormente informativo possono essere prelevati anche amigdale e fegato.

Nel caso in cui il campione presenti una piccola lesione si utilizza in toto per la preparazione dell'estratto. Viceversa se si tratta di lesioni caseose estese, è opportuno utilizzare le zone esterne marginali o di connettivizzazione evitando di prelevare il materiale necrotico che potrebbe interferire con l'esito della prova.

Il materiale prelevato, opportunamente sminuzzato, viene decontaminato con sodio idrossido dal 2% al 4% per 30 minuti a 37°C; successivamente si aggiunge un tampone fosfato (pH 6,8) per neutralizzare l'alcalinità della miscela.

L'estratto così ottenuto viene centrifugato a 3000 rpm per 15 minuti eliminando il surnatante e controllando che il pH del sedimento si aggiri intorno al valore 7.

Una volta ottenuto l'estratto centrifugato si può procedere con il protocollo di isolamento su terreno solido come indicato nell'Allegato 2 del Decreto del Ministero della Sanità 15 dicembre 1995, n. 592, seminando 0,2-0,5 mL di materiale su terreni solidi a base d'uovo, quali Lowestein-Jensen (LJ) e Stone brink (ST), oppure mediante sistemi di isolamento automatizzati basati sull'utilizzo di terreni liquidi selettivi per micobatteri (OIE, 2010).

L'incubazione dei terreni, sia quelli tradizionali sia il terreno liquido, avviene alla temperatura di 37°C per un periodo variabile e fino ad otto settimane in caso di negatività del campione.

Il rilevamento diretto di micobatteri appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis complex* mediante PCR può essere effettuato direttamente da estratto di linfonodo sia con kit commerciali che con kit “in-house”, ma sempre in parallelo all’esame colturale indicato come esame di riferimento per la conferma diagnostica di tubercolosi (OIE, 2010).

Identificazione

Una volta isolati i microrganismi acido-resistenti, viene eseguita l’identificazione che permette di distinguere i microrganismi appartenenti al genere *Mycobacterium*, identificare i micobatteri appartenenti al gruppo *M. tuberculosis complex*, *M. avium* o altri micobatteri. L’identificazione viene eseguita generalmente mediante prove molecolari con reazione a catena della polimerasi (polymerase chain reaction – PCR).

Tipizzazione molecolare

A partire dagli anni ’90 i metodi di indagine tradizionale sono stati affiancati dalle nuove strategie basate sul rilevamento e sull’analisi degli acidi nucleici. In particolare l’introduzione della reazione polimerasica a catena (polymerase chain reaction – PCR) (Mullis e Faloona, 1987) definita come una reazione di amplificazione in vitro di un segmento specifico di DNA per mezzo di una DNA polimerasi (Marin, 1999), o di altri sistemi di amplificazione alternativi quali il “transcription-mediated amplification system” descritto da Kwoh et al. (1989) e la Ligase Chain Reaction (LCR) (Barany, 1991; Leckie e Lee, 1995) hanno permesso lo sviluppo di numerosi kit commerciali per l’evidenziazione del gruppo *M. tuberculosis complex* (MTC) in campioni clinici, che pur essendo rapidi e poco indaginosi (Scarparo et al, 2000), non sono riusciti a sostituire con la stessa affidabilità e sensibilità l’isolamento di *M. bovis* da campioni di linfonodo e/o organi (OIE, 2009; Roring et al, 2000; Wards et al, 1995). Questo perché la procedura di estrazione del DNA, passaggio essenziale per l’applicazione di reazioni PCR, è complicata dall’elevato contenuto lipidico della parete dei micobatteri e dalla difficoltà fisica di omogeneizzare i campioni di linfonodo. Tuttavia i metodi molecolari si sono mostrati molto utili per scopi identificativi e/o di tipizzazione a partire dal ceppo isolato in alternativa ai metodi biochimici tradizionali per la loro maggiore rapidità e capacità differenziativa (Kulski et al, 1995), anche se l’elevata omologia genomica esistente all’interno di MTC, comprendente *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti* (van Soolingen et al, 1997) *M. bovis subspecie caprae* (Aranaz et al, 1999) e *M. pinnipedii* (Cousins et al, 2003), ha reso difficile la differenziazione delle specie appartenenti a questo gruppo.

Infatti per selezionare markers genetici informativi e sviluppare test molecolari affidabili per la loro identificazione si è dovuto attendere il sequenziamento dell'intero genoma di *M. tuberculosis* (Cole et al, 1998) e *M. bovis* (Garnier et al, 2003) e gli studi di genomica comparativa (Brosch et al, 1998) che hanno messo in evidenza la perdita di materiale genetico tra *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* attraverso delezioni successive di regioni cromosomiche denominate Loci RD; tali loci hanno una diversa distribuzione nelle specie di MTC ed hanno permesso di definire un albero filogenetico evolutivo del gruppo (Brosch et al, 2002) e di sviluppare sistemi di identificazione costituiti da un insieme di reazioni PCR (Huard et al, 2003; Parsons et al, 2002).

In realtà lo studio di regioni polimorfiche del genoma di *M. tuberculosis* era già avvenuto negli anni '80 ed aveva permesso l'introduzione di metodi molecolari di tipizzazione dei ceppi isolati ed avviato studi filogenetici ed epidemiologico-molecolari. In particolare l'identificazione dell'elemento d'inserzione IS 6110 nel genoma di *M. tuberculosis* presente in un numero di copie superiore alle 10 nella maggior parte degli isolati (Eisenach et al, 1988; Hermans et al, 1990) e la standardizzazione della sua analisi RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (van Embden et al, 1995) è ancora oggi considerato uno dei metodi di riferimento per studi epidemiologico-molecolari della tubercolosi umana.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

La metodica di genotipizzazione degli isolati di *M. tuberculosis* si basa sulla presenza, all'interno del genoma batterico, della sequenza di inserzione IS 6110.

IS 6110 è una sequenza di 1361 basi (pb) in grado di duplicarsi e di spostarsi all'interno del genoma di *M. tuberculosis*. E' possibile riscontrarne fino a 25 copie anche se nella maggioranza dei ceppi il numero è compreso tra 5 e 20.

Il polimorfismo di questa sequenza è dato dalla variabilità del numero e dalla posizione degli elementi IS 6110 all'interno del genoma di ceppi diversi.

La metodica prevede l'analisi del polimorfismo di lunghezza dei frammenti di DNA prodotto per digestione enzimatica. La genotipizzazione basata sull'elemento IS 6110 è una tecnica complessa che richiede grandi quantità di DNA ottenibili solo da colture rigogliose, in quanto non si effettua l'amplificazione tramite PCR.

Essa si presta quindi poco ad applicazioni cliniche, ambito in cui la rapidità diagnostica è di cruciale importanza. È inoltre una metodica costosa che richiede, per una corretta interpretazione, l'utilizzo di software sofisticati.

Il potere discriminatorio e la riproducibilità del RFLP di IS 6110 sono talmente elevati che gli isolati che hanno pattern differenti riguardano sicuramente pazienti epidemiologicamente non correlati, mentre gli isolati di soggetti infettati dalla stessa fonte hanno profili identici o molto simili. Inoltre tale tecnica non dà risultati epidemiologicamente utili con i ceppi che hanno un numero di elementi IS 6110 inferiore a cinque, dato che il polimorfismo è in questi casi limitato.

Dal momento che *M. bovis* possiede solo una singola copia dell'elemento IS 6110, è molto improbabile riuscire a differenziare gli isolati di questa specie con questa metodica (Kamerbeek et al, 1997; Roring et al, 2002).

Questo ha portato all'introduzione di metodi alternativi di tipizzazione come lo Spoligotyping (Spacer Oligonucleotide Typing) descritto da Kamerbeek et al, (1997) o l'analisi VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) descritta da Frothingham e Meeker-O'Connell (1998).

Spoligotyping

Lo Spoligotyping è un metodo semplice e rapido per la simultanea individuazione e tipizzazione di *Mycobacterium tuberculosis complex* in coltura e malgrado abbia mostrato una capacità limitata di differenziazione, rappresenta la prima tecnica basata sulla reazione PCR largamente accettata per la tipizzazione di *M. bovis*.

Esso si basa sul rilevamento della presenza o dell'assenza, nel locus DR (Direct Repeat) di *M. tuberculosis complex*, di sequenze spaziatrici "spacers" intercalate tra sequenze DR. Il locus DR è una regione genomica presente in tutti i micobatteri appartenenti al *M. tuberculosis complex* che contiene da 9 a 50 elementi ripetuti della sequenza DR, costituite da 36 pb separate da sequenze spaziatrici chiamate "spacers" la cui lunghezza varia da 34 a 41 pb. I pattern polimorfici, indicati come spoligotipi, variano in base al numero di DR e per la presenza o assenza di particolari spaziatori. Il metodo prevede l'amplificazione tramite PCR dell'intera regione DR, il DNA ottenuto può essere direttamente utilizzato per l'ibridizzazione su una membrana su cui sono covalentemente immobilizzate sonde oligonucleotidiche specifiche per tutte le sequenze spaziatrici note. Poiché gli isolati di *Mycobacterium tuberculosis complex* differiscono per la presenza od assenza delle varie sequenze spaziatrici, i ceppi di micobatteri possono essere differenziati in base al loro

diverso “pattern” di ibridizzazione. Lo Spoligotyping utilizza l’amplificazione e non richiede quindi grandi quantità di DNA; questo rende possibile l’esecuzione del test direttamente da colture o da poche unità batteriche presenti in una coltura. Esso è caratterizzato da risultati, espressi come presenza od assenza dei singoli spacers, che sono facilmente convertibili in codici numerici. Paragonato al tradizionale RFLP IS 6110, il grado di differenziazione di *Mycobacterium tuberculosis complex* attraverso Spoligotyping è più basso per ceppi che portano cinque o più copie di IS 6110. Tuttavia quando il numero di copie di IS 6110 è minore di cinque, il potere discriminatorio dello Spoligotyping è maggiore (Kamerbeek et al, 1997; Boniotti et al, 2009).

MIRU-VNTR (Mycobacterial interspersed repetitive units-Variable number of tandem repeat)

Si tratta di sequenze ripetute simili a minisatelliti eucariotici uguali tra loro o leggermente differenti, che spesso differiscono nel numero di copie tra gli isolati. In particolare *Mycobacterium tuberculosis* contiene 41 diversi loci MIRU che presentano sequenze ripetute di lunghezza variabile tra 40 e 100 pb. La tecnica ETR e MIRU-VNTR, in entrambi i casi, si basa sull’amplificazione dei loci mediante PCR, il prodotto della PCR viene poi analizzato su gel di agarosio: la dimensione dei loci, desunta dalla posizione delle bande sul gel, fornisce l’indicazione del numero di unità ripetute presenti in ogni locus testato. Generalmente si analizzano per la tipizzazione un set variabile di loci che consentono di discriminare i diversi ceppi di Micobatteri. Questo metodo è utile nel caso in cui ci si trovi in presenza di isolati batterici con un basso numero di copie IS 6110 ed è molto più discriminatorio dello spoligotyping.

Inoltre i risultati, essendo espressi mediante sequenze numeriche, possono essere facilmente confrontati e memorizzati in database elettronici.

Semplicità di esecuzione, alto potere discriminatorio e possibilità di automatizzazione, la rendono una delle tecniche di maggiore applicazione in futuro (Boniotti et al, 2009; Frothingham e Meeker-O’Connell, 1998).

6.METODICHE DIAGNOSTICHE PARATUBERCOLOSI

Uno degli aspetti più ostici da superare dal punto di vista diagnostico è il cosiddetto “periodo finestra”, ovvero il periodo nel quale l’animale infetto è in grado di eliminare

il batterio ma non è ancora avvenuta la sierconversione. Tale fase varia da individuo ad individuo.

Non esiste un test ufficialmente riconosciuto come ottimale per la diagnosi di tale patologia tuttavia si può scegliere il test più idoneo in relazione allo stadio dell’infezione ovvero i test che si basano sull’immunità cellulo-mediata sono da preferire in corso di sospette infezioni latenti o recenti (Serraino et al, 2014).

ESAME MICROSCOPICO

E’ un esame diretto che si effettua su campioni di tessuti (es. intestino) o materiale biologico quale feci attraverso l’utilizzo della colorazione Ziehl Neelsen.

Il risultato è considerato positivo quando sono presenti uno o più gruppi di batteri (ciascuno formato da almeno tre batteri) di dimensioni di 0,5-1,5 µm (OIE, 2008). Tale metodica è economica e di veloce attuazione ma non permette l’identificazione di specie (Redaelli, 1998).

Se un animale risultato negativo all’esame microscopico potrebbe non essere ancora eliminatore o essere un eliminatore intermittente.

Questo test in genere si riserva come conferma di casi clinici con il supporto di PCR, colturale e test ELISA (Arrigoni, 2008).

ESAME COLTURALE

La coltura del MAP su terreno è il “gold standard” per l’identificazione degli animali eliminatori. La metodica si basa sulla messa in coltura dei micobatteri su specifici terreni nei quali viene aggiunta la micobactina. La coltura fecale è in grado di rilevare animali infetti 6 mesi prima che si sviluppino segni clinici e durante la fase clinica la sua sensibilità si avvicina al 100% (OIE, 2008).

Sono disponibili due metodi principali per la coltura:

-il metodo che utilizza acido ossalico e NaOH per la decontaminazione e Löwenstein-Jensen (LJ) come terreno di crescita;

il metodo con cloruro *esadecilpiridinio* (HPC) per la decontaminazione in combinazione con terreno Herrolds con tuorlo d'uovo (Herrolds Egg Yolk Medium, HEYM) per la crescita. Entrambi i mezzi contengono mycobactina (OIE, 2008).

La metodica prevede l'utilizzo di campioni tissutali o fecali, ma sono utilizzabili anche sangue, latte e liquido spermatico. Il successo dell'isolamento del micobatterio da tali campioni è strettamente correlato all'inattivazione efficiente di microrganismi contaminanti presenti nei campioni. Il metodo ottimale di decontaminazione deve avere il minimo effetto inibitorio sulla crescita di MAP.

L'esame colturale fornisce un risultato sia di tipo qualitativo sia di tipo semi-quantitativo.

In base al numero di colonie riscontrate si possono distinguere:

- <10 UFC/provetta: "low shedder";
- da 10 a 49 UFC/provetta: "moderate shedder";
- da 50 a 99 UFC/provetta: "high shedder";
- >100 UFC/provetta: "super shedder".

Dall'altra parte l'elevato costo, i lunghi tempi di attesa (3-4 mesi), e la possibilità di contaminazioni da parte di muffe e altri batteri sono le caratteristiche negative (Arrigoni, 2008).

Sistemi alternativi di coltura sono il **BACTEC e MGIT**.

Il sistema BACTEC prevede una coltura radiometrica dove la crescita avviene in mezzo liquido BACTEC™ 12B (Middlebrook 7H12) integrato con tuorlo d'uovo nel quale è presente una sostanza radioattiva che marca CO₂ sintetizzata dal batterio. Uno speciale strumento ne rileva la quantità prodotta (OIE, 2008). E' perciò basato sull'utilizzo di sostanze radioattive per cui non è possibile utilizzarlo in alcuni laboratori ed è stato eliminato in altri. Ha, inoltre, un costo elevato (OIE, 2008).

Il Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) è costituito da un terreno liquido con all'interno delle sostanze nutritive utilizzate dal microrganismo per scopi metabolici. Il metodo di rilevamento della CO₂ prodotta in questo caso è fluorimetrico

La metodica è veloce ed automatizzata ma i costi sono molto elevati e ne limitano l'utilizzo.

POLIMERASE CHAIN REACTION (PCR)

La metodica è basata sulla ricerca di uno specifico frammento genetico, ovvero la sequenza d'inserzione IS900, specifica del MAP, su differenti matrici biologiche (latte, feci, tessuti) (OIE, 2008). Attualmente la metodica PCR più utilizzata per la ricerca di MAP è la Real Time PCR, che permette una valutazione quali-quantitativa del campione analizzato con conseguente maggiore sensibilità e specificità (Slana et al, 2008b). La notevole analogia tra IS900 e sequenze genomiche di micobatteri diversi dal *M. paratuberculosis* (Englund et al, 2002) ha portato alla valutazione dell'utilizzo di altri frammenti genici esclusivi del MAP e presenti in singole copie (IS900 ha un numero variabile di copie in genere superiore a 10) nel genoma. Tra questi annoveriamo l'elemento F57, l'elemento HspX, presenti in singola copia nel genoma di MAP, e l'elemento ISMav2, presente in tre copie (Slana et al, 2008b).

L'utilizzo di sequenze diverse da IS900 riduce la sensibilità ma è meno incline a dare falsi positivi ed è molto più accurato nella quantificazione. Lo svantaggio dei metodi PCR è che non è possibile distinguere tra i micobatteri vitali e quelli non vitali presenti nel campione (Slana et al, 2008b).

FISSAZIONE DEL COMPLEMENTO (FDC)

La fissazione del complemento funziona bene sugli animali con sintomi clinici ma non ha una specificità sufficiente per un suo utilizzo nei piani di sorveglianza. Le procedure di FdC utilizzate a livello internazionale sono molteplici (OIE, 2008).

ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

L'ELISA è, allo stato attuale, è uno dei test più utilizzati per la diagnosi della paratubercolosi. La sensibilità è maggiore per i soggetti con sintomi clinici e la specificità si attesta intorno al 95% (Bher, 2010). Il test ELISA è in grado di rilevare circa 30-40% degli animali risultati infetti da esami colturali di feci inoculati su terreni solidi (OIE 2008). Analogamente ai metodi colturali, la sensibilità del test ELISA varia in base all'età degli animali (OIE, 2008). I vantaggi di questo test sono molteplici e vanno dalla tipologia di campione utilizzato (latte, siero) alla rapidità dei risultati ottenuti. Inoltre tale test fornisce risultati di tipo quantitativo forniti dal "rapporto Sample/Positive ratio" (S/P). Il valore S/P ratio corrisponde ad un rapporto tra il numeratore che è costituito dalla differenza tra la densità ottica del campione e la densità ottica del controllo negativo, ed il denominatore ovvero la differenza tra la densità ottica del

controllo positivo e quella del controllo negativo. In base ai risultati ottenuti è possibile stabilire perlomeno tre differenti classi di animali positivi: low, medium e strong (Collins, 2011). Tuttavia il test si fonda sulla risposta anticorpale che compare tardivamente nel decorso della malattia per cui il rischio maggiore è quello di ottenere molti falsi negativi (Tiwari et al, 2006).

IMMUNO DIFFUSIONE IN GEL DI AGAR (AGID)

Il test AGID è utile per la conferma di animali clinicamente sospetti ed offre una sensibilità e specificità superiori a quelle del test ELISA (OIE, 2008).

Le piastre sono valutate dopo 24-48 h e si contano le linee di precipitazione 2-3 sono indicative di un controllo positivo (OIE, 2008). Questo tipo di test è rapido ed economico e può essere utilizzato per la conferma di un caso clinico (Arrigoni, 2008).

TEST INTRADERMICO DI IPERSENSIBILITÀ RITARDATA

Il test cutaneo si basa sulla misurazione di una reazione di ipersensibilità ritardata ottenuta in seguito all'inoculazione intradermica di uno specifico antigene. La prova ricalca in tutto e per tutto quanto eseguito per la tubercolosi bovina. Gli antigeni utilizzati sono stati la PPD aviare o la johnina tuttavia il riscontro di una positività è piuttosto comune sicché la specificità risulta bassa (OIE, 2008). Questo test trova quindi utilizzo nel valutare la diffusione del patogeno in allevamento (Arrigoni, 2008).

TEST DEL GAMMA INTERFERONE

Il principio immunologico su cui si basa e la procedura sono le medesime di quelle eseguite per la tubercolosi bovina. A differenza di quest'ultima però i risultati ottenuti in termini di sensibilità e specificità non sono costanti. Nei bovini la specificità del test riportata varia dal 94% al 67% a seconda dei criteri di interpretazione (OIE, 2008). Questa estrema variabilità non la rende una prova affidabile in termini diagnostici.

7.MATERIALI E METODI

Il disegno sperimentale prevedeva l'applicazione del medesimo protocollo nella specie bovina e caprina al fine di individuare eventuali analogie o differenze tra due specie suscettibili ad entrambe le infezioni (tubercolosi bovina, paratubercolosi).

7.1 INDIVIDUAZIONE DI AZIENDE CAPRINE E BOVINE UFFICIALMENTE INDENNI DA TUBERCOLOSI E PARATUBERCOLOSI

Questa fase ha permesso di individuare, utilizzando i test d'elezione intra-vitam per la tubercolosi (IDT, γ -IFN) e la paratubercolosi (ELISA, esame colturale dalle feci), 2 aziende (e quindi soggetti) idonee (una caprina ed una bovina) in cui effettuare il prelievo di midollo ovvero animali tubercolosi e paratubercolosi free il cui sistema immunitario non fosse stato compromesso da tali patologie. Tale obiettivo è stato raggiunto tramite uno studio approfondito delle informazioni epidemiologiche in nostro possesso grazie al quale sono stati individuati un gruppo di allevamenti bovini e caprini ufficialmente indenni da tubercolosi e situati in un'area Tb-free da almeno 10 anni, su cui era stato eseguito il controllo ufficiale da parte dei Servizi Veterinari competenti per il territorio (bovini). E' stato quindi effettuato il prelievo di sangue su tutti i soggetti di entrambe le specie, da destinare al saggio del gamma interferone ed al test ELISA. Contestualmente è stato prelevato un campione di feci di massa per l'esame colturale. I test sono stati eseguiti seguendo le procedure indicate nel kit per quanto riguarda l'IFN- γ (BOVIGAM, PRIONICS) ed il test ELISA (ID screen ELISA, ID-VET). L'esame colturale sulle feci è stata condotta applicando una POS (procedura operativa standard) accreditata secondo il sistema qualità ACCREDIA in vigore presso il centro di referenza della paratubercolosi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna.

7.2 PRELIEVO MIDOLLO OSSEO

All'interno degli allevamenti sono stati individuati tre soggetti per specie sulla base di un esame obiettivo generale, anamnesi, età e stato fisiologico (lattazione, gravidanza, asciutta). I candidati idonei dovevano godere di un buono stato di salute e nutrizione con una body condition score (BCS) compresa tra 3 e 4, un 'età compresa tra i 18 mesi ed i 2 anni, non essere gravidi né in lattazione al momento del prelievo. Su ciascun animale selezionato veniva effettuato un prelievo di 10 ml circa di midollo osseo, per un

totale di 30 ml per specie. Nonostante in letteratura venga citato lo sterno quale sito idoneo nella specie bovina (Van Merris et al, 2001) in questo esperimento è stato giudicato ottimale quello comunemente utilizzato nella specie canina (Townsend, 2008) ovvero la cresta iliaca poiché di più facile accesso negli animali adulti. Veniva quindi eseguita la tecnica di prelievo attraverso le seguenti fasi:

- accurata tricotomia, pulizia e disinfezione della parte,
- anestesia locale mediante l'uso di lidocaina al 10% per via sottocutanea al fine di anestetizzare i tessuti soprastanti il tessuto osseo,
- incisione dei tessuti anestetizzati mediante l'ausilio di un bisturi al fine di creare una piccola breccia operatoria di appena un centimetro in cui inserire il mandrino e l'ago da biopsia (BIOMID) di misure differenti a seconda della specie: 9 G x 10 cm per le capre e 13G x 11cm per i bovini. Una volta inserito il mandrino si procedeva alla rottura delle trabecole ossee ed all'aspirazione. Il midollo prelevato veniva quindi immediatamente travasato in provette contenenti EDTA per impedirne la coagulazione e trasportato in laboratorio a temperatura ambiente in contenitori isoterfici (max 4 -6 h dall'avvenuto prelievo).



Fig.18. Prelievo midollo osseo nella specie caprina

7.3 ALLESTIMENTO DELLA COLTURA MACROFAGICA

Il midollo prelevato è stato processato poi in laboratorio adottando il protocollo di Trouplin et al, 2013 per la differenziazione delle cellule totipotenti in monociti-macrofagi e modificandolo in base alle nostre esigenze. Il medesimo protocollo è stato utilizzato sia per la specie bovina che per quella caprina.

1-Filtrare il midollo prelevato (circa 10 ml) con filtri da 70 μm al fine di rimuovere eventuali frammenti ossei o piccoli coaguli e raccogliere il filtrato in una provetta Falcon da 15 ml

2-Centrifugare a 450 g per 10 min a 4°C in provette Falcon

3-Eliminare gentilmente il surnatante

4-Risospendere il pellet in 10 ml di *Red Blood Lysis Buffer* (rapporto lysis buffer – pellet di 1:1), al fine di rimuovere i globuli rossi per massimo 2 minuti. Lasciare il buffer per più tempo a contatto con le cellule rischia di danneggiarle.

5-Centrifugare a 450 g per 10 minuti a 4°C ed eliminare il surnatante

6-Ripetere l'operazione descritta al punto 4 e 5, per 3 – 4 volte, fino a quando il surnatante non risulterà chiarificato

5-Risospendere il pellet in 20 ml di terreno di coltura DMEM/F12 Glutamax antibiotato 1X freddo.

6-Centrifugare a 450 g per 10 minuti a 4°C ed eliminare il surnatante.

7-Risospendere il pellet ottenuto in 20 ml di DMEM/F12 Glutamax antibiotato 1X, contenente il 10% di Siero Fetale Bovino (SFB) pre-riscaldato a 37°C.

8-Distribuire la sospensione cellulare ottenuta in 2 o più fiaschette per colture cellulari da 25 cm².

9-Incubare a 37°C e 5% CO₂ overnight.

10-Dopo 24 h, prelevare il surnatante dalle fiaschette e porlo in provette Falcon da 15 ml. Il surnatante contiene le cellule totipotenti da differenziare.

11-Eliminare o conservare per ulteriori esperimenti le fiaschette che contengono i macrofagi residenti (già differenziati) adesi sul fondo (Grazie alla capacità di aderire al supporto plastico i macrofagi residenti possono essere separati dal resto della popolazione cellulare che invece verrà sottoposta alle prove di differenziazione).

12-Quindi, operando sul surnatante prelevato, centrifugare a 450 g per 10 minuti e risospendere il pellet ottenuto in 10 ml di DMEM/F12 antibiotato 1X e arricchito con il 10% di SFB e il 15% di medium condizionato dalla linea cellulare L929 di topo. Tale medium risulta ricco di M-CSF, fondamentale per la differenziazione delle cellule totipotenti in cellule della linea monocito-macrofagica). E' stato condotto un esperimento parallelo utilizzando M-CSF umano in quantità di 10 µg/ml. Tuttavia il risultato migliore in termini di differenziazione è stato ottenuto con il prodotto della linea cellulare L929.

13-Filtrare la sospensione cellulare attraverso un filtro da 40 µm

14-Recuperare il filtrato (circa 10 ml) ed addizionarlo a 140 ml di DMEM/F12 antibiotato all'1% e arricchito con 10% di FCS contenente il 15% di medium condizionato (da L929).

15-Distribuire la sospensione cellulare in fiaschette per coltura cellulare di 25 cm². Eseguire le prove di sterilità seminando una piccola aliquota di surnatante in Agar Sangue, Plate Count Agar (PCA) ed Agar Sabouraud entro 24-48 h dalla messa in coltura. Aggiungere miscela di antibiotici se necessario.

16-Incubare le fiaschette a 37°C e 5% CO₂.

17-Le cellule non ancora differenziate appaiono al microscopio in sospensione, piccole, traslucide e di forma tondeggianti. Eseguire, quindi, il cambio del medium ogni 3-4 giorni, o quando quest'ultimo appare acidificato, procedendo nel seguente modo:

- a) Raccogliere in una provetta Falcon da 15 ml il medium;
- b) Centrifugare a 450 g per 10 minuti.
- c) Eliminare il surnatante e risospesione il pellet cellulare in ugual volume di DMEM/F12 antibiotato 1X e arricchito con 10% di SFB e il 15% di medium L929 nelle medesime fiaschette utilizzate in precedenza.

17-Monitorare giornalmente la crescita delle cellule al microscopio invertito.

Dopo circa 7-10 giorni le cellule differenziate aderiscono sul fondo delle fiaschette e vengono identificate come appartenenti alla linea monocito-macrofagica mediante osservazione diretta al microscopio, dove appaiono di grandi dimensioni, di forma rotondeggianti e con delle estroflessioni sulla superficie (pseudopodi), mediante una colorazione di May-Grunwald Giemsa. A conferma dell'avvenuto e corretto isolamento una parte della coltura cellulare è stata, infine, trattata con un kit apposito basato su un sistema di anticorpi, biglie, colonnine (Pluribeads, Pluriselect) volto ad isolare in purezza le cellule di interesse.

PASSAGGIO DELLE CELLULE DIFFERENZIATE DALLE FIASCHETTE ALLE PIASTRE MULTIPOZZETTO

I macrofagi adesi sul fondo delle fiaschette (10 fiaschette in totale) sono stati staccati meccanicamente mediante l'uso di uno scraper per colture cellulari, previo allontanamento del medium di coltura e lavaggio con soluzione salina di Hank's (HBSS) antibiotata 1X. Essi venivano, quindi, risospesi all'interno di una provetta Falcon, in 140 ml di terreno DMEM/F12 antibiotato 1X e arricchito con 10% di SFB e il 15% di medium L929 totali. La sospensione cellulare è stata sottoposta a conta cellulare al fine di valutare il numero di cellule a disposizione mediante un sistema manuale eseguito al microscopio che utilizza l'emocitometro mentre la vitalità cellulare è stata valutata mediante l'utilizzo della colorazione vitale Trypan Blue.

Avendo stimato una densità di circa 1×10^6 cellule/ml, quest'ultime sono state dispensate in 3 piastre da 24 pozzetti a fondo piatto, in quantità pari a 1 ml per pozzetto. Le piastre venivano quindi incubate a 37°C e 5% CO₂ e valutate giornalmente al fine di raggiungere il grado di adesione e maturazione ottimale.

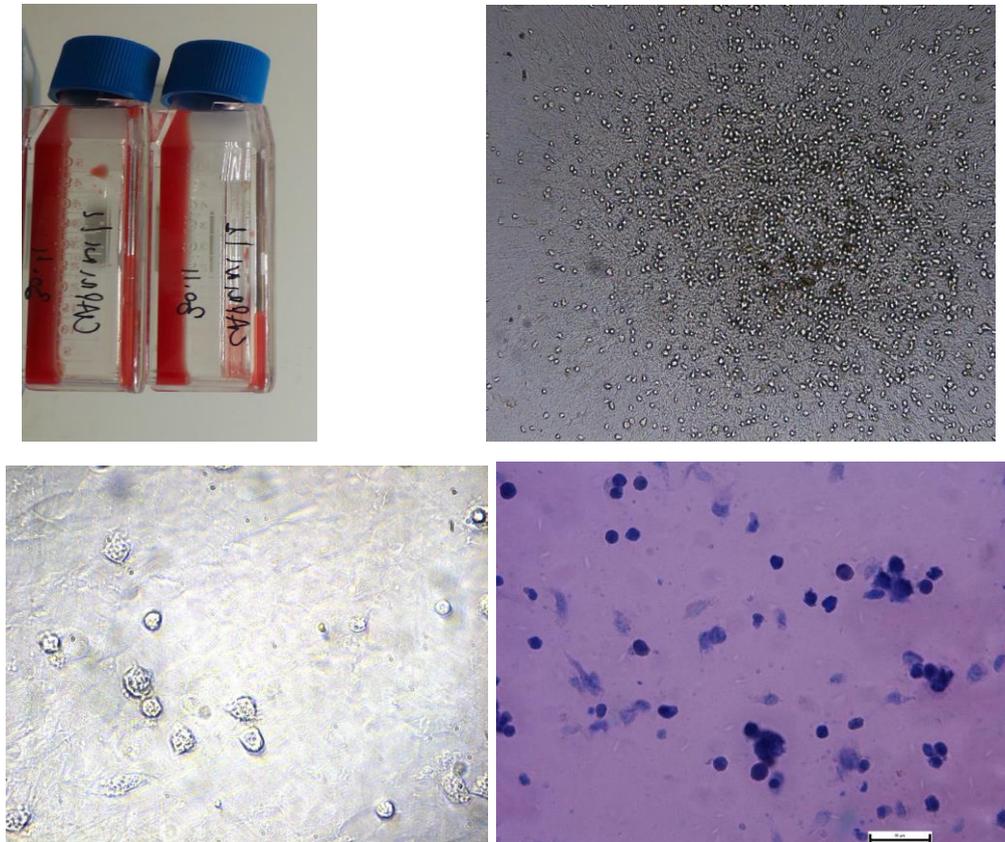


Fig.19. Coltura di cellule macrofagiche bovino

7.4 INFEZIONE SPERIMENTALE IN VITRO CON CEPPI DI CAMPO DI MYCOBACTERIUM BOVIS E MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS

Una volta ottenuta la coltura pura di macrofagi in piastra si procedeva ad infettarli con ceppi di campo di *M.bovis* ottenuti da attività diagnostica e batteriologica di routine presso il laboratorio di diagnostica territoriale dell'Area di Barcellona P.G. Gli isolati di *M.bovis* sono stati tipizzati presso il Centro di Referenza Nazionale per la Tuberculosis da *M.bovis* mentre per quanto riguarda *M. paratuberculosis* si è provveduto ad utilizzare un ceppo di tipo C (cattle) inviato in forma liofilizzata dal Centro di Referenza Nazionale per la

Paratubercolosi ed a sua volta frutto di un isolamento avvenuto in un bovino del nord Italia.

Il disegno sperimentale prevedeva l'infezione rispettivamente con *M. bovis*, *M. paratuberculosis* ed entrambi i micobatteri a 3 differenti concentrazioni (diluizioni) ed a 3 differenti tempi post-infezione in cui effettuare la raccolta del surnatante e del pacchetto cellulare (24, 48 h e 7 giorni). E' stata inoltre valutata una possibile variabilità intraspecifica utilizzando tre differenti spoligotipi di *M.bovis*: SB0120, particolarmente diffuso sul territorio siciliano e nazionale, l'SB1564, viceversa, molto più raro e l'SB0841 alquanto comune nella specie suina.

Le colonie sono state piccate con un'ansa sterile, stemperate in 2 ml di soluzione fisiologica all'interno di un tubo di vetro trasparente a cui sono state aggiunte 2-3 ml di biglie di vetro con la funzione di disgregare gli aggregati (clumps) batterici, e miscelate per 60 sec. Si lasciavano quindi sedimentare gli aggregati in sospensione, si prelevava il surnatante (circa 1 ml) e lo si travasava in un eppendorf sterile (madre). Si eseguiva, quindi una misurazione della torbidità batterica mediante l'ausilio di un densitometro e della scala McFarland aggiustandola ad 1 e si effettuavano 2 diluizioni scalari in base 10 utilizzando della soluzione fisiologica al fine di ottenere rispettivamente 0.5 e 0.1 della scala McFarland. Si prelevavano 10 µl di sospensione batterica rispettivamente dall'eppendorf madre e dalle diluizioni per micobatterio e si infettavano le piastre (una piastra per tempo eccetto SB1564 in cui tutti i tempi e le diluizioni erano distribuiti in un'unica piastra) con le cellule in coltura con una molteplicità di infezione (MOI) di circa 10:1 e successive diluizioni corrispondenti secondo il seguente schema:

- 1) *M.bovis* SB0120 concentrazione provetta madre
- 2) *M.bovis* SB0841 concentrazione provetta madre
- 3) *M.paratuberculosis* concentrazione provetta madre
- 4) *M.paratuberculosis* concentrazione provetta madre
- 5) Infezione mista *M.bovis*/ *M.paratuberculosis* concentrazione provetta madre
- 6) Infezione mista *M.bovis*/ *M.paratuberculosis* concentrazione provetta madre
- 7) Negativo
- 8) Negativo

Ripetuto tal quale rispettivamente per la prima e seconda diluizione per un totale di 24 pozzetti e 3 piastre per specie, una per tempo.

| | | | | | |
|---|---|-------------------------------------|-------------------------------------|---|--|
| 1 M.bovis max conc | 2 M.bovis max con | 3 M.paratuberculosis max conc | 4 M.paratuberculosis max conc | 5 Misto max conc | 6 Misto max conc |
| 7 Neg | 8 Neg | 9 M.bovis conc interm | 10 M.bovis conc interm | 11 M.paratuberculosis conc interm | 12 M paratuberculosis conc interm |
| 13 Misto conc interm | 14 Misto conc interm | 16 Neg | 17 Neg | 18 M.bovis min conc | 19 M.bovis min conc |
| 20 M.paratuberculosis min conc | 21 M.paratuberculosis min conc | 22 Misto min conc | 23 Misto min conc | 24 Neg | 25 Neg |

Tab.7. Schema piastra infezione

Le cellule così infettate venivano messe ad incubare a 37°C e 5% CO₂.

Ai tempi prestabiliti, rispettivamente 24, 48 h e 7 giorni post-infezione veniva raccolto il surnatante ed il pacchetto cellulare mediante l'ausilio di uno scraper che stacca le cellule adese sul fondo dei pozzetti da destinare alle successive analisi. Nello specifico il surnatante veniva utilizzato per analisi qualitative mediante test ELISA per le seguenti citochine: IL-4, IL-6, IFN- γ , IL-1 β , IL-10 e per successive analisi proteomiche mediante aggiunta di un inibitore delle proteasi in quantità pari a 200 μ l per pozzetto. Il pacchetto cellulare è, invece, stato destinato rispettivamente a future analisi proteomiche atte a valutare le proteine di superficie e quelle prodotte nonché analisi molecolari volte ad analizzare la produzione di trascritti di RNA riconducibili ad alcune citochine e recettori selezionati in precedenza e la cui presenza è associata all'interazione micobatterio-cellula (IL-1 β , IL-6, GAPDH, IL-10, IL-12, IL-2, INF- γ , TNF- α). I campioni destinati alle analisi molecolari e proteomiche sono stati quindi stoccati a -80 C.

7.5 PROVE SUPPLEMENTARI-COLORAZIONI

Live/Dead micobatteri

Al fine di valutare la vitalità dei micobatteri (*M.bovis*, *M.paratuberculosis*) prima dell'infezione sperimentale in vitro è stata condotta sui ceppi diluiti una prova di vitalità utilizzando una colorazione che sfrutta l'immunofluorescenza (LIVE/DEAD BacLight). I micobatteri vitali assumevano una colorazione verdastra al microscopio mentre quelli morti rossastra (Fig.20).

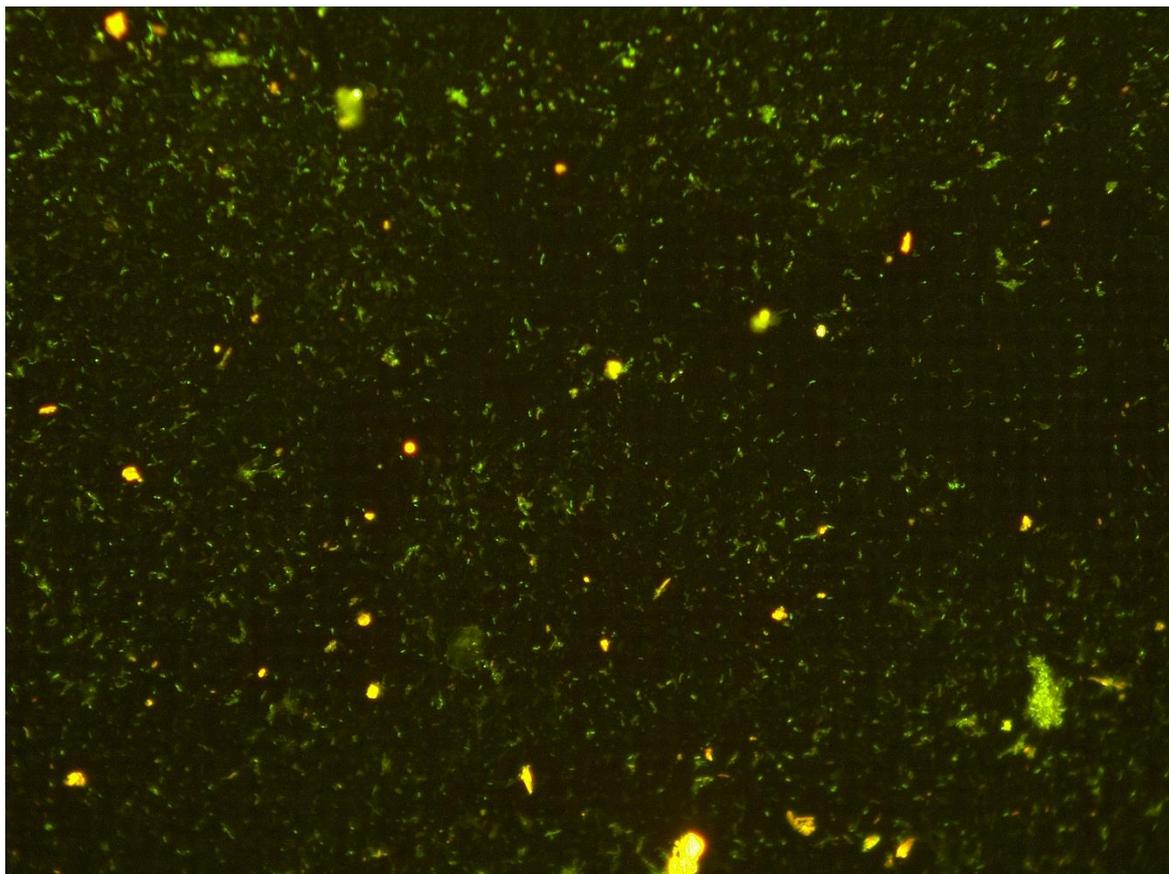


Fig.20. Colorazione vitale *M.paratuberculosis*

Colorazione Ziehl-Neelsen

Al fine di accertare l'avvenuta fagocitosi è stata inoltre prevista un'ulteriore piastra destinata alla colorazione Ziehl Neelsen e l'osservazione giornaliera al microscopio che permetteva una valutazione aggiuntiva sulla quantità di batteri ancora liberi nel surnatante e su di una loro eventuale moltiplicazione.

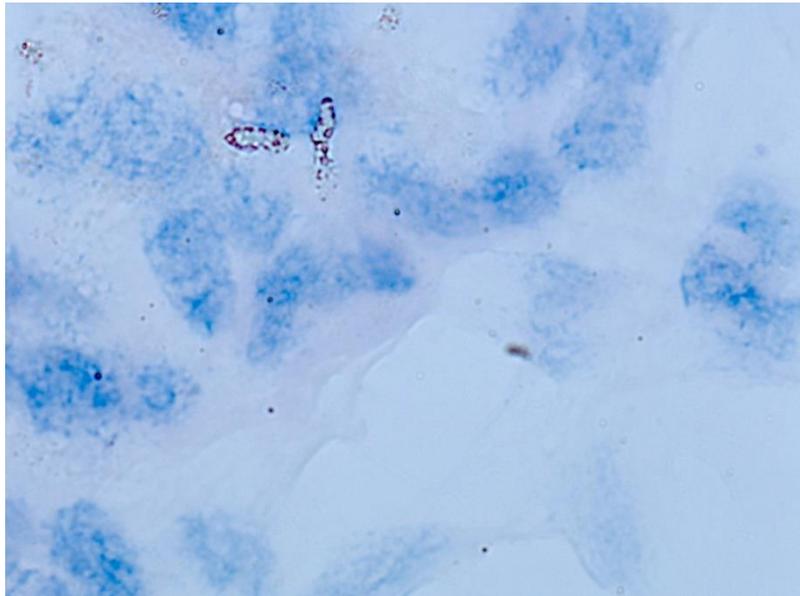
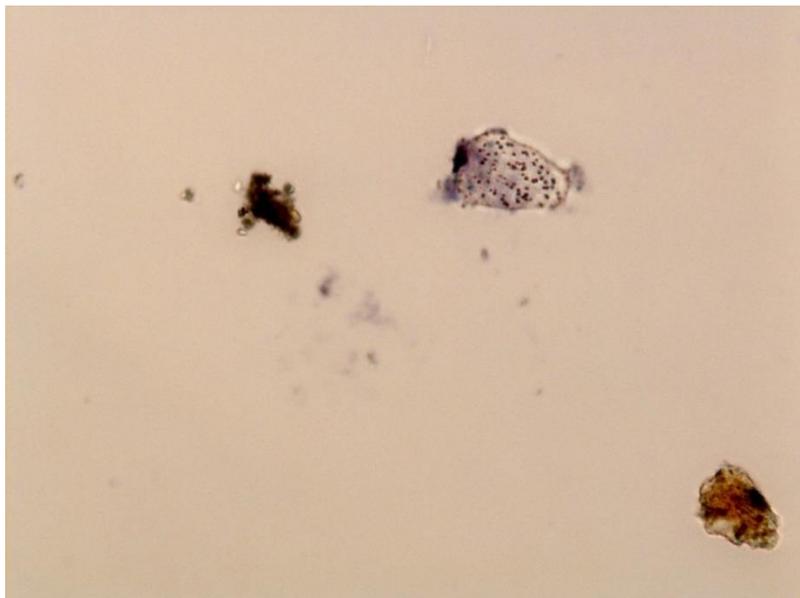
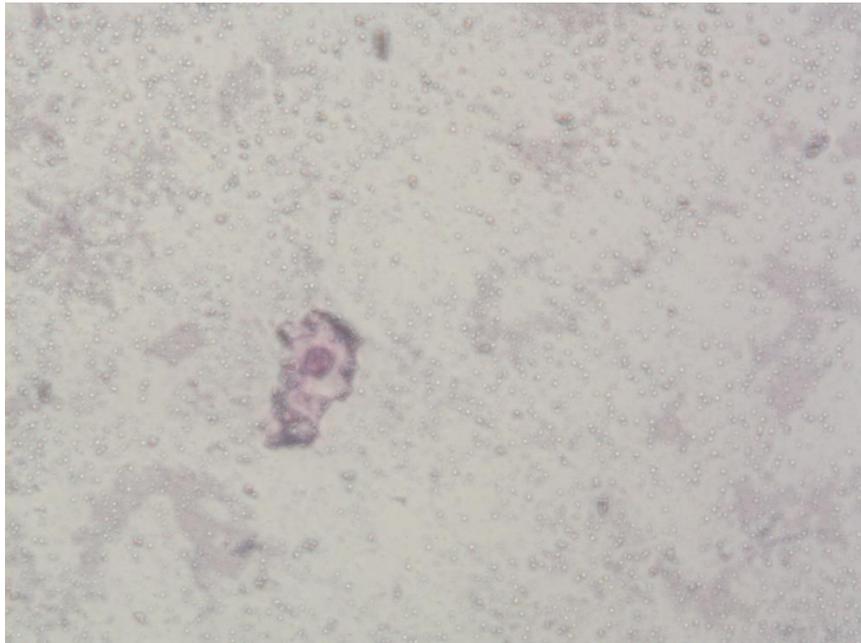


Fig. 21. Fagocitosi *M. bovis* 24 h post-infezione, concentrazione intermedia, capra



a



b

Fig.22

a Fagocitosi *M.paratuberculosis* 24 h post-infezione, massima concentrazione, capra.

b Fagocitosi *M.paratuberculosis* 24 h post-infezione, massima concentrazione, bovino.

Nella specie caprina è stato introdotto lipopolisaccaride (LPS) in concentrazione pari a 30ng/ml in un pozzetto contenente macrofagi non infettati come ulteriore prova di risposta cellulare ad uno stimolo antigenico ed una valutazione preliminare sulle differenze dell'attivazione macrofagica in presenza di un differente stimolo antigenico. LPS è, infatti, uno dei maggiori componenti della membrana batterica dei Gram-negativi in grado di suscitare intense reazioni immunitarie nell'organismo ospite. Viene comunemente utilizzato in laboratorio nel caso in cui si voglia valutare una risposta cellulare specifica ad un batterio Gram - o più semplicemente, date le notevoli proprietà antigeniche del suddetto composto, la capacità di una coltura cellulare di rispondere ad uno stimolo antigenico.

7.6 TEST ELISA

I saggi ELISA sono stati creati per effettuare una valutazione quali-quantitativa di un determinato prodotto proteico (in questo caso specifico citochine) basandosi su un sistema di anticorpi ed un substrato che legandosi a sua volta

al complesso anticorpo-citochina, riesce a creare, grazie a dei reagenti, una reazione colorimetrica che viene letta a determinate lunghezze d'onda mediante l'ausilio di uno spettrofotometro.

I test ELISA sono stati eseguiti per le seguenti citochine: IL- 4, IL-6, IFN- γ , IL-1 β , IL-10. Il panel delle citochine è stato scelto sulla base del ruolo che quest'ultime svolgono nella risposta infiammatoria (IL-6, IFN- γ , IL-1 β , IL-10), sulla tipologia di cellula saggiata (i macrofagi), ma anche sulla valutazione di un eventuale secrezione da parte di questa tipologia cellulare (IL-4).

Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato ed i grafici ottenuti si basano sulla media dei valori ottenuti nei tre singoli esperimenti.

Bovini

E' stato utilizzato il kit specie-specifico Cloud-Clone Corporation per l'analisi delle interleuchine bovine. Le piastre erano già sensibilizzate con un anticorpo specifico anti-immunoglobulina.

Procedura come da istruzioni impartite dalla ditta

Prima fase-Ricostituzione dello standard mediante diluizioni scalari

Seconda fase-Saggio ELISA

- Preparare 7 pozzetti per gli standard, 1 per il bianco
- Aggiungere 100 μ l di ciascuna diluizione dello standard, del bianco e del siero da testare negli appositi pozzetti ed incubare 1 h a 37 °C.
- Aspirare ed aggiungere 100 μ l di reagente A. Incubare per 1 h a 37 °C
- Aspirare e lavare 3 volte
- Aggiungere 100 μ l di reagente B. Incubare 30 minuti per 37 °C
- Aspirare e lavare 5 volte
- Aggiungere 90 μ l di soluzione Substrato. Incubare 10-20 minuti a 37 °C
- Aggiungere 50 μ l di soluzione di Stop.
- Leggere immediatamente a 450 nm di lunghezza

Terza fase-Interpretazione dei risultati attraverso la costituzione di una curva standard.

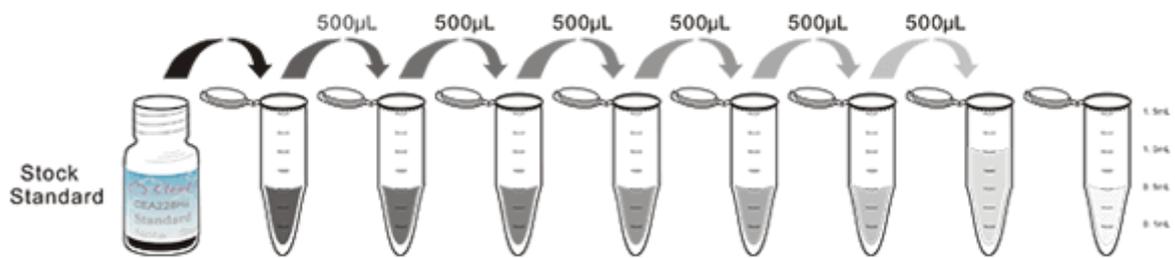


Fig.23. Diluizioni standard kit



Fig.24. Test ELISA bovini

Caprini

Nella specie caprina è stato utilizzato il kit della ditta Cusabio anch'esso specie specifico. Anche in questo caso le piastre erano già sensibilizzate con l'anticorpo specifico anti-immunoglobulina che si voleva cercare.

La procedura eseguita era la medesima di quanto descritto nei bovini. Le uniche variabili riscontrate riguardavano le diluizioni degli standard ed i tempi di incubazione.



Fig.25. Test ELISA caprini

Analisi statistiche

I risultati ottenuti sono le medie +/- la deviazione standard di 3 esperimenti indipendenti effettuati in triplicato *, $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and ***, $p < 0.001$ utilizzando il test di Bonferroni e ANOVA one way per le analisi statistiche.

7.7 REAL TIME PCR

Nanodrop

L'RNA è stato quantificato mediante l'utilizzo di questo strumento.

Il Nanodrop è, infatti, uno spettrofotometro che permette la quantificazione degli acidi nucleici e delle proteine contenute in micro volumi di campioni. E' composto da una parte strumentale e da un software di analisi. La quantità di campione da dispensare per l'analisi è pari a 1 μ l. il software misura l'assorbanza alle diverse lunghezza d'onda e calcola automaticamente il rapporto di concentrazione e purezza del campione.

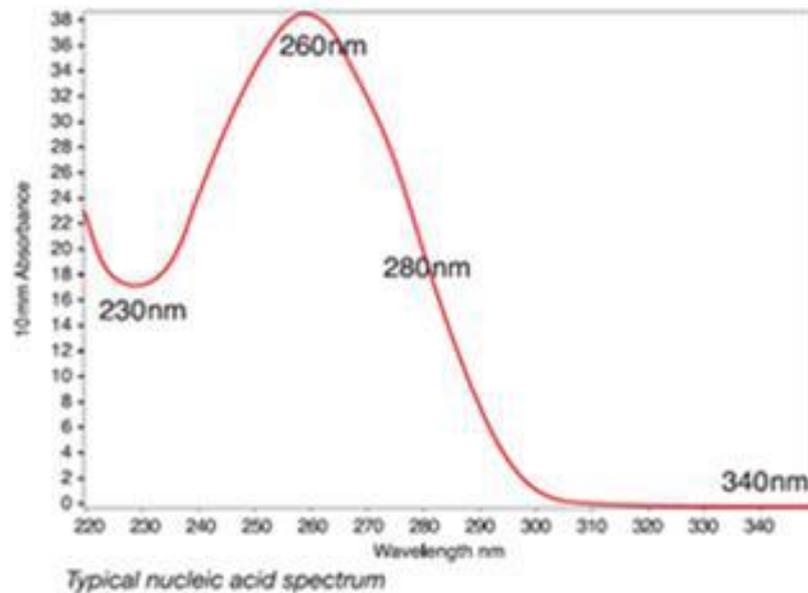


Fig. 26. Spettro degli acidi nucleici.

La purezza viene valutata come rapporto tra le due assorbanze 260/280 e deve essere $\sim 1,8$ per il DNA e $\sim 2,0$ per l'RNA. Rapporti di purezza significativamente superiori possono indicare la presenza di proteine, fenolo o altri contaminanti che assorbono fortemente nei pressi di 280 nm. Rapporti di purezza che sono significativamente inferiori ai valori attesi possono indicare che la tecnica di estrazione e purificazione dell'acido nucleico utilizzato potrebbe richiedere un'ulteriore ottimizzazione.

Retrotrascrizione

I campioni di RNA sono stati retrotrascritti in cDNA utilizzando il kit della QIAGEN Quantinova Reverse Transcription Kit che comprende:

- **Quantinova Internal Control RNA (IC);**
- **DNA Removal MIX;**
- **RNA-si free water;**
- **Reverse Transcription Master Mix;**
- **Reverse Transcription Enzyme.**

I volumi dei componenti della reazione sono stati scelti seguendo il protocollo rilasciato dall'azienda.

Rimozione Dna

Prima di retro trascrivere i campioni di RNA è necessario rimuovere eventuali contaminazioni di DNA che comprometterebbero la reazione di retrotrascrizione in cDNA.

Dopo aver sciolto in ghiaccio il IC (intern control RNA) e il DNA Removal Mix, è stata preparata una mix unica (IC + DNA removal Mix) seguendo il protocollo seguente:

COMPONENTI DELLA REAZIONE DI RIMOZIONE DEL DNA

| Componenti | Volume per 1 reazione |
|------------------------------|------------------------------|
| DNA Removal Mix | 2 µl |
| Template RNA | 12 µl |
| Internal Control RNA | 1 µl |
| RNase-free water | 1 µl |
| Total Reaction volume | 16 µl |

Tab. 8 Componenti reazione rimozione DNA

Questa miscela è stata incubata per 2 minuti a 45 °C e dopo immediatamente posta in ghiaccio.

Dopo il trattamento con DNA-si, i campioni sono stati retrotrascritti.

La Mix è stata preparata seguendo il protocollo:

COMPONENTI DELLA REAZIONE DI RETROTRASCRIZIONE

| Componenti | Volume per 1 reazione |
|------------------------------|------------------------------|
| Reverse-transcription Enzyme | 1 µl |
| Reverse Transcription Mix* | 4 µl |
| Template RNA | 15 µl |
| Total Reaction volume | 20 µl |

Tab.9. Componenti reazione di retrotrascrizione

Ogni mix è stata trattata secondo questo **profilo termico**:

| STEP | TEMPERATURA | TEMPO |
|--------------------------|--------------------|--------------|
| Annealing | 25°C | 3 minuti |
| Reverse-transcription | 45°C | 10 minuti |
| Inactivation of reaction | 85°C | 5 minuti |

Tab.10. Profilo termico reazione.

Successivamente i cDNA ottenuti sono stati diluiti 1:5 in acqua RNA-si free.

Real Time Pcr

La "Real Time PCR" è una metodica di laboratorio che permette contemporaneamente di amplificare e quantificare il DNA target.

La quantità di DNA target amplificato è direttamente proporzionale alla quantità di partenza e l'aumento è rilevabile grazie alla misurazione in **tempo reale** della fluorescenza di:

- fluorofori che si intercalano a livello del solco minore di tutte le molecole di DNA a doppio filamento in maniera aspecifica (es: SYBER GREEN)
- sonde specifiche per il frammento d'interesse marcate con molecole fluorescenti. Sono oligonucleotidi sintetici con la stessa sequenza del DNA target permettendo di massimizzare la specificità del test perché permette di quantificare solo il DNA target.

I componenti della reazione sono:

- **DNA templato**;
- **DNA polimerasi termostabile** (es: Taq polimerasi) è l'enzima che permette la sintesi di un filamento di DNA utilizzando come stampo un filamento complementare;
- **PRIMER sintetici (FORWARD e REVERSE)** complementari alle sequenze a monte e a valle il tratto di DNA da analizzare;
- **dNTPS** (desossinucleotidi trifosfato);
- **colorante fluorescente**.

| COMPONENTI | VOLUME |
|--------------------------------------|--------------|
| 2X SYBR® Green PCR Master Mix | 10 µL |
| PRIMER for | 1 µL |
| rev | 1 µL |
| H2O | 6 µL |
| cDNA CAMPIONE | 6 µL |
| V totale | 24 µL |

Tab.11 Componenti reazione Real Time

Il panel di citochine da saggiare era il seguente ed è stato selezionato sulla base di quanto riscontrato in bibliografia sull'argomento (Alfonseca Silva et al, 2016).

| Bovini | Caprini |
|---------------|----------------|
| IL-1 β | IL-1 β |
| IL-2 | IL-2 |
| IL-6 | IL-6 |
| IL-10 | IL-10 |
| IL12p40 | |
| IFN γ | IFN γ |
| TNF α | |
| GAPDH | GAPDH |

Tab.12. Citochine saggate RT-PCR

I primers sono stati in parte estratti da un lavoro (Alfonseca -Silva et al, 2016) (Fig.27) in parte disegnati utilizzando il programma PRIMER3 disponibile online partendo dalle sequenze disponibili su GENBANK.

Table 1

Specific primers used to analyze the relative changes in gene expression of cytokines, chemokine, iNOS, Arginase II and macrophage receptors by real time PCR. GAPDH was used as an internal control.

| Accession number | Gene name | Forward primer 5'-3' | Reverse primer 5'-3' |
|------------------|--|---------------------------------|---------------------------------|
| NM.001034034.2 | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) | CAT GTT TGT GAT GGG CGT GAA CCA | TAA GTC CCT CCA CGA TGC CAA AGT |
| NM.001017942.1 | Arginase II | ATG CAT TTG ACC CTA CAC TGG | AGG TCA GTC CCC CTA CAA CA |
| NM.001076799.1 | Nitric oxide synthase inducible (iNOS) | CCA TGG AAC ATC CCA GGT A | GCA GGG CGT ACC ACT TGA |
| NM.174093.1 | Interleukin-1 β | CTA GCC CAT GTG TGC TGA AG | CCA CTT CTC GGT TCA TTT CC |
| NM.173923.2 | Interleukin-6 | TAA CAC CAT CAA GGA CCT GT | TGC CCA GGA ACT ACC ACA AT |
| M.174088.1 | Interleukin-10 | ACT CTG TTG CCT GGT CTT CC | GAC AGG GTG CTC GCA TCT |
| EU276076.1 | Interleukin-12p40 | TTG CTC TCA GCA GAG AAG GTC | CTG CCC TCC TGA CAC TCC |
| NM.174091.2 | Interleukin-18 | CAC GTT TCC TCT CCT AAG AAG C | TACT TGT TCT GCA GCC AT C TTT |
| EU276059.1 | Chemotactic protein macrophage-1 (MCP-1) (CCL2) | CCA GAT GCA ATT AAC TCC CAA G | GCA TGG AGA TCT TCT TAC TGT TGA |
| NM.174007.1 | Chemotactic protein macrophage-2 (MCP-2) (CCL8) | AAG CAG AAG TGG GTC CAG ACT | CTT CGG TGT TCG GGA CTT T |
| NM.174511.2 | Inflammatory protein macrophage-1 (MIP-1 α) (CCL3) | ACC ATT TGG CGC TGA CAC | CGA TTT TGC GAG AAA GCT G |
| NM.173966.3 | Tumoral necrosis factor- α (TNF α) | GTG TGA AGC TGG AAG ACA ACC | CCC TGA AGA GGA CCT GTG AG |
| XM.002696089.1 | Mannose macrophage receptor (MMR) | GTG CAC AAC AGC CTT GCC TTA CAT | GGT AAC AAG TCT TTG GAA TCT CCT |
| NM.001113240.1 | Scavenger 1 macrophage receptor (MSR1) | TCT GTG AAG TTC GAT GCT CGC TCA | TAT CAC CGT CGA GTC GAG GAC TTT |
| NM.174197.2 | Receptor tipo Toll-2 (TLR-2) | TCC ACG GAC TGT GGT ACA TGA AGA | GCT TAA AGG GAG GGT TGA AGT GCT |
| NM.174198.6 | Receptor tipo Toll-4 (TLR- 4) | TCA GAG TTT CCT GCA GTG GGT CAA | ACT AAG CAC TGG CAT GTC CTC CAT |

Fig. 27. Primers per RT-PCR

| | |
|---------------------------------|--------------------------------------|
| GGAGGACTTCAAAAAGCTGATTCA | INFy-F-Bovino |
| GGCTTTGCGCTGGATCTG | INFy-R-Bovino |
| ATGCTTCCAATCTGGGTTCAA | IL-6-F-Capra |
| TCCAGAAGACCAGCAGTGGTT | IL-6-R-Capra |
| ATTCCACCCATGGCAAGTTC | GAPDHc-F Capra |
| TGACGAGCTTCCCGTTCTCT | GAPDHc-R Capra |
| GCTGCGGCGCTGTCA | IL-10-F Capra |
| CCACCGCCTTGCTCTTGTT | IL-10-R Capra |
| TTC AAGCTCTACGGGGAACA | IL2-F-Capra |
| CATCCTGGAGAGCTTGAGGT | IL2-R-Capra |
| ATTCCGGTGGATGATCTGCA | INFy-F-Capra |
| TACATTGATGCTCTCCGGCC | INFy-R-Capra |
| CAAGATTCTGTGGCCTTGG | IL1β-F-Capra |
| CTTGGGGTAGACTTTGGGGT | IL1β-R-Capra |

Tab.13. Primers disegnati

Quest'ultimi sono stati diluiti da concentrazione iniziale 200 μ M a concentrazione di lavoro 20 μ M.

Lo strumento di PCR REAL TIME utilizzato è stato 7300 Real Time PCR System-Applied Biosystems. (Fig. 28).



Fig.28. Strumento Real Time PCR

Se una PCR "classica" prevede questo tipo di profilo termico per 35 cicli

| STEP | TEMPERATURA | |
|----------------------|-------------|---|
| Denaturazione | 95 °C | La temperatura elevata permette la denaturazione della doppia elica del DNA |
| Annealing | 60 °C | La diminuzione della temperatura permette l'appaiamento dei primer alle estremità 3' dei filamenti |
| Elongation | 72 °C | La temperatura viene nuovamente aumentata per ottenere la massima efficienza di polimerizzazione dell'enzima Taq-polimerasi |

Tab.14. Fasi PCR

La Real Time PCR prevede:

| STEP | TEMPERATURA | TEMPO | CICLI |
|----------|-------------|--------|-------|
| 1 | 50 °C | 2 min | 1 |
| 2 | 95 °C | 10 min | 1 |
| 3 | 95 °C | 15 sec | 40 |
| 4 | 60 °C | 1 min | 40 |

Tab.15. Fasi RT-PCR

STEP 1 Amplificazione richiesto per attivare l'enzima **AmpliAq Gold® DNA polimerasi**

STEP 2 DENATURAZIONE

STEP 3/4 ESTENSIONE NUOVO FILAMENTO DNA

ANALISI QUANTITATIVA

Ad ogni ciclo di amplificazione la fluorescenza emessa viene rilevata e analizzata tramite programma.

Per ogni campione si ottiene una curva di amplificazione in cui si può osservare l'aumento della fluorescenza (asse y) rispetto al numero di cicli (asse x).

In ogni curva di amplificazione identifichiamo:

- **Threshold / Linea soglia** è la linea scelta dall'operatore che rappresenta un aumento significativo (di circa 10 volte) del segnale di amplificazione rispetto al segnale di background (registrato nei cicli di amplificazione iniziali). Graficamente è una linea che interseca le curve di tutti i campioni nella fase esponenziale.
- **Threshold Cycle / Ciclo Soglia (Ct)**: è il ciclo in cui viene rilevata una quantità di fluorescenza pari al segnale di amplificazione della linea soglia impostata. Per ogni campione può essere diverso ed è graficamente il ciclo in cui è possibile tracciare il punto di intersezione tra la curva di amplificazione e la linea soglia. E' inversamente proporzionale alla quantità di copie iniziali del target.

Paragonando i Ct dei diversi campioni rispetto al Ct del campione in cui sono stati aggiunti solamente il primer del gene endogeno, è possibile determinare il cambiamento di espressione del gene target rispetto al gene endogeno (costitutivamente espresso in tutti i campioni) la cui concentrazione nei differenti campioni è identica.

La quantificazione del segnale di fluorescenza, ovvero dei livelli di espressione dello specifico gene target, può avvenire in maniera:

- ❖ **ASSOLUTA**: paragonando i Ct dei campioni con una curva standard detta curva di calibrazione ottenuta amplificando diluizioni scalari di quantità note di template;
- ❖ **RELATIVA**: paragonando i livelli di espressione del gene target rispetto alla sua espressione in una differente condizione sperimentale in cui non dovrebbe essere espresso perché manca il segnale ambientale che innesca la sua trascrizione. Inoltre l'espressione del gene target è quantificata rispetto ai livelli di espressione di un gene endogeno i cui livelli di espressione non variano nelle differenti condizioni sperimentali. I geni endogeni sono geni costitutivamente espressi dalla cellula come ad esempio il gene **GAPDH** che codifica l'enzima glicolitico gliceraldeide-3-P-deidrogenasi.

ANALISI QUALITATIVA / DISSOCIAZIONE

E' possibile valutare l'attendibilità del test osservando le "curve di MELTING" costruite al termine della reazione di amplificazione incrementando la temperatura da circa 65 °C a circa 95 °C.

| TIPO DI AMPLIFICATO | Picchi a T | |
|-----------------------------------|-------------------|--|
| PRODOTTO DI PCR SPECIFICO | Circa 80°C | È la T di denaturazione tipica di un prodotto di amplificazione specifico di un centinaio di basi |
| DIMERI DI PRIMER | < 80 °C | E' la T di denaturazione di amplificati corti di dimeri di primer complementari che si appaiano per errore durante la reazione |
| PRODOTTO DI PCR ASPECIFICO | > 80 °C | Prodotti di PCR con bassa specificità e con differente T di melting del target |

Tab.16. Temperature curve di melting

Le curve ottenute descrivono la variazione della fluorescenza (asse y) all'aumentare della temperatura (asse x).

Per valutare la specificità di un amplificato è molto conveniente graficamente visualizzare la derivata della fluorescenza / RFU (Relative Fluorescence Unit) rispetto alla derivata della temperatura in maniera tale da poter osservare a quale T sono presenti i punti di flesso/picchi del grafico.

Se sono presenti nel grafico uno o più picchi nella curva di melting, la popolazione degli amplificati è eterogenea.

Sia la temperatura di dissociazione che l'ampiezza dei picchi sono proporzionali alla grandezza dell'amplificato.

Elettroforesi Su Gel D'agarosio

Caratteristiche elettroforesi su gel

L'elettroforesi è una tecnica di laboratorio che permette di separare molecole biologiche da una miscela complessa sulla base della differente migrazione in un campo elettrico all'interno di matrici gelatinose.

Tutte le molecole biologiche che presentano gruppi ionizzabili o cariche elettriche in soluzione possono essere separate attraverso questa tecnica e migreranno all'interno del gel campo elettrico con una velocità che dipende dal loro peso molecolare e dalla loro forma.

L'agarosio è un polimero polisaccaride, estratto dalle alghe rosse del genere *Rhodophyta*, che, dopo essere stato sciolto a caldo in tampone TBE o TAE viene lasciato polimerizzare a temperatura ambiente per 15-20 min in supporti rettangolari dotati di pettini con denti rettangolari.

Dopo la rimozione dei pettini, il gel viene immerso all'interno del tampone contenuto nella cella elettroforetica collegata ai poli opposti di un generatore di corrente da due elettrodi.

Successivamente vengono caricati all'interno dei pozzetti i campioni più un **Loading Buffer** (es: blu di bromofenolo, orange dye o xilene cianolo) che contiene:

-**glicerolo** che appesantisce il campione evitandone la dispersione nel tampone;

-**colorante** che permette di visualizzare nel gel la migrazione della banda consentendo all'operatore di valutare quando sarà opportuno lo spegnimento del generatore di corrente per porre fine alla migrazione evitando la fuoriuscita della banda dal gel e la sua dispersione nel tampone.

Quando si attiva la corrente all'interno della cella elettroforetica si crea un campo elettrico che permette di separare DNA/RNA da una miscela complessa sfruttando le cariche negative degli acidi nucleici che migrano per affinità elettrica verso il catodo.

La migrazione del campione tra le maglie del gel d'agarosio dipende:

- **Dalla percentuale di agarosio disciolto nel gel:**

maggiore è la concentrazione dell'agarosio nel gel, più piccole saranno le maglie molecolari e più sarà difficile per molecole attraversare questi pori.

Quindi maggiore è la concentrazione di agarosio all'interno del gel, maggiore sarà la possibilità di discriminare molecole di piccole dimensioni.

In base alla grandezza standard dei frammenti di DNA/RNA che si vuole analizzare, è possibile scegliere la percentuale di agarosio più opportuna.

| % DI AGAROSIO | RANGE in bp |
|---------------|----------------|
| 1% | 7.000 - 500 bp |
| 1,5% | 4.000 - 200 bp |
| 2% | 3.000 - 100 bp |

Tab.17. % di agarosi e grandezza frammenti DNA/RNA

- **Dal peso molecolare:**

più grande sarà il PM della banda minore sarà la sua velocità di migrazione;

- **Dal voltaggio applicato;**

- **Dalla conformazione del DNA:**

maggiore è lo stato di compattazione della molecola (es: super avvolta), maggiore sarà la sua velocità di migrazione;

- **Dalla presenza di ETIDIO BROMURO:**

è un colorante che si intercala tra le basi azotate del DNA ed emette fluorescenza quando viene esposto ai raggi UV prodotti dal transilluminatore.

E' un potente mutageno quindi è necessario una notevole attenzione da parte dell'operatore.

Riduce la velocità di migrazione di circa il 15%.

Preparazione gel d'agarosio al 2%

COMPONENTI

- 2 g di **AGAROSIO** (in base alla concentrazione de gel);
- 100 mL di **tampone TAE o TBE** (mantiene il pH stabile e sequestra cationi bivalenti che potrebbero attivare le nucleasi);

Per 1 L di TAE x50

-242 g Tris base (2-ammino-2-idrossimetil-propan-1,3-diolo)

-57,1 mL acido acetico glaciale (=100% acido acetico) (57,19 mL=1 mole)

-100 mL 0,5 M Na₂ EDTA (pH 8.0)

-H₂O fino a V tot di 1 L

Per 1 L di TBE x50

-162 g Tris base (tris-idrossimetil-amminometano)

-46,3 g acido borico

-9,5 g EDTA sale disodico

-H₂O a volume finale di 1000 ml

- 1 µL di **ETIDIO BROMURO**
- **LADDER o MARKER di PESI MOLECOLARI** che permette l'identificazione del peso molecolare delle bande

Per preparare il gel d'agarosio per effettuare la separazione dei campioni di RNA e DNA, è necessario:

- A) Pesare 2 g di agarosio sulla bilancia elettronica
- B) Mescolare L'AGAROSIO A 100 mL di TBE
- C) Riscaldare in microonde la soluzione per 2-3 min finchè non diventa limpida
- D) Aggiungere 1 µL di ETIDIO BROMURO
- E) Versare la soluzione in uno stampo e aspettare la polimerizzazione del gel (circa 10-15 min).
- F) Rimuovere i pettini e inserire il gel all'interno della cella elettroforetica precedentemente riempito con il tampone TBE
- G) Aggiungere 1µL di Loading Buffer a 10 µL di ogni amplificato e caricare i campioni nei vari pozzetti con l'ausilio di micropipette
- H) Aggiungere 1µL di Loading Buffer a 10 µL di ogni amplificato e caricare i campioni nei vari pozzetti con l'ausilio di micropipette. Caricare il

marker/ladder nel 1° o ultimo pozzetto per una migliore visualizzazione delle bande

- I)** Chiudere il coperchio, impostare il voltaggio del generatore di corrente (circa 100 V) e azionare lo strumento
- F)** Dopo circa 25 – 30 minuti spegnere il generatore di corrente per interrompere la corsa elettroforetica. Estrarre il gel e inserirlo all'interno del TRANSILLUMINATORE UV che irradia luce UV permette la visualizzazione dell'etidio bromuro utilizzato come colorante.

L'apparecchio è inoltre dotato di una fotocamera digitale che permette di acquisire l'immagine.

8.RISULTATI

8.1 TEST ELISA

Bovini

Tra le citochine testate mediante il saggio immunoenzimatico (IL-4, IL-6, IL-1beta, IFN-gamma, IL-10) due (IL-6, IL-1 β) hanno registrato una variazione significativa al test eseguito sul surnatante della specie bovina.

IL-6

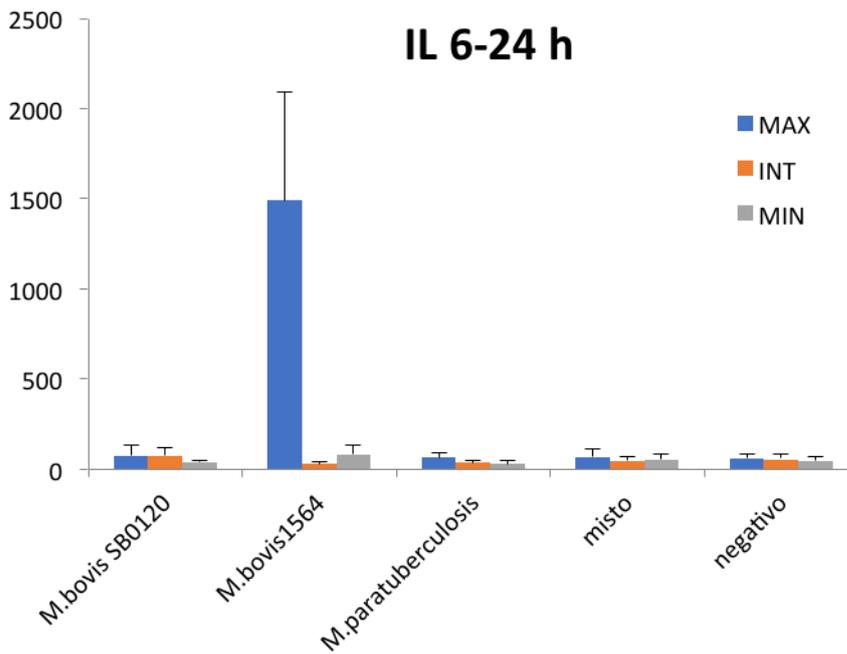
I valori di OD rilevati per questa citochina hanno evidenziato un incremento crescente in modo esponenziale fin dalle 24 h successive all'infezione sperimentale nella specie bovina. Nello specifico:

-A 24 h post-infezione la quantità di citochina prodotta risulta ancora in concentrazioni pari a quella riscontrata a livello basale (campioni negativi) eccezion fatta per il ceppo *M. bovis* SB1564 che registra un picco nella produzione di suddetta citochina alla massima molteplicità d'infezione ovvero con una concentrazione batterica pari a 1 della scala Mc Farland (Graf.1).

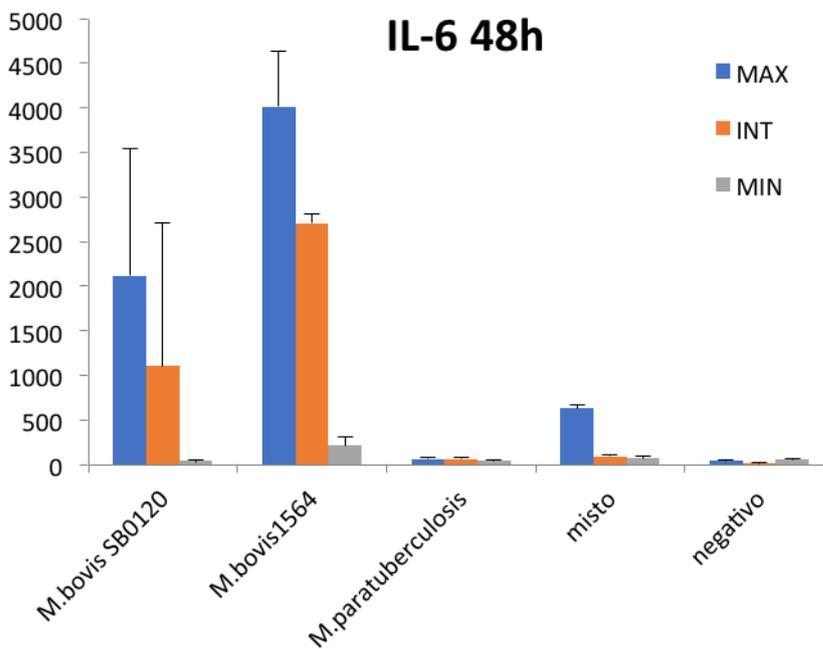
-A 48 h post-infezione si evidenzia un incremento nella produzione sia nell'infezione con il ceppo *M. bovis* SB0120 che nell'infezione mista *M. bovis/M.paratuberculosis*, concentrazione massima ed intermedia. I valori della citochina prodotta nell'infezione contenente il ceppo *M.bovis* SB1564 a concentrazione massima, invece, continuano a crescere ed iniziano ad aumentare anche i valori dell'interleuchina alla concentrazione minima del micobatterio (Graf.2).

-Ad una settimana i valori dell'IL-6 prodotta nell'infezione con *M.bovis* SB0120 a concentrazione intermedia superano quelli in cui la concentrazione batterica è massima. Si evidenzia, inoltre, un leggero aumento nella produzione di suddetta citochina anche con la concentrazione più bassa del micobatterio. Nel caso dell'infezione con *M.bovis* SB1564 i valori risultano direttamente correlati alle differenti molteplicità d'infezione e leggermente decrescenti rispetto ai valori registrati a 24 e 48 h post infezione là dove è presente una MOI dove intermedia e minima. L'infezione mista rivela un andamento crescente nelle sue tre diverse concentrazioni batteriche (Graf.3).

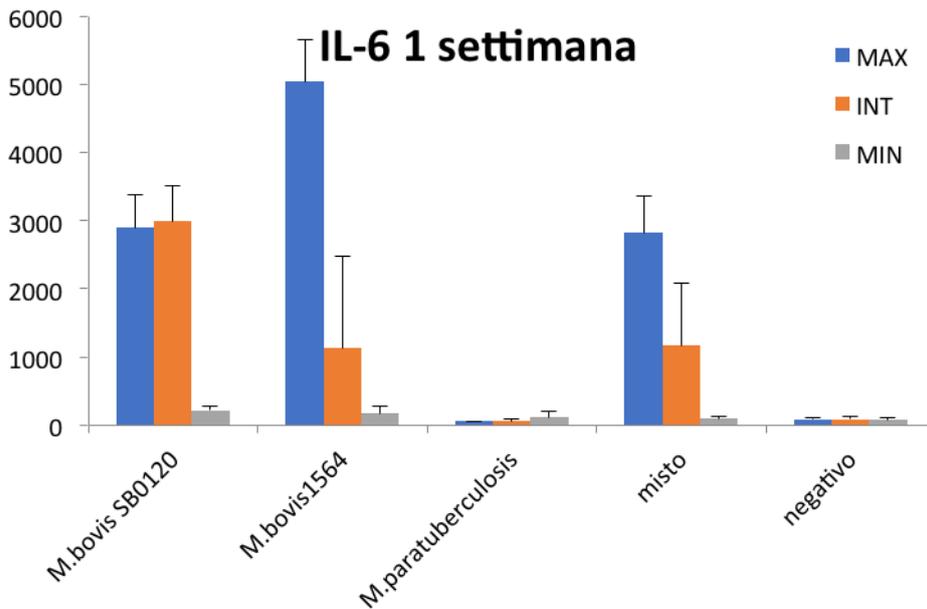
Discorso a parte va fatto per il *M. paratuberculosis* che non registra variazioni significative nella produzione della citochina IL-6 in nessuno dei tre tempi analizzati e delle concentrazioni batteriche utilizzate.



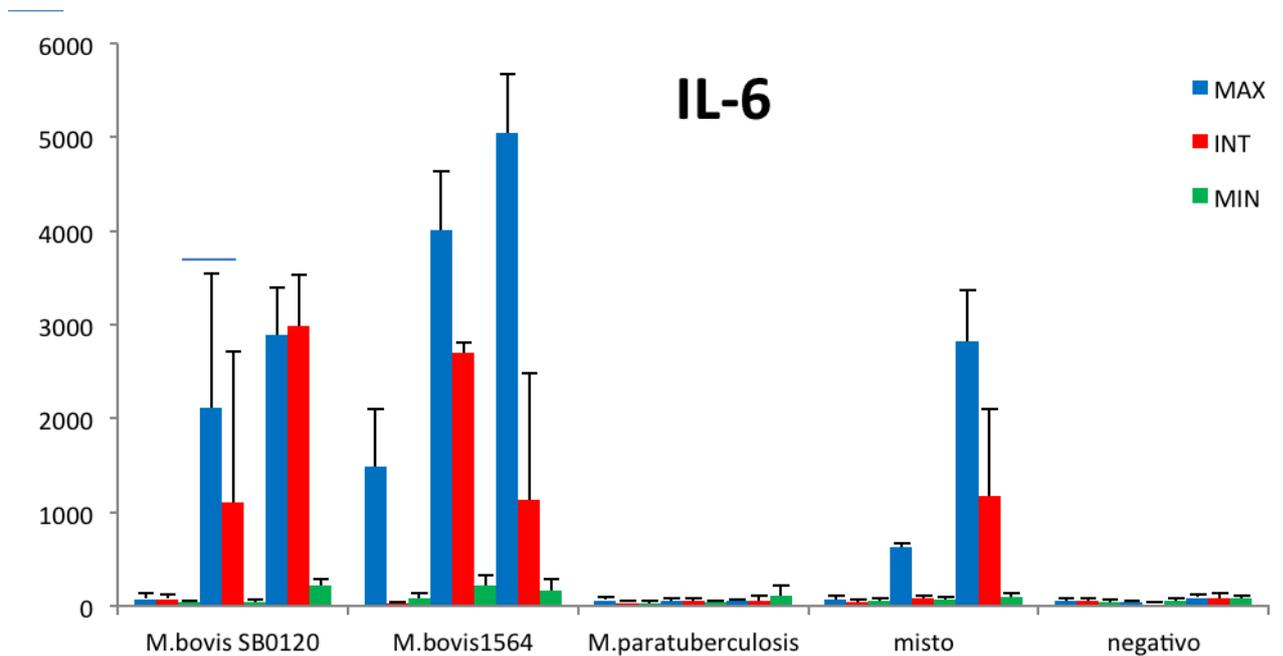
Graf.1. Produzione di IL-6 a differenti concentrazioni batteriche (massima, intermedia, minima). Bovini, 24 h.



Graf.2. Produzione di IL-6 a differenti concentrazioni batteriche (massima, intermedia, minima). Bovini, 48 h.



Graf.3. Produzione di IL-6 a differenti concentrazioni batteriche (massima, intermedia, minima). Bovini, 7 giorni.



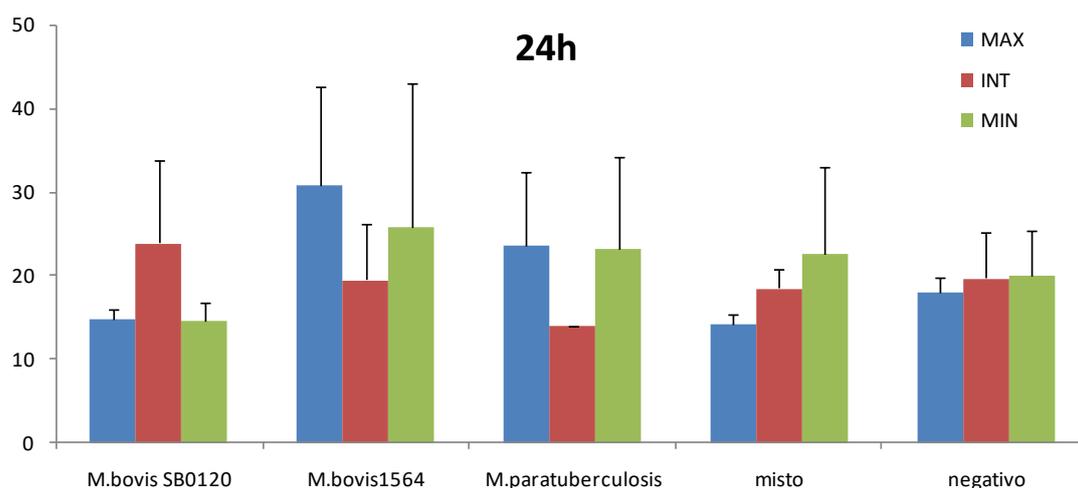
Graf.4. IL-6. Grafico complessivo dei tre tempi e delle differenti tipologie d'infezione (24h, 48 h, 1 settimana).

IL-1 β

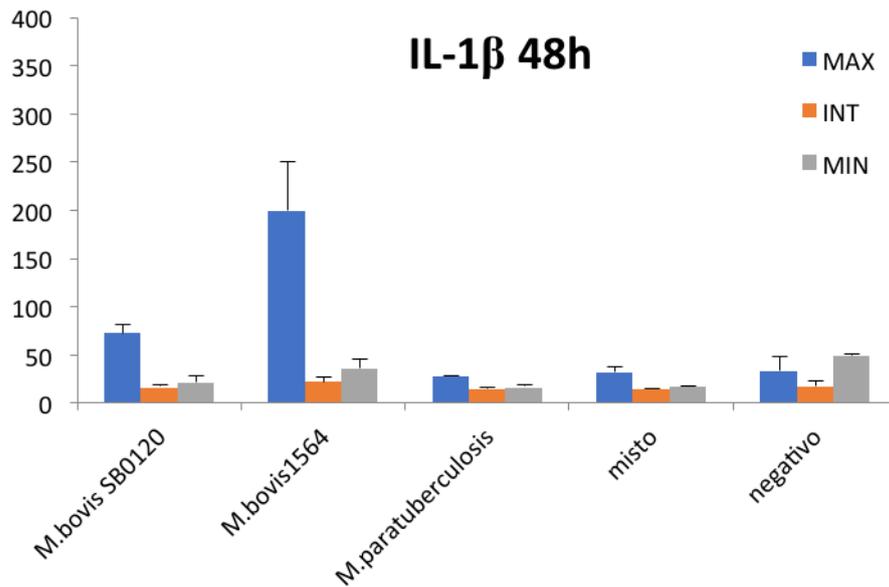
La produzione dell'IL-1 β a 24 h dall' infezione non evidenzia alcun aumento significativo in riferimento a nessuno dei ceppi utilizzati o ad alcuna concentrazione batterica.

A 48 h si evidenzia un aumento esponenziale nella produzione in entrambi i ceppi di *M.bovis* (SB0120, SB1564) alla massima concentrazione.

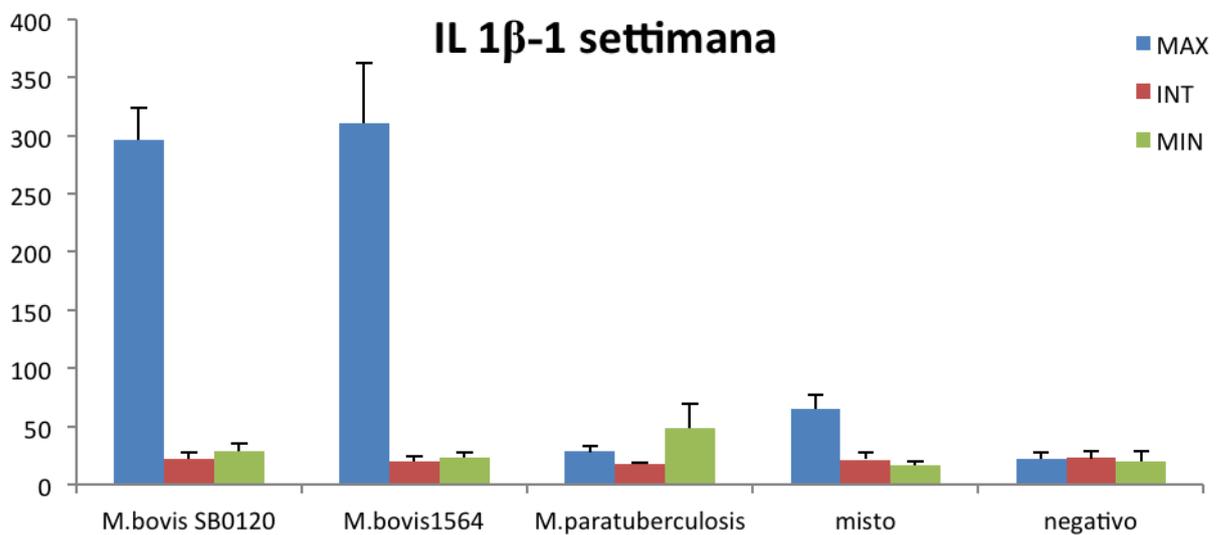
Ad una settimana i valori del dosaggio di entrambi i ceppi di *M.bovis* massima concentrazione continuano ad aumentare così come si registra un incremento anche nell'infezione mista massima concentrazione, nell'infezione singola di *M.paratuberculosis* minimo dosaggio ed un lieve aumento nell'infezione *M.paratuberculosis* massimo dosaggio.



Graf.5. Produzione di IL-1 β a differenti concentrazioni batteriche (massima, intermedia, minima). Bovini, 24 h.



Graf.6. Produzione di IL-1 β a differenti concentrazioni batteriche (massima, intermedia, minima). Bovini, 48 h.



Graf.7. Produzione di IL-1 β a differenti concentrazioni batteriche (massima, intermedia, minima). Bovini, 1 settimana

Le restanti citochine ovvero IL-10, IL-4 e IFN- γ hanno dato esito negativo al test ELISA nella specie bovina indipendentemente dal tipo di infezione, dai tempi e dalle concentrazioni.

Capre

Nella specie caprina non si è registrata alcuna produzione significativa in riferimento alle citochine testate ed alle differenti concentrazioni batteriche utilizzate.

Esperimenti collaterali

Visti i risultati ottenuti con IL-6 in vitro si è proceduto a testare la medesima citochina in vivo utilizzando i sieri di due allevamenti, uno caprino ed uno bovino, in cui era stata accertata la presenza di tubercolosi bovina. Lo scopo era quello di valutare l'incremento di suddetta citochina anche in condizioni di campo a scopo diagnostico.

Come controllo è stata saggiata l'interleuchina anche in un campione di soggetti provenienti da allevamenti negativi ovvero i medesimi che erano stati dichiarati idonei per il prelievo del midollo osseo.

Gli animali testati sono stati selezionati secondo il seguente metodo:

Caprini: 10 positivi al test dell'IDT e 10 animali controllo.

Bovini: 10 animali positivi all'esame anatomopatologico, 10 animali positivi all'esame colturale in parte coincidenti con l'esito dell'anatomopatologico, 10 animali controllo.

Risultati

Capre

E' stato stabilito un cut-off sulla base delle medie dei valori ottenuti al test ELISA dei 10 soggetti controllo negativi al test (IDT, IFN- γ). Il valore OD soglia ottenuto pari a 1.1. Tutti i valori superiori a quest'ultimo sono stati considerati positivi.

E' stato, quindi, valutato l'indice di concordanza con l'IDT utilizzando una tabella di contingenza ed applicando la seguente formula.

| Test/Gold standard | Gold standard | Gold standard |
|--------------------|---------------|---------------|
| | + | - |
| Test + | (A) | (B) |
| Test - | (C) | (D) |

Tab.18. Esempio di tabella di contingenza per il calcolo dell'indice di concordanza

Indice di concordanza: $a+d/a+b+c+d$.

| IL6/IDT | + IDT | - IDT |
|---------|-------|-------|
| + IL6 | 6 | 4 |
| - IL6 | 4 | 6 |

Tab.19. Tabella di contingenza caprini IDT/IL-6

L'indice di concordanza ottenuto è pari al **60%**.

Bovini

La medesima procedura è stata adottata per la specie bovina con l'unica differenza che in questo caso disponevamo anche dei risultati anatomopatologici e colturali degli animali testati. Il cut off calcolato era pari al valore OD di 1,91.

| IL6/ANAPE | + ANAPE | - ANAPE |
|-----------|---------|---------|
| + | 9 | 3 |
| - | 1 | 7 |

Tab. 20. Tabella di contingenza bovini ANAPE/IL-6

| IL6/COLTURALE | + COLTURALE | - COLTURALE |
|---------------|-------------|-------------|
| + | 10 | 2 |
| - | 0 | 8 |

Tab.21. Tabella di contingenza bovini colturale/IL-6

L'indice di concordanza è pari rispettivamente all'**80%** per l'anatomopatologico e al **90%** per il colturale.

8.2 RT-PCR

Le analisi sono state condotte unicamente su campioni di una settimana post-infezione ed alla massima concentrazione di micobatteri poichè sono stati giudicati l'optimum in termini di risposta macrofagica in relazione alla concentrazione batterica (tutti i ceppi considerati) ed all'arco temporale intercorso dall'avvenuta infezione.

ANALISI DELLA CONCENTRAZIONE E QUALITA' DEI CAMPIONI DI RNA IN DOTAZIONE ATTRAVERSO IL NANODROP

Dopo aver pipettato 1 µL di acqua sterile sulla superficie inferiore ottica per stabilire il BIANCO e calibrare lo strumento, sono stati analizzati tutti i campioni di RNA ad una settimana dall'infezione massima concentrazione. La quantità rilevata è stata ritenuta idonea per procedere con le analisi.

| COMPONENTI | VOLUME per 1 campione |
|----------------------|--------------------------|
| DNA Removal Mix | 2 µL |
| RNA | 12 µL |
| H ₂ O | 1 µL |
| Internal Control RNA | 1 µl |
| V tot | 16 µL |

Tab. 22. Miscela trattamento DNA-si

L'intera mix (15 µL) è stata incubata per 2 minuti a 45 °C quindi è stata posta in ghiaccio.

RETROTRASCRIZIONE

Dopo il trattamento con DNA-si, i campioni sono stati retrotrascritti secondo il seguente protocollo:

| Reagenti | Volume per 1 campione |
|------------------------------|-----------------------|
| Reverse transcription Enzyme | 1 µl |
| Reverse Transcription Mix | 4 µl |
| RNA (Mix 1) | 15 µl |
| Volume totale | 20 µl |

Tab.23. Reazione di retrotrascrizione

- **Annealing:** 25°C 3 min
- **Reverse Transcription:** 45°C 10 min
- **Inattivazione** 85°C 5 min

REAL TIME PCR

I componenti di tutte le Real Time PCR sono stati aggiunti seguendo il protocollo SYBR® Green PCR Master Mix and SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit rilasciato dall'azienda Applied Biosystems.

Le soluzioni stock Madre dei primers sono state ricostituite ad una concentrazione di 200 µM e diluite 1:10 per ottenere una concentrazione d'uso di 20 µM.

| COMPONENTI | VOLUME |
|-------------------------------|--------------|
| 2X SYBR® Green PCR Master Mix | 10 µL |
| PRIMER TNFα for | 1 µL |
| rev | 1 µL |
| H2O | 6 µL |
| DNA CAMPIONE | 6 µL |
| V totale | 24 µL |

Tab. 24. Mix RT-PCR

Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato per massimizzare la precisione dei dati sperimentali.

Le CURVE DI AMPLIFICAZIONE di tutti i campioni per:

GAPDH hanno mostrato lo stesso andamento; la fase esponenziale è stata registrata al 25° ciclo di amplificazione.

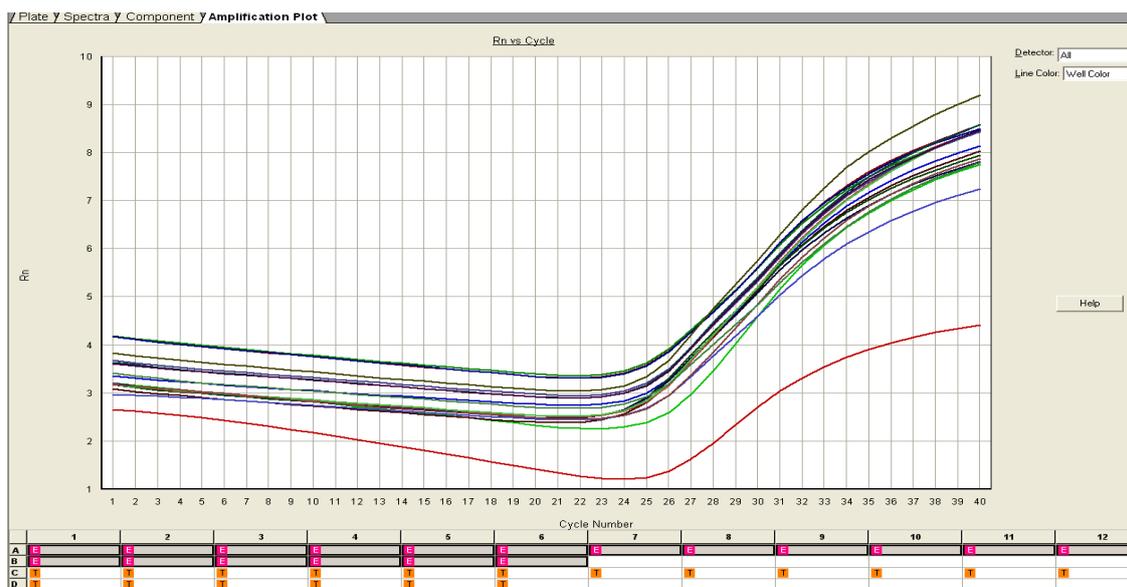


Fig. 29. Curva di Amplificazione per GAPDH, bovino

Esempio di curva di amplificazione

TNF α mostrava lo stesso andamento (fase esponenziale circa al 35° ciclo di amplificazione).

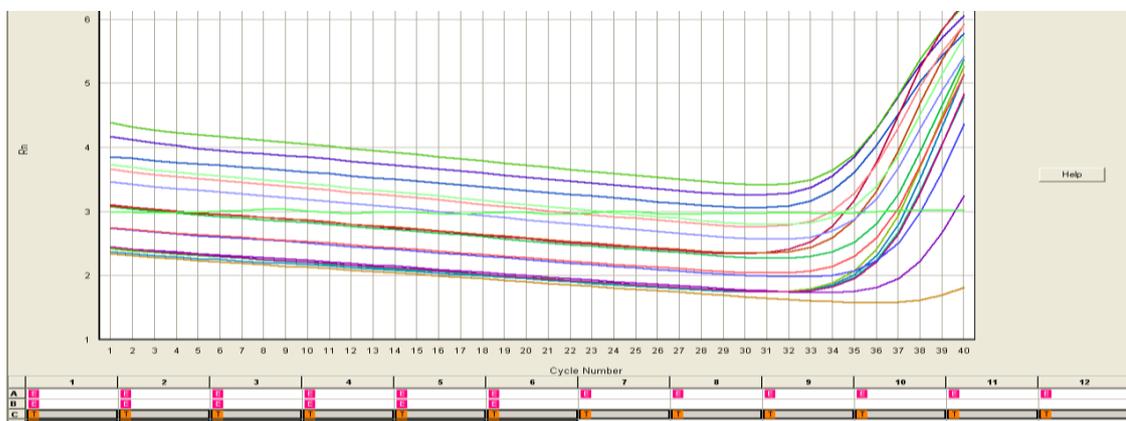


Fig. 30. Curve di Amplificazione TNF α , bovino

In seguito all'analisi qualitativa, è stato possibile osservare che le TEMPERATURE di MELTING dei campioni per ciascun primer sono quasi coincidenti. Ad esempio:

- GAPDH → circa 83-84 °C
- TNF α → circa 81-82 °C

LE CURVE DI DISSOCIAZIONE PER

GAPDH

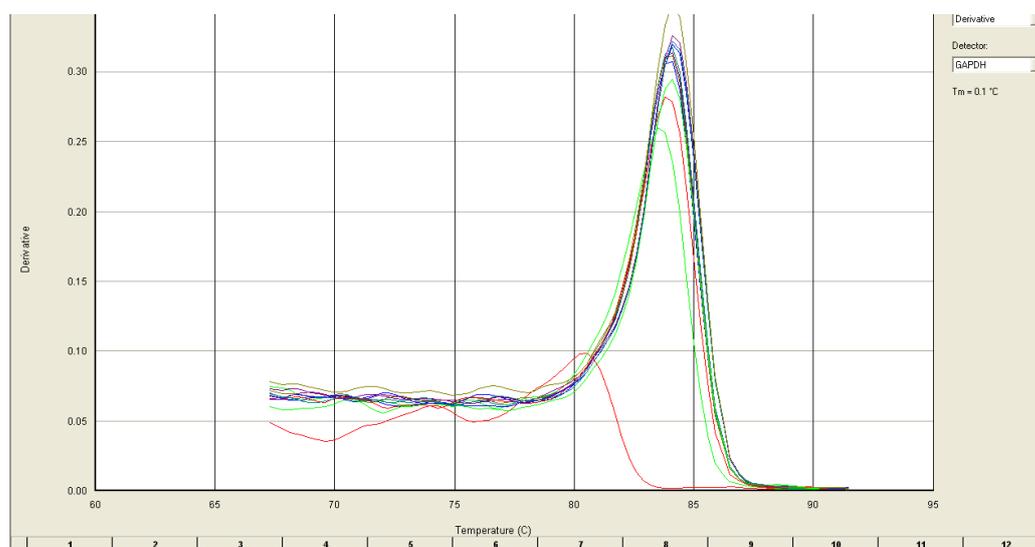


Fig.31. Curve di dissociazione GAPDH, bovino

TNF α

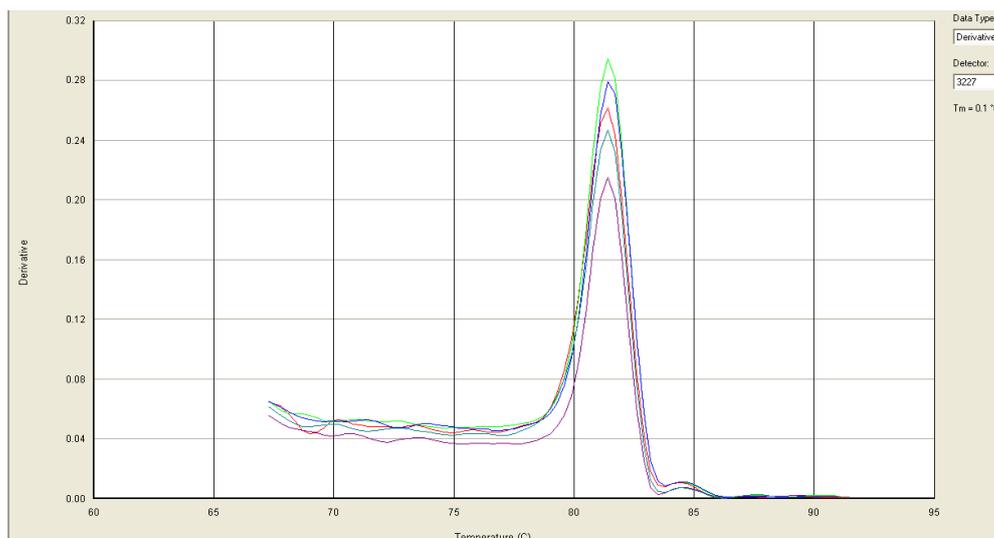


Fig.32. Curve di dissociazione TNF α bovino

Le curve di dissociazione di tutti i campioni analizzati hanno mostrato l'assoluta attendibilità dei dati ottenuti poichè l'unico picco della curva si è verificato ad una temperatura di melting coincidente con quella presunta per quel tipo di amplificato.

Non erano pertanto presenti né amplificati aspecifici né dimeri di primers.

Interleuchine

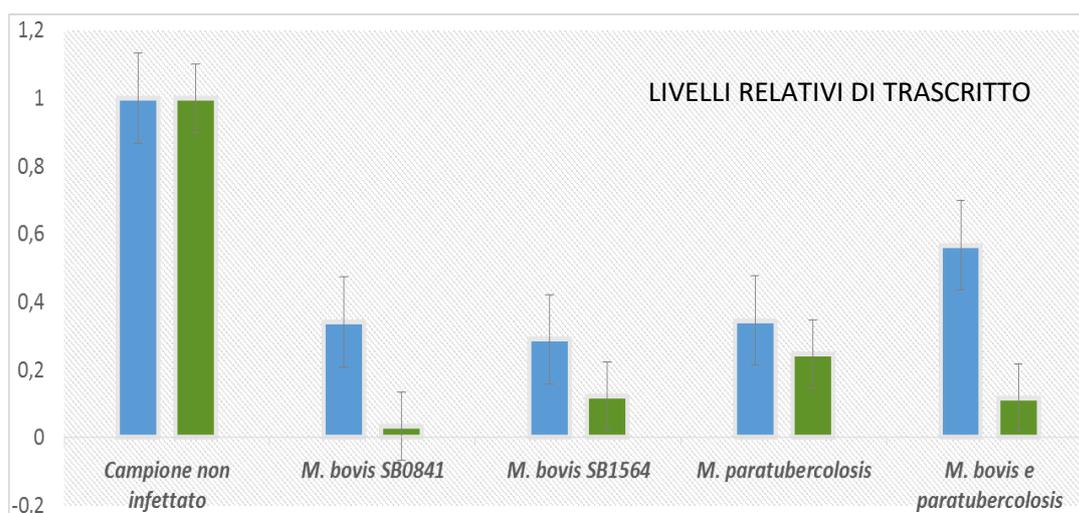


Fig. 33. I livelli relativi di trascritto dell'IL10 (azzurro) e TNF-a(verde) sono inibiti dopo una settimana dall'infezione con la massima concentrazione usata di *M. bovis* SB0841 e SB1564, *M. paratuberculosis*, e la mix *M. bovis* e *M. paratuberculosis*, Bovini.

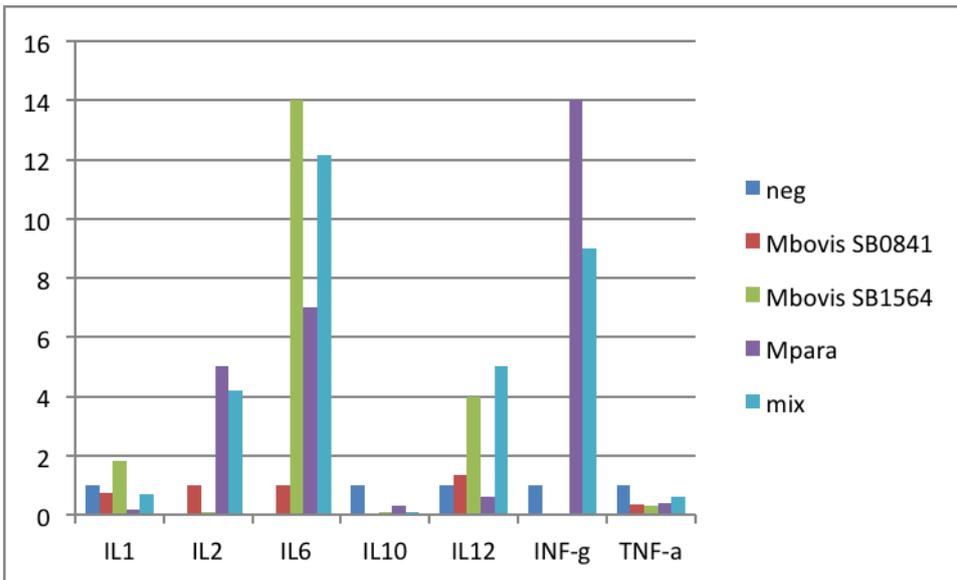


Fig.34. Valutazione quantitativa dei trascritti delle interleuchine testate ad una settimana, massima concentrazione batterica. Bovini.

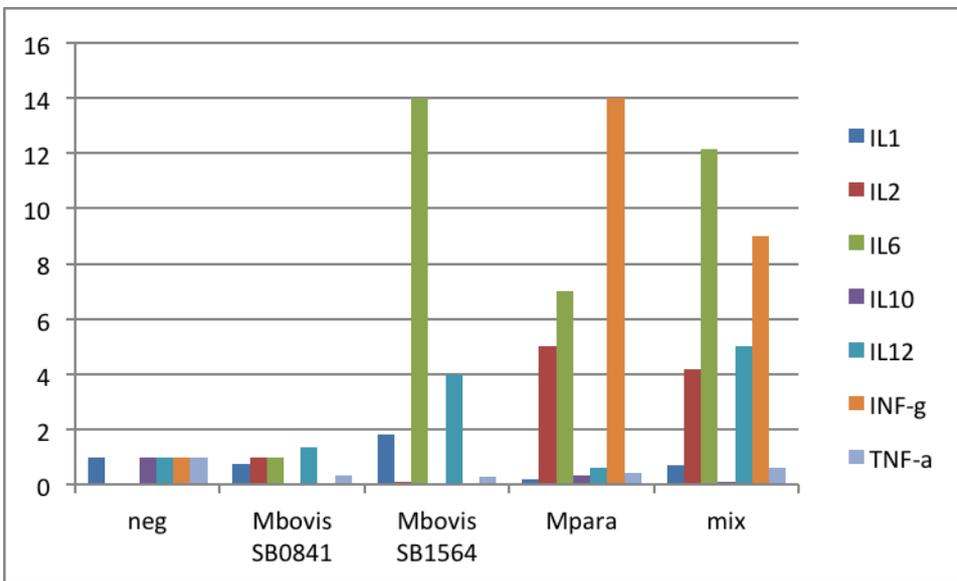


Fig.35. Valutazione quantitativa dei trascritti delle interleuchine testate ad una settimana, massima concentrazione batterica. Bovini.

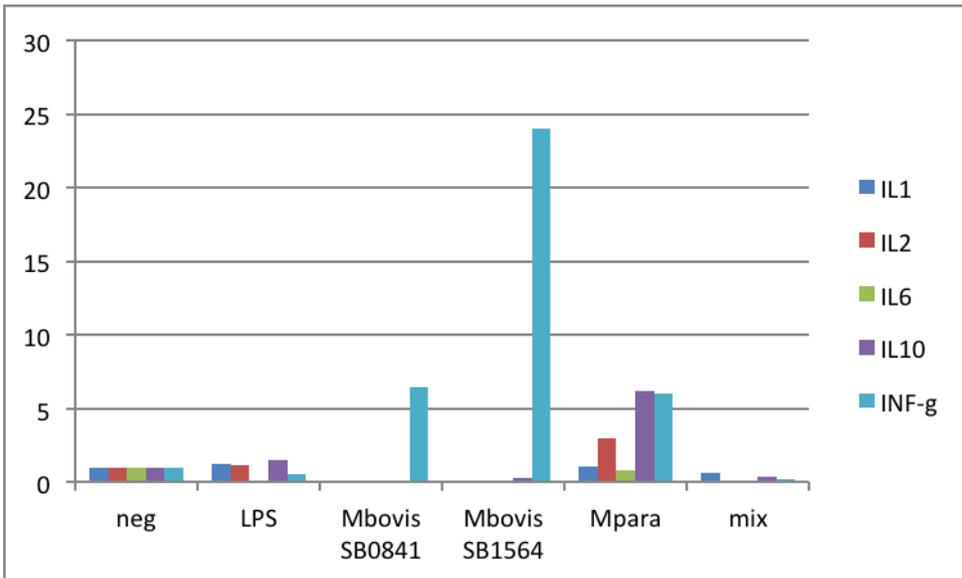


Fig.36. Valutazione quantitativa dei trascritti delle interleuchine testate ad una settimana, massima concentrazione batterica. Caprini.

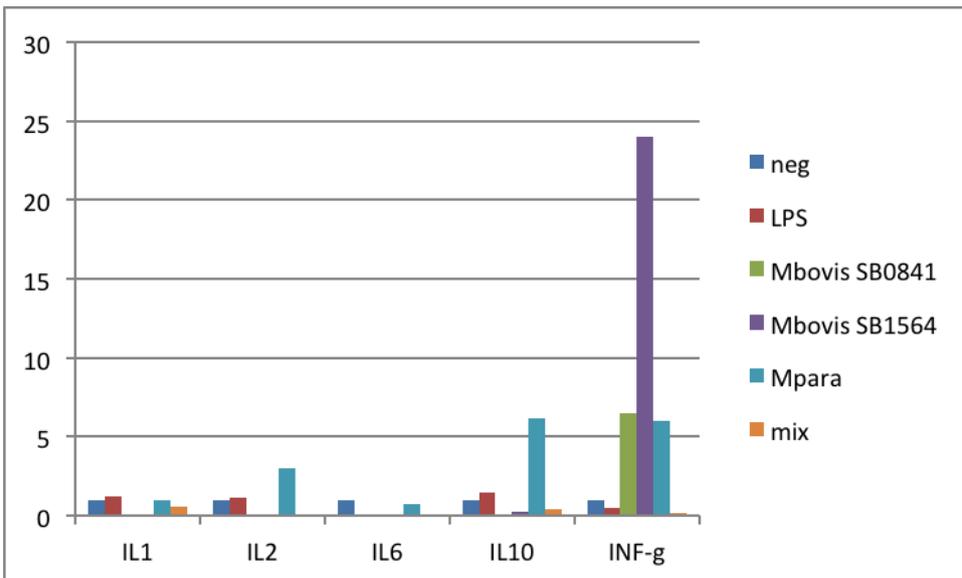


Fig.37. Valutazione quantitativa dei trascritti delle interleuchine testate ad una settimana, massima concentrazione batterica. Caprini.

9. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I limiti diagnostici in corso di coinfezione tubercolare e paratubercolare-il fenomeno della cross reattività.

La tubercolosi e la paratubercolosi sono due patologie di origine batterica che ad oggi costituiscono una seria minaccia per il sistema zootecnico mondiale nonché per la salute umana. La necessità di contrastarle efficacemente mediante test diagnostici sufficientemente sensibili e discriminanti è una problematica attuale.

La cellula bersaglio in entrambe le malattie è il macrofago in quanto responsabile non solo dell'avvio della reazione flogistica di risposta ma anche del fenomeno della latenza grazie alla capacità sviluppata dal micobatterio di eludere il meccanismo di formazione del fagolisosoma alla base della digestione enzimatica e della processazione antigenica che comporta l'attivazione del sistema immunitario in toto. In tal modo il patogeno sfrutta la cellula albergandovi all'interno, fino a quando le difese immunitarie non subiscono un calo per condizioni fisiologiche (gravidanza, lattazione...) o patologiche.

Entrambe le infezioni evolvono attraverso una serie di fasi il cui meccanismo patogenetico è a tutt'oggi in parte sconosciuto soprattutto se si considera lo switch della risposta cellulare dal tipo Th1 (caratterizzata dalla produzione di citochine quali il γ -IFN) al Th2 (responsabile dell'attivazione di un'attività immunitaria anticorpo-mediata), a sua volta correlata ad una rapida ed estesa diffusione del patogeno all'interno dell'organismo ospite (Kidd, 2003).

La malattia assume un andamento cronico ed un'evoluzione di tipo granulomatoso con la caratteristica formazione del tuberculum nel caso della tubercolosi.

Gli organi principali, spesso sede della lesione primaria sono, in entrambe le patologie, il sistema linfatico ed i suoi linfocentri, i linfonodi, che possono essere accompagnati o meno dal coinvolgimento degli organi corrispondenti.

Nel caso di *M.paratuberculosis* si verifica primitivamente anche un'infiltrazione diffusa della sottomucosa intestinale (soprattutto dell'ileo, e della valvola ileo-ciecale) e delle placche del Peyer (organo principale per la penetrazione del micobatterio nell'organismo) che induce uno stato infiammatorio cronico alla base dei sintomi clinici che l'animale manifesterà soltanto nella fase adulta (diarrea intermittente di colore olivastro e dal caratteristico aspetto a "passato

di piselli”, dimagrimento cronico nonostante l’appetito si mantenga conservato, più raramente ascite, edema sottomandibolare).

Infatti, mentre la tubercolosi segue una via di diffusione principalmente aerea (tramite aerosol o droplets), la paratubercolosi si diffonde per via alimentare attraverso l’ingestione di alimenti contaminati da secreti ed escreti di animali infetti, compreso il latte. La categoria più a rischio sono proprio i soggetti giovani e ciò non è legato unicamente alle loro abitudini alimentari ma anche a motivi di natura anatomica. Gli animali di pochi mesi, infatti, presentano una parete intestinale molto più permeabile rispetto gli adulti in quanto questo permette loro il facile e rapido assorbimento degli anticorpi materni e di tutte le macromolecole necessarie alla loro crescita e sviluppo.

L’infezione tubercolare presenta un particolare tropismo per il distretto polmonare tuttavia dal punto di vista clinico l’animale raramente manifesta sintomatologia, in particolare nei casi meno gravi si rileva un lieve calo del peso e delle produzioni ma, comunque, trattandosi di animali adulti, le cause potrebbero essere molteplici e non sempre facilmente individuabili.

I test diagnostici ufficiali si basano sull’immunità cellulo-mediata ed in particolar modo l’attivazione dei linfociti T-helper nel caso della tubercolosi bovina (IDT e γ -IFN) mentre valutano la produzione anticorpale nel caso della paratubercolosi (ELISA) o l’escrezione del micobatterio (PCR, colturale). Tuttavia quest’ultimi, pur rappresentando degli ottimi ausili, soprattutto nella fase subclinica, non sono sufficientemente sensibili e specifici e spesso è opportuno utilizzarli in serie o in parallelo o avvalersi di ulteriori ausili diagnostici per accertare l’avvenuta infezione (PCR, colturale, ecc...). E’, perciò, di fondamentale importanza la messa a punto di un test diagnostico sull’animale in vivo che

- sia in grado di individuare l’animale infetto a partire dalle primissime fasi dell’infezione di entrambe le patologie in modo tale da evitare la diffusione dell’infezione agli animali sani
- che riesca inoltre ad eliminare le cross-reattività diagnostiche tra le due patologie.

E’ stato, infatti, osservato che la compresenza di entrambe le infezioni, può rendere negativi ai test diagnostici IDT e γ -IFN animali infetti contribuendo a rendere fallimentari i tentativi di controllo della diffusione di *M.bovis*. In particolare uno studio condotto sul saggio del IFN- γ ha evidenziato una riduzione apparente della sensibilità in soggetti con infezione mista (Alvarez J. et al, 2009). Un secondo lavoro ha rilevato una forte associazione tra la

positività al test ELISA per la paratubercolosi e l'esito dubbio all'intradermoreazione (Brito et al, 2014).

E' stato documentato, infine, in letteratura l'esatto contrario ovvero come la tubercolosi bovina possa a sua volta interferire nella diagnosi della paratubercolosi (Lilenbaum et al, 2007).

Modelli di studio delle infezioni (tubercolare e paratubercolare) in vitro ai fini diagnostici

Secondo quanto riscontrato durante le attività di ricerca bibliografica non è presente in letteratura un lavoro sperimentale sull'individuazione di prodotti proteici precoci in corso d' infezione in vitro da *M.bovis* e *M.paratuberculosis* nella specie bovina e caprina da utilizzare a scopo diagnostico.

Marino et al, 2017 infettando linee macrofagiche bovine con *M.paratuberculosis* ed analizzandole a 2, 6 e 24 h mediante RNA-seq hanno osservato un'inibizione dei geni responsabili dell'attivazione della risposta immunitaria quindi una maggiore capacità di sopravvivenza all'interno della cellula ospite.

Alfonseca-Silva et al, 2016 hanno eseguito una sperimentazione analoga giungendo alla conclusione che la produzione di un pattern infiammatorio ben preciso, sia in termini di citochine che di recettori da parte delle cellule macrofagiche, si associa ad un miglior controllo dell'infezione e della crescita batterica. Gli autori hanno, inoltre, riscontrato che l'entità della risposta infiammatoria è legata alla virulenza del ceppo ed alla suscettibilità della cellula. I ceppi più virulenti riescono a stimolare meno il sistema immunitario e di conseguenza la produzione infiammatoria mentre ceppi meno virulenti si associano ad una risposta immunitaria più efficace.

Coussens et al, (2002) in corso di infezione in vitro di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) con *M.paratuberculosis* hanno evidenziato una repressione nell' attivazione delle cellule del sistema immunitario in particolare nelle forme cliniche piuttosto che in quelle subcliniche dove si osservava una parziale attivazione macrofagica a livello genico.

La curiosa analogia osservata nei due studi differenti appena descritti è quella rappresentata dal comportamento dei ceppi più virulenti di *M.bovis* nei confronti del sistema immunitario non difforme da quanto osservato per le forme cliniche di *M.paratuberculosis*, ovvero quelle in qui il micobatterio è diffuso e possiede la capacità di inibire la risposta infiammatoria quindi di generare un processo di risoluzione efficace dell'infezione.

Tale comportamento è stato riscontrato anche nell'esperimento oggetto di studio ed esacerbato dall'utilizzo dell'opzione infezione mista (*M.bovis*, *M.paratuberculosis*).

La risposta al test ELISA per la produzione di IL-6 (citochina pro-infiammatoria) ha rivelato infatti una variabilità intra-specifica, ovvero tra i due ceppi di *M.bovis* testati (SB0120 ed SB1564), con una maggiore secrezione da parte del SB1564 meno diffuso ed isolato rispetto all'SB0120 verso cui si sospetta una patogenicità maggiore visto il carattere ubiquitario, l'isolamento in specie diverse e la capacità di mutare rapidamente (Amato et al, 2017). Le colture macrofagiche infettate con *M.paratuberculosis* non hanno registrato un aumento significativo di suddetta citochina a riprova del fatto che questo micobatterio tende più facilmente a celarsi ed inibire una risposta cellulare (attività anti-infiammatoria). L'infezione mista ha, infine, mostrato valori intermedi tra quelli ottenuti dai due batteri singolarmente il che fa supporre che vi sia un'attività modulante da parte di uno dei due o di entrambi nei confronti dell'attivazione della linea cellulare monocito-macrofagica quantomeno nelle fasi iniziali del processo infettivo.

La produzione ottimale di tale citochina è stata osservata ad 1 settimana dall'infezione con una concentrazione batterica massima sebbene un incremento fosse apprezzabile fin dalle 48 h successive con concentrazioni batteriche massime ed intermedie.

Citochine infiammatorie prodotte dai macrofagi in corso di infezione da *M.bovis* e *M.paratuberculosis*

TEST ELISA-RT-PCR

IL- 6

IL-6 è una citochina con funzioni pro e anti-infiammatorie prodotta dai fibroblasti e dalle cellule della linea monocito-macrofagica. Svolge molteplici ruoli nelle diverse fasi della risposta immunitaria (innata, acquisita). Stimola la sintesi delle proteine di fase acuta e quella dei neutrofili, recluta macrofagi nel sito d'infezione e viene prodotta in seguito all'interazione dei recettori macrofagici PAMPS (pathogen-associated molecular patterns) con alcuni microorganismi batterici (Heinrich et al, 2003). E' stata identificata quale fattore di rigenerazione tissutale a livello dell'epitelio intestinale e contestualmente è stata isolata nei processi infiammatori cronici quali il morbo di Crohn. A livello linfocitario agisce inibendo l'apoptosi dei linfociti, la differenziazione dei Treg mentre favorisce la produzione e la differenziazione dei linfociti Th 17 e B. E'

implicata anche in processi non propriamente infiammatori quali neoplasie e attività muscolari (miocina) (Kimura et al, 2010; Kumari et al, 2016; Pedersen and Febbraio, 2008; Scheller et al, 2011).

L'individuazione dell'aumento dell'IL-6 in modo precoce e progressivo tramite test ELISA trova riscontro in letteratura con Prati and Goyal (2013) che l'hanno indicata come uno dei biomarker più potenti per individuazione dell'infezione da *M.tuberculosis*.

L'IL-6 ed il TNF α sono stati associati alla formazione del granuloma ed alla sindrome di deperimento cronico nella paratubercolosi ma non se ne conosce ancora chiaramente il ruolo (Adams and Czuprynski, 1995). Tuttavia uno studio condotto su un sistema moderno di messa in coltura volto a mimare l'evoluzione dell'infezione una volta che quest'ultima è avvenuta ha messo in evidenza come nelle fasi iniziali il MAP induca una blanda o assente risposta immunitaria a cui si associa un particolare fenotipo lipidico. Nelle fasi più avanzate della malattia ovvero quando quest'ultimo ha avuto modo di insediarsi nelle cellule bersaglio e moltiplicarsi segue un cambiamento nella composizione strutturale, presumibilmente legato ad esigenze metaboliche, che stimola maggiormente un'attivazione delle cellule del sistema immunitario e lo sviluppo di un pattern citochinico ben definito (Everman et al, 2015).

All'analisi in RT è stata confermata la produzione di RNA dell'IL-6 in tutte e tre le tipologie d'infezione sperimentate.

Caprini

Rispetto a quanto descritto per la specie bovina i risultati ottenuti nell'infezione in vitro per la specie caprina mediante test ELISA hanno dato esiti negativi per tutte le citochine testate. Le risposte positive ottenute con la RT-PCR hanno tuttavia supportato l'ipotesi che l'infezione in questa specie evolva più lentamente.

Nelle capre è riportata la presenza di un trascritto "basale" nelle cellule negative a cui segue un'inibizione dell'espressione dell'IL-6 ad una settimana e alla massima concentrazione delle cellule infettate con *M.paratuberculosis*, nell'infezione mista e nei due ceppi di *M.bovis*.

Bovini di campo

I sieri dei bovini positivi ai test ufficiali per la tubercolosi bovina hanno evidenziato un indice di concordanza tra i valori ELISA dell'IL-6 e l'anatomopatologico pari all'80% mentre con l'esame colturale (considerato il test gold standard per tale patologia) l'indice stimato è pari al 90%. I risultati

ottenuti supportano il valore diagnostico di tale citochina in vivo nella specie bovina. Essendo quest'ultima, infatti, una delle citochine prodotte dalle cellule macrofagiche durante la fase iniziale del processo di risposta immunitario (immunità innata) la precocità con cui rileva l'ingresso di un patogeno (soprattutto qualora la cellula bersaglio sia proprio il macrofago) è notevole (fin dalle 48 h successive l'infezione è stato registrato un incremento della produzione di tale citochina). Tali considerazioni la rendono un candidato ideale per lo sviluppo di nuovi test diagnostici volti a sostituire o fornire un ulteriore ausilio ai test già ufficialmente riconosciuti. Rimane tuttavia da definire la capacità discriminante tra un'infezione tubercolare e l'altra e rispetto ad altre infezioni batteriche/patologiche in relazione alla mancata o meno produzione o alle eventuali quantità prodotte per cui si riconosce l'esigenza di effettuare ulteriori prove di laboratorio volte a definire tali aspetti.

Caprini di campo

L'esperimento preliminare condotto su sieri di campo nella specie caprina ha evidenziato un indice di concordanza tra positività all'IDT e produzione dell'IL-6 pari al 60%. In quest'ultimo caso non si disponeva dei risultati anatomopatologici e dell'esame colturale viceversa nella specie bovina non si possedevano i dati relativi all'IDT per cui non è stato possibile fare una comparazione diretta tra le due specie. Il valore ottenuto è incoraggiante ma richiede comunque ulteriori approfondimenti data la ridotta numerosità campionaria e la mancata valutazione rispetto all'esame colturale (gold standard).

IL-16

Potente citochina pro-infiammatoria essenziale per la risposta dell'ospite alle infezioni microbiche. Viene secreta da diverse popolazioni cellulari ma soprattutto dai monociti-macrofagi. Il meccanismo con cui ciò si verifica è a tutt'oggi oggetto di studio poiché non segue la via convenzionale a cascata comune a tutte le citochine ma pare venga rilasciata in maniera continua. Ciò potrebbe spiegare i danni tissutali che quest'ultima comporta sia nelle fasi acute che in quelle croniche dell'infezione (Lopez-Castejon and Brough, 2011). Tale citochina attiva macrofagi e neutrofili da un lato ma dall'altro induce una risposta adattativa dove predominano i Th1 e i Th17 (Netea et al, 2010).

Uno studio condotto da Bourigault et al (2013) sul ruolo dell'IL-1 e il TNF nelle infezioni da *M.tuberculosis* e da ceppi di *M. bovis BCG* ha sottolineato come entrambe le citochine siano fondamentali per il controllo dell'infezione.

Tuttavia mentre il TNF risulta efficace nelle fasi precoci di entrambi i ceppi l'IL-1 non svolge un ruolo di primo piano nell'infezione acuta da *M. bovis* BCG.

I risultati ottenuti per questa citochina al test ELISA evidenziano un aumento crescente della produzione a partire dalle 48 h successive all'infezione per entrambi i ceppi di *M. bovis* massima concentrazione, seguiti dall'infezione mista. Nel caso di *M. paratuberculosis* l'incremento si osserva esclusivamente ad una settimana e con la minima concentrazione batterica. Da ciò si evince che mentre per *M. bovis* la quantità di micobatteri è fondamentale per stimolare in modo esponenziale la produzione dell'IL-1 β e l'induzione della risposta infiammatoria per *M. paratuberculosis* l'attivazione macrofagica non è strettamente correlata al numero di batteri anzi sembra avvenire con la massima diluizione microbica.

RT PCR

Nei bovini si è evidenziato un aumento del trascritto della medesima citochina nel ceppo *M. bovis* SB1564 mentre risulta inibito nelle restanti varianti (*M. bovis* SB0841, *M. paratuberculosis* e misto).

Nei caprini risultava inibita l'espressione genica nei due ceppi di *M. bovis* e nel misto mentre è completamente assente con *M. paratuberculosis*.

Nei caprini è stata, inoltre, osservata una lieve risposta positiva all'LPS. Generalmente la valutazione della risposta immunitaria a tale componente antigenica viene effettuata quantizzando IL-1 β . Tuttavia è stato riscontrato un incremento del trascritto anche dell'IL-10 la cui produzione è specificatamente indotta dall'LPS attraverso la secrezione dell'IL-27 da parte delle cellule macrofagiche (Iyer et al, 2010).

IL-2

Le cellule linfocitarie sono le maggiori produttrici di questa citochina implicata nella proliferazione, differenziazione e sopravvivenza di CD4+ e CD8+ contribuendo alla generazione e propagazione di una risposta immunitaria antigene-specifica (Petrolini Capobianco et al, 2016). Tuttavia è stata identificata la presenza di un trascritto nelle cellule sane della specie caprina che è risultato inibito nell'infezione con *M. bovis* e nella mista mentre risulta lievemente aumentato nell'infezione paratubercolare.

Nei bovini invece si registra un marcato aumento nell'infezione mista e paratuberculare mentre c'è soltanto un leggero aumento con il ceppo *M.bovis* SB0841.

Ancora da comprendere il significato biologico e patologico in relazione a questa tipologia cellulare (macrofagi).

TNF- α

Il TNF α è una citochina prodotta principalmente dai macrofagi ma anche da differenti tipologie cellulari quali linfociti, cellule endoteliali e fibroblasti. Oltre ad essere coinvolta nel processo infiammatorio, è implicata in differenti fenomeni biologici quali apoptosi cellulare, differenziamento e cancerogenesi. In corso di infezione tubercolare *M.tuberculosis* contribuisce alla formazione del granuloma inoltre induce l'espressione di chemochine quali IL-8, MCP-1 e RANTES che inviano segnali per migrazione delle cellule del sistema immunitario nei siti d'infezione. Garantisce infine una protezione a lungo termine nei confronti del micobatterio (Ahmad, 2011).

Le prove in RT-PCR di suddetta citochina hanno evidenziato nella specie bovina, ad una settimana dall'infezione e alla massima concentrazione un'inibizione dell'espressione genica in tutte e tre le tipologie d'infezione seppure a differenti livelli.

I massimi livelli di inibizione sono stati raggiunti con il ceppo *M.bovis* SB0841, seguito dall'infezione mista, il ceppo di *M.bovis* SB1564 ed infine *M.paratuberculosis*.

L'azione inibitoria indotta dai micobatteri nei confronti di tale citochina si profila quale meccanismo di sopravvivenza messo in atto dal patogeno all'interno della cellula ospite.

IL-10

L'interleuchina 10 è implicata nel mantenimento e nell'omeostasi dei tessuti. A tal proposito promuove la risposta immunitaria innata per limitare i danni indotti da eventuali infezioni virali e/o batteriche ed agisce anche come potente anti infiammatorio per limitare l'attività distruttiva indotta dai processi immunitari (Ouyang et al, 2011).

Nell' infezione tubercolare IL-10 promuove la sopravvivenza dei bacilli mediante una serie di azioni che prevedono l'inibizione della maturazione del

fagosoma, la riduzione della produzione di ossido nitrico, il blocco del segnale dell'IFN- γ . Inoltre antagonizza la risposta linfocitaria di tipo Th1 inibendo la presentazione dell'antigene e la produzione dell'IL-12. Generalmente risulta quindi aumentata in corso di infezione tubercolare (Abdalla et al, 2016).

Contrariamente a quanto riportato in letteratura le analisi condotte in RT-PCR sulle cellule macrofagiche bovine hanno rilevato un'inibizione dell'espressione genica di suddetta citochina (in tutte e tre le tipologie di infezione ad una settimana ed alla massima concentrazione) che è risultata maggiore con il ceppo *M.bovis* SB1564 a cui è seguito il ceppo SB0841, *M.paratuberculosis* ed il misto. Tale risposta è stata confermata mediante test ELISA che non ha evidenziato alcuna produzione. A tale inibizione corrisponde l'intensa risposta pro-infiammatoria rappresentata dall'IL-6 ed in parte dall'IL-1 β e dall'IL-12 (trascritto).

Nella specie caprina il risultato è il medesimo eccezion fatta per *M.paratuberculosis* in cui è stato osservato un incremento del trascritto che potrebbe rappresentare viceversa l'inibizione della risposta infiammatoria.

IL-12

Citochina prodotta prevalentemente dalle cellule del sistema macrofagico. Agisce in differenti fasi della risposta immunitaria:

- Nelle fasi iniziali dell'infezione inducendo la produzione dell'IFN- γ da parte dei linfociti T e dei NK che contribuisce all'attivazione macrofagica ed alla fagocitosi
- Favorisce la differenziazione dei linfociti in CD4+
- Costituisce pertanto un ponte funzionale tra immunità innata ed acquisita (Trinchieri, 1995).

I risultati ottenuti in RT per la specie bovina indicano un incremento dell'espressione genica in entrambi i ceppi di *M.bovis* (con netta prevalenza per l'SB1564) e nell'infezione mista viceversa appare inibita con *M.paratuberculosis*.

IFN γ

L'IFN- γ gioca un ruolo di primo piano nella risposta immunitaria (per lo più attività immunomodulatoria) a diversi patogeni virali e batterici. I produttori primari sono i linfociti T e le Natural Killer tuttavia tale citochina viene prodotta anche dai macrofagi (Gessani e Belardelli, 1998). Usato a scopo diagnostico nella tubercolosi bovina viene inibito in corso di infezione paratubercolare. La

sua presenza si associa ad una risoluzione efficace del processo infettivo da parte del sistema immunitario (Arsenault et al, 2012).

La RT ha rilevato, tramite l'analisi dell'RNA messaggero, la comparsa di una sua espressione genica ad una settimana dall'infezione nelle cellule bovine infettate con *M.paratuberculosis* e nell'infezione mista. Nella specie caprina otteniamo il medesimo risultato per quanto riguarda l'infezione paratubercolare mentre risulta inibita la produzione nell'infezione mista ed aumentata nelle cellule infettate con *M.bovis*.

In conclusione il lavoro condotto ha fornito alcuni spunti di riflessione, di seguito elencati, che, non solo gettano luce su meccanismi ancora poco chiari inerenti la patogenesi di queste due patologie più che mai attuali per le importanti ripercussioni sul piano sanitario e della salute pubblica nonché zootecnico, ma che forniscono anche interessanti risvolti diagnostici.

1-La reattività delle cellule del sistema immunitario e la caratterizzazione del pattern citochinico in risposta ad uno stimolo antigenico.

I risultati ottenuti hanno indotto l'ipotesi che nella specie caprina l'infezione evolva più lentamente rispetto a quella bovina e come quest'ultima possieda anche una certa variabilità nell'espressione genica che riguarda sia le cellule infettate che quelle sane.

2-La variabilità della risposta macrofagica, non solo legata a specie batteriche differenti *M.bovis/M.paratuberculosis* (interspecifica) ma anche intraspecifica (due differenti spoligotipi) che potrebbe essere correlata anche a fattori quali patogenicità e virulenza del ceppo.

3-L'assimilabilità del comportamento di alcuni dei ceppi di *M.bovis*, tra quelli più diffusi ed isolati, al *M.paratuberculosis* intesa come capacità di "mimetizzarsi" all'interno della cellula ospite.

4-L'individuazione dell'IL-6 quale marker precoce della tubercolosi bovina nella specie bovina. Per la specie caprina pur non avendo ottenuto dei risultati soddisfacenti con il test ELISA si può avanzare l'ipotesi che possa essere idoneo dai dati di campo ottenuti su animali naturalmente infetti. La concordanza con i test ufficiali costituisce una valida prova a supporto. Probabilmente in questa specie i tempi di risposta cellulare sono più lunghi mentre il tempo massimo analizzato in questo lavoro è stato 1 settimana.

In riferimento all'infezione paratubercolare invece sembra che possa essere più complesso fare una stima dei risultati ottenuti poiché si tratta di un batterio

che stimola la cellula ospite ad indurre un pattern infiammatorio solo dopo un lungo periodo che segue ad una fase inibitoria (tale fenomeno risulta evidente nell'infezione mista dove la produzione di citochine è diminuita rispetto alle infezioni pure con *M.bovis*) per cui è possibile che anche in questo caso una settimana non sia stata sufficiente ad indurre una produzione citochinica chiara come nelle infezioni da *M.bovis*. Tale ipotesi è avvalorata dalla presenza del trascritto all'analisi RT.

Altro spunto di riflessione interessante riguarda l'aspetto patogenetico. L'IL-6 è fondamentale nell'equilibrio tra Th17 e Treg una sua massiva produzione come può accadere nei processi infiammatori cronici induce uno squilibrio con chiari intenti pro infiammatori ed esito infausto (vedi malattie autoimmuni quali sclerosi multipla e morbo di Chron). Ciò suggerisce come i micobatteri possono influenzare e determinare l'insorgenza di tali patologie proprio stimolando questa tipologia di risposta. Inoltre stimola la produzione dei linfociti B notoriamente inefficaci nei confronti del bacillo tubercolare.

5-Il fenomeno dell'inibizione o effetto modulatore osservato ed indotto dalla copresenza delle due specie microbiche trova importanti risvolti nell'applicazione dei piani di eradicazione in quanto ulteriore prova a supporto che la coinfezione nel medesimo soggetto interferisce con la risposta ai test diagnostici ufficiali e quindi con l'esito della prova, contribuendo al mantenimento dell'infezione tubercolare in allevamento.

6-La presenza di un trascritto primario assimilabile all'IL-2 in cellule di tipo macrofagico.

7-La mancata correlazione tra espressione genica e produzione citochinica (test ELISA) in alcuni casi (es. IL-1 β , IFN- γ) può essere spiegata in parte dalla cellula macrofagica e dalle sue modificazioni post-trascrizionali. Non esiste, infatti, una correlazione diretta tra l'RNA prodotto e la sintesi proteica (Vogel and Marcotte, 2012). Altre possibili spiegazioni sono correlate a caratteristiche di specie nelle tempistiche (es. tempi più lunghi nella specie caprina), alla complessa interazione micobatterio/cellula che influenza la produzione e/o l'inibizione di alcune citochine a discapito di altre come meccanismo di sopravvivenza e/o proliferazione all'interno della cellula ospite, od infine a possibili meccanismi regolatori ed inibitori a feedback.

8-Nella specie bovina l'azione inibitoria sul trascritto del TNF- α indotta da entrambi i micobatteri indipendentemente dal ceppo quale meccanismo di sopravvivenza.

9-Nella specie caprina, eccezion fatta per l'IFN γ , non si evidenzia alcuna risposta infiammatoria in risposta all'infezione tubercolare e paratubercolare. Risulta viceversa aumentato il trascritto dell'IL-10 nelle cellule infettate con *M.paratuberculosis* con chiara attività antiinfiammatoria.

10- L'inibizione dell'IL-10 nella specie bovina e caprina notoriamente aumentata negli stadi più avanzati dell'infezione tubercolare.

11-Inibizione della produzione di IL-12 nell'infezione paratubercolare nella specie bovina quale ulteriore tentativo messo in atto da *M.paratuberculosis* di ritardare l'attivazione della risposta immunitaria.

BIBLIOGRAFIA

- Abbas A., Lichtman A. H., Pillai S., (2012). Immunologia cellulare e molecolare, ELSEVIER.
- Abdalla A.E., Lambert N., Duan X., Xie J. (2016). Interleukin-10 Family and Tuberculosis: An Old Story Renewed. *Int J Biol Sci.*; 12(6):710-7. doi: 10.7150/ijbs.13881.
- Abrami S., Amadori M., Alborali G.L., Avisani D., Bollo E., Boniotti B., Bozzetta E., Capucchio M.T., Chiari M., Chiavacci I., Cinotti S., Daminelli P., Di Marco Lo Presti V., Dondo A., Galietti F., Gelmetti D., Gili C., Goria M., Guarda F., Jurczynski K., Lecu A., Onoscuri M., Pacciarini M., Peli A., Prearo M., Robetto S., Ruocco L., Salogni C., Tagluabue S., Tortoli E., Varisco G., Zanardi G., Zanoni M. La Tuberculosis degli Animali Edito da Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna.
- .Adams J.L., Czuprynski C.J. (1995). Ex vivo induction of TNF-alpha and IL-6 mRNA in bovine whole blood by Mycobacterium paratuberculosis and mycobacterial cell wall components. *Microb Pathog.*; 19(1):19-29.
- Ahmad S. (2011). Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection. *Clin Dev Immunol.*; 2011:814943. doi: 10.1155/2011/814943.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science.
- Alfonseca-Silva E., Hernández-Pando R., Gutiérrez-Pabello J.A. (2016). Mycobacterium bovis-infected macrophages from resistant and susceptible cattle exhibited a differential pro-inflammatory gene expression profile depending on strain virulence. *Vet Immunol Immunopathol.*; 176:34-43. doi: 10.1016/j.vetimm.2016.02.015.
- Alvarez J., de Juan L., Bezos J., Romero B., Sáez J.L., Marqués S., Domínguez C., Mínguez O., Fernández-Mardomingo B., Mateos A., Domínguez L., Aranaz A.(2009). Effect of paratuberculosis on the diagnosis of bovine tuberculosis in a cattle herd with a mixed infection using interferon-gamma detection assay. *Vet Microbiol.*; 135(3-4):389-93. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.060.
- Amato B., Di Marco Lo Presti V., Gerace E., Capucchio M.T., Vitale M., Zanghì P. Pacciarini M.L., Marianelli C., Boniotti M.B. (2017). Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis complex strains isolated from livestock and wild

animals in Italy suggests the need for a different eradication strategy for bovine tuberculosis. Accepted Journal Transboundary and Emerging diseases.

-Aranaz A., Liébana E., Gomez-Mampaso E., Galan J.C., Cousins D., Ortega A., Blazquez J., Baquero F., Mateos A., Suarez G., Dominguez L. (1999). *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. International Journal of Systematic Bacteriology; 49: 1263-1273.

-Archetti I.L., Amadori M., Scaccaglia P., Vezzoli F., Luini M., Fabbi M., Belloli A., Sala L. (1996). Impiego del test γ -interferon per la diagnosi di tubercolosi bovina in regione Lombardia. La Selezione Veterinaria; 5: 329-338.

-Arrigoni N., Mauri G. Risanamento e buone pratiche di biosicurezza per prodotti sicuri e commerciabili (2011). Settimana Veterinaria; vol. 748, inserto filiere: pp. XI-XII.

-Arsenault R.J., Li Y., Bell K., Doig K., Potter A., Griebel P.J., Kusalik A., Napper S. (2012). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* inhibits gamma interferon-induced signaling in bovine monocytes: insights into the cellular mechanisms of Johne's disease. Infect Immun.; 80(9):3039-48. doi: 10.1128/IAI.00406-12.

-Banerjee S., Gupta S., Shende N., Kumar S., Harinath B.C. (2003). Serodiagnosis of tuberculosis using two ELISA systems. Indian J Clin Biochem.; 18(2):48-53. doi: 10.1007/BF02867367.

-Bannantine J.P., Bermudez L.E.(2013). No holes barred: invasion of the intestinal mucosa by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Infect Immun.; 81(11):3960-5. doi: 10.1128/IAI.00575-13.

-Barany F. (1991). Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88: 189-193.

-Bher M.A. (2010). Paratuberculosis and Crohn's Disease - In: Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. Edited by Bher M.A. e Collins D.M. Preston; 40-49.

-Bold T.D., Ernst J.D. (2009). Who benefits from granulomas, mycobacteria or host? Cell; 136(1):17-9. doi: 10.1016/j.cell.2008.12.032.

-Boniotti M.B., Gorla M., Loda D., Garrone A., Benedetto A., Mondo A., Tisato E., Zanoni M., Zoppi S., Dondo A., Tagliabue S., Bonora S., Zanardi G., Pacciarini M.L. (2009). Molecular Typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of Variable-Number Tandem Repeats for

Geographically Optimized Genotyping. *Journal of Clinical Microbiology*; 47: 634-644.

-Bottaccioli Francesco (2008). *Il sistema immunitario: la bilancia della vita. Come è fatto e come funziona in salute e in malattia. Tecniche nuove*

-Bottarelli E. e Ostanello F.(2011). I test diagnostici - In: *EPIDEMIOLOGIA - Teoria ed esempi di medicina veterinaria. Il Sole 24 Ore Edagricole, Bologna, 143-164.*

-Bourigault M.L., Segueni N., Rose S., Court N., Vacher R., Vasseur V., Erard F., Le Bert M., Garcia I., Iwakura Y., Jacobs M., Ryffel B., Quesniaux V.F. (2013). Relative contribution of IL-1 α , IL-1 β and TNF to the host response to *Mycobacterium tuberculosis* and attenuated *M. bovis* BCG. *Immun Inflamm Dis.*; 1(1):47-62. doi: 10.1002/iid3.9.

-Brito B.P., Aly S.S., Anderson R.J., Fossler C.P., Garry F.B., Gardner I.A. (2014) Association between caudal fold tuberculin test responses and results of an ELISA for *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* and mycobacterial culture of feces in tuberculosis-free dairy herds. *J Am Vet Med Assoc.*; 244(5):582-7. doi: 10.2460/javma.244.5.582.

-Brosch R., Gordon S.V., Marmiesse M., Brodin P., Buchrieser C., Eiglmeier K., Garnier T., Gutierrez C., Hewinson G., Kremer K., Parsons L.M., Pym A.S., Samper S., van Soolingen D., Cole S.T. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*; 99: 3684-3689.

-Brosch R., Gordon S.V., Billault A., Garnier T., Eiglmeier K., Soravito C., Barrell B.G., Cole S.T. (1998). Use of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing and comparative genomics. *Infection and Immunity*; 66: 2221-2229.

-Capobianco M.P., Capatti Cassiano G., da Cruz Furini A.A., Storti de Melo L.M., Bonini Domingos C.R., Dantas Machado R.L.(2016). Human Interleukin 2 (IL-2) Promotion of Immune Regulation and Clinical Outcomes: A Review. *J Cytokine Biol* 1:109. doi: 10.4172/jcb.1000109

-Cho J, Tauer LW, Schukken YH, Gómez MI, Smith RL, Lu Z, Grohn YT (2012). Economic analysis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* vaccines in dairy herds. *J Dairy Sci.*; 95(4):1855-72. doi: 10.3168/jds.2011-4787.

-Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*; 393: 537-544.

- Collins M.T. (2011): Diagnosis of Paratuberculosis. *Vet. Clin. Food Anim.*; 27, 581–591.
- Cossu D., Cocco E., Paccagnini D., Masala S., Ahmed N., Frau J., Marrosu M.G., Sechi L. (2011). Association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with Multiple Sclerosis in Sardinian Patients. *Plos One*; vol.6. (4): e18482. doi: 10.1371/journal.pone.0018482.
- Cousins D.V., Bastida R., Cataldi A., Quse V., Redrobe S., Dow S., Duignan P., Murray A., Dupont C., Ahmed N., Collins D.M., Butler W.R., Dawson D., Rodriguez D., Loureiro J., Romano M.I., Alito A., Zumarraga M., Bernardelli A. (2003). Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 53: 1305-1314.
- Coussens PM, Colvin CJ, Wiersma K, Abouzied A, Sipkovsky S.(2002). Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells from cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Infect Immun*; 70(10):5494-502.
- D'Amore M., Lisi S., Sisto M., Cucci L., Dow C.T. (2010). Molecular identification of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in a Italian patient with Hashimoto's thyroiditis and Melkersson – Rosental Syndrome. *J Med Microbiol*; vol.59 no.1 137-139
- Dow C. T. (2014). *M. paratuberculosis* and Parkinson's disease – Is this a trigger. *Medical Hypotheses* Vol. 83, Issue 6, Pages 709–71.
- Dow C. T. (2011) *Mycobacterium paratuberculosis* and autism: Is this a trigger? *Medical Hypotheses*, Volume 77, Issue 6, Pages 977–981.
- Eisenach K.D., Crawford J.T., Bates J.H. (1988). Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*; 26: 2240-2245.
- Everman J.L., Eckstein T.M., Roussey J., Coussens P., Bannantine J.P., Bermudez L.E. (2015). Characterization of the inflammatory phenotype of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using a novel cell culture passage model. *Microbiology* 161: 1420-1434. doi: 10.1099/mic.0.000106.
- Englund, S., Bolske, G., Johansson, K.E. (2002). An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*; 209, 267–271.
- Farina R., Scatozza F. (1988). Genere *Mycobacterium*. In: *Malattie infettive degli animali domestici*. Editoriale Grasso, Bologna, 25: 239-260.

- Frothingham R., Meeker-O'Connell W.A. (1998). Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology*, 144: 1189-1196.
- Garnier T., Eiglmeier K., Camus J.C., Medina N., Mansoor H., Pryor M., Duthoy S., Grondin S., Lacroix C., Monsempe C., Simon S., Harris B., Atkin R., Doggett J., Mayes R., Keating L., Wheeler P.R., Parkhill J., Barrell B.G., Cole S.T., Gordon S.V., Hewinson R.G. (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*; 100: 7877-7882.
- Gessani S, Belardelli F. (1998). IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine Growth Factor Rev.*; 9(2):117-23.
- Goodchild A.V., Downs S.H., Upton P., Wood J.L., de la Rúa-Domenech R.(2015). Specificity of the comparative skin test for bovine tuberculosis in Great Britain. *Vet Rec.*; 177(10):258. doi: 10.1136/vr.102961.
- Gortazar, C., Vicente, J., Gavier-Widen, D. (2003). Pathology of bovine tuberculosis in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet. Rec.* 152, 779–780.
- Guarda F. e Bollo E. (2005). *La tubercolosi degli animali*. Giraldi (Eds), Bologna.
- Gwó J.M., Reichel M.P., Murray A., Manktelow W., West D.M., Thompson K.G. (1997). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine tissues and blood by the polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*; vol. 57: pp. 233-44.
- Heinrich P.C., Behrmann I., Haan S., Hermanns H.M., Müller-Newen G., Schaper F.(2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signaling and its regulation. *Biochem J.*; 374(Pt 1):1-20.
- Hermans P.W.N., van Soolingen D., Dale J.W., Schuitma A.R.J., McAdam R., Catty D., van Embden J.D.A. (1990). Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*; 28: 2051-2058.
- Hines M.E., Kreeger J.M., Herron A.J. (1995). Mycobacterial infection of animals: pathology and pathogenesis. *Laboratory Animal Science*, 45: 334-351.
- Hines, S.A., Buergelt, C.D., Wilson, J.H., Bliss, E.L. (1987). Disseminated *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a cow. *Journal American Veterinary Medical Association*; vol 190: pp. 681-683.
- Hostetter J., Steadham E., Haynes J., Bailey T., Cheville N.(2003). Phagosomal maturation and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subspecies

paratuberculosis in J774 cells. *Comparative Immunology Microbiology Infection Disease*; vol 26: pp. 269-283.

-Huard R.C., de Oliveira Lazzarini L.C., Butler W.R., van Soolingen D., Ho J.L. (2003). PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 1637-1650.

-Iyer S.S. Ghaffari A.A., Cheng G. (2010). Lipopolysaccharide-mediated IL-10 transcriptional regulation requires sequential induction of type I IFNs and IL-27 in macrophages. *J Immunol.* 2010 Dec 1;185(11):6599-607. doi: 10.4049/jimmunol.1002041.

-Kamerbeek J., Schouls L., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M., Van Embden J. (1997). Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and tuberculosis control. *Journal of Clinical Microbiology*; 35: 907-914.

-Karthik K., Kesavan M., Tamilmahan T, Saravanan M, Dashprakash M (2013). Neutrophils in tuberculosis: will code be unlocked? *Veterinary World* 6(2):118-121 DOI10.5455/vetworld.2013.118-121.

-Kidd P. (2003). Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev.*; 8(3):223-46.

-Kimura A., Kishimoto T. (2010). IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol.*; 40(7):1830-5. doi: 10.1002/eji.201040391.

-Kulski K.J., Khinsoe C., Pryce T., Christiansen K. (1995). Use of a multiplex PCR to detect and identify *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* in blood culture fluids of AIDS patients. *Journal of Clinical Microbiology*; 33: 668-674.

-Kumari N., Dwarakanath B.S., Das A., Bhatt A.N. (2016). Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biol.*; 37(9):11553-11572.

-Kwoh D.Y., Davis G.R., Whitefield K.M., Chapelle H.L., Di Michele L.J., Gingeras T.R. (1989). Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*; 86: 1173-1177.

-Lauzi S., Pasotto D., Amadori M., Archetti I.L., Poli G., Bonizzi L. (2000). Evaluation of the specificity of the γ -interferon test in Italian bovine tuberculosis-free herds. *Veterinary Journal*; 160: 17-24.

- Leckie G.W., Lee H.H. (1995). Infectious disease testing by ligase chain reaction. In: Myers R.A. (ed.), Molecular biology and biotechnology. VCH Publishers, Inc., New York, 463-466.
- Lilenbaum W., Ferreira R., Dray Marassi C., Ristow P., Oelemann W.M.R., de Souza Fonseca L. (2007). Interference of tuberculosis on the performance of ELISAs used in the diagnosis of paratuberculosis in cattle. Braz. J. Microbiol. vol.38 no.3.
- Lopez-Castejon G. and Brough D. (2011): Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. Cytokine Growth Factor Rev; 22(4): 189–195.doi: 10.1016/j.cytogfr.2011.10.001
- Marcato P.S.(2002). Sistema gastroenterico e peritoneo. In: Patologia Sistemica Veterinaria. Edagricole, Ozzano dell'Emilia (BO).
- Marin M.G. (1999). Diagnostica di laboratorio: tecniche di amplificazione genetica dal laboratorio alla pratica clinica. Edizioni Sorbona, Milano.
- Marino R., Capoferri R., Panelli S., Minozzi G., Strozzi F., Trevisi E., Snel G.M.G., Aimone-Marsan P., Williams J.L. (2017). Johne's disease in cattle: an in vitro model to study early response to infection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using RNA-seq. Molecular Immunology; vol. 91 pp 259-271.
- Miller B.H., Fratti R.A., Poschet J.F., Timmins G.S., Master S.S., Burgos M., Marletta M.A., Deretic V. (2004). Mycobacteria inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection. Infect Immun.; 72(5):2872-8.
- Mishina D. On the aetiology of Crohn disease (1996). Proceedings of the Nat. Academy of Sciences USA, 93, 9816–9820.
- McGavin M D and Zachary J F (2011). Pathologic Basis of Veterinary Disease., 5th ed, Mosby Press.
- Momotani, E. Whipple, D.L., Thiermann, A.B. (1988). Role of M cells and macrophages in entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. Veterinary Pathology; vol. 25: pp. 131-137.
- Monaghan M., Quinn P.J., Kelly A.P., McGill K., McMurray C., O'Crowley K., Bassett H.F., Costello E., Quigley F., Rothel J.S., Wood P.R., Collins J.D. (1997). A pilot trial to evaluate the γ -interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infected cattle under Irish conditions. Irish Veterinary Journal; 50: 229-232.

- Mullis K.B., Faloona F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction. *Methods in Enzymology*; 155: 335-350.
- Muse Davis J. and Ramakrishnan L. (2009). The Role of the Granuloma in Expansion and Dissemination of Early Tuberculous Infection. *Cell.*; 136(1): 37–49. doi: 10.1016/j.cell.2008.11.014.
- Neill S.D., Pollock J.M., Bryson D.B., Hanna J. (1994a). Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*; 40: 41-52.
- Netea M.G., Simon A., van de Veerdonk F., Kullberg B.J., Van der Meer J.W., Joosten L.A. (2010). IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes. *PLoS Pathog.*; 26; 6 (2): e1000661. doi: 10.1371/journal.ppat.1000661.
- Office International des Epizooties, OIE (2010). Manual of standards for diagnostic and vaccines, Bovine tuberculosis. Chapter 2.4.7. (Version adopted in May 2009).
- Office International des Epizooties, OIE (2008). Manual of standards for diagnostic and vaccines, Sixth Edition, Paratuberculosis (Johne's disease). Chapter 2.1.11, 276-291.
- Ouyang W., Rutz S., Crellin N.K., Valdez P.A., Hymowitz S.G. (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol.*; 29:71-109. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101312.
- Paccagnini D., Sieswerda L., Rosu V., Masala S., Pacifico A., Gazuoli M., Ikononopoulos J., Ahmed N., Zanetti S., Sechi L.A. (2009). Linking Chronic Infection and Autoimmune Disease: *Mycobacterium avium* Subspecies paratuberculosis, SLC11A1 Polymorphisms and Type-1 Diabetes Mellitus. *Plos One*; 4(9): e7109. doi: 10.1371/journal.pone.0007109.
- Parsons L.M., Brosch R., Cole S.T., Somoskovi A., Loder A., Bretzel G., van Soolingen D., Hale Y.M., Salfinger M. (2002). Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR - based genomic deletion analysis. *Journal of Clinical Microbiology*; 40: 2339-2345.
- Pedersen B.K., Febbraio M.A.(2008). Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev.*; 88(4):1379-406. doi: 10.1152/physrev.90100.2007.
- Poli e Cocilovo (2005). *Microbiologia ed immunologia veterinaria*. UTET.

- Pollock J.M., Welsh M.D., McNair J. (2005). Immune responses in bovine tuberculosis: Towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108: 37-43.
- Pollock J.M., McNair J., Welsh M.D., Girvin R.M., Kennedy H.E., Mackie D.P., Neill S.D. (2001). Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis*; 81: 103-107.
- Prati P.S., Goyal A. (2013). Interleukin-6: a potent biomarker of mycobacterial infection. *Springer plus.*; 2: 686. doi:10.1186/2193-1801-2-686.
- Quinn P.J., Markey B.K., Leonard E.S., FitzPatrick E.S., Fanning S., Hartigan P.J. (2012) *Mycobacterium* species- In: *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Edited by Wiley-Blackwell, 250-262.
- Redaelli G. *Mycobacterium-Trattato di malattie infettive degli animali*, Farina R. e Scatozza F., UTET, Torino 1998, 303-327.
- Ramakrishnan L. (2012) Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis *Nature Reviews Immunology* 12, 352–366.
- Rastogi N., Legrand E., Sola C. (2001). The Mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 20: 21-54.
- Robbins & Cotran (2015). *Pathologic Basis of Disease*, 9th ed, by Kumar, Abbas, and Aster. Saunders Elsevier, Professional Edition.
- Roring S., Hughes M.S., Skuce R.A., Neill S.D. (2000). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium bovis* directly from bovine tissue specimens by spoligotyping. *Veterinary Microbiology*; 74: 227-236.
- Rosu V., Ahmed N., Paccagnini D., Gerlach G., Fadda G., Hasnain S.E., Zanetti S., Sechi L.A. (2009). Specific Immunoassays Confirm Association of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* with Type-1 but Type-2 Diabetes Mellitus. *Plos One*. 2009; 4(2): e4386. doi: 10.1371/journal.pone.0004386.
- Sangari F.J., Parker A., Bermudez L.E. (1999). *Mycobacterium avium* interaction with macrophages and intestinal epithelial cells. *Frontiers in Biosciences*; vol 4: pp. 582-588.
- Scanu A.M., Bull T.J., Cannas S., Sanderson J.D., Sechi L.A., Dettori G., Zanetti S., Hermon-Taylor J. (2007) *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Infection in Cases of Irritable Bowel Syndrome and Comparison with Crohn's

Disease and John's Disease: Common Neural and Immune Pathogenicities. *J Clin Microbiol*; pp. 3883-3890.

-Schlesinger L.S., Azad A.K., Torrelles J.B., Roberts E., Vergne I, Deretic V. (2008) Determinants of Phagocytosis, Phagosome Biogenesis and Autophagy for *Mycobacterium tuberculosis* Chapter 1 (Immunology and Cell Biology) in: *Handbook of Tuberculosis*, Wiley online library.

-Scarparo C., Piccoli P., Rigon A., Ruggiero G., Scagnelli M., Piersimoni C. (2000). Comparison of enhanced *Mycobacterium tuberculosis* amplified direct test with COBAS AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and extrapulmonary specimens. *Journal of Clinical Microbiology*; 38: 1559-1562.

-Scheller J., Chalaris A., Schmidt-Arras D., Rose-John S.(2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta.*; 1813 (5):878-88. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034.

-Schorey J.S., Cooper A.M. (2003). Macrophage signalling upon mycobacterial infection: the MAP kinases lead the way. *Cell Microbiology*; vol. 5: pp. 133-142

-Serraino A., Ostanello F., Giacometti F., Marchetti G., Arrigoni N., Ricchi M., Bonilauri P., Zanirato G.(2014). Paratuberculosis nel sud Italia: presenza negli allevamenti e valutazione del rischio, Budrio (BO), Litografia SAB [Monografia].

-Sierra Plana M.A., Ibarra L.P. (2004). Bases para la inspección de la tuberculosis bovina en matadero. Gobierno del Chile servicio agrícola y ganadero SAG.

-Siguroardottir O.G., Valheim M., Press C.McL. (2004). Establishment of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in the intestine of ruminants. *Advanced Drug Delivery Reviews*; vol. 56: pp. 819-834.

-Slana I., Paolicchi F., Janstova B., Navratilova P., Pavlik I. (2008b). Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. *Veterinarni Medicina*; 53(6), 283–306.

-Stevenson K. (2010). Comparative Differences between Strains of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* In: *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. Edited by Bher M.A. e Collins D.M. Preston, UK, 126-137.

-Sweeney R.W. (2011): Pathogenesis of Paratuberculosis. *Vet. Clin. Food Anim.*, 27, 537–546.

-Tiwari A., Vanleeuwen J.A., McKenna S.L., Keefe G.P. e Barkema H.W. (2006): John's disease in Canada. Part I: clinical symptoms, pathophysiology,

diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Canadian Veterinary Journal*; 47, 874–882.

-Townsend F.I. (2008). Bone marrow aspiration in dogs and cats. *Lab Anim (NY)*.; 37:497-8. doi: 10.1038/labani1108-497.

-Trinchieri G. (1995). Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.*; 13:251-76.

-Troupin V., Boucherit N., Gorvel L., Conti F., Mottola G., Ghigo E.(2013). Bone marrow-derived macrophage production. *J Vis Exp.*; (81):e50966. doi: 10.3791/50966.

-Van Embden J.D.A., Schouls L.M., van Soolingen D. (1995). Molecular techniques: applications in epidemiologic studies. In C. O. Thoen and J. H. Steele (ed). *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans, Iowa State University Press, Ames, Iowa, 15-27.

-Van Merris V., Meyer E., Gasthuys F., Burvenich C. (2001). Sternal aspiration of bone marrow in adult cows. *VLAAMS DIERGENEESKUNDIG TIJDSCHRIFT*; 70, 304–306.

-Van Soolingen D., Hoogenboezem T., De Haas P.E.W., Hermans P.W.M., Koedam M.A., Teppema K.S., Brennan P.J., Besra G.S., Portaels F., Top J., Schouls L.M., van Embden J.D.A. (1997). A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *International Journal of Systematic Bacteriology*; 47: 1236-1245.

-Vialard J. (2003). La paratuberculosi nei piccoli ruminanti. *Summa. Animali da reddito*; vol. 9: pp. 51-56.

-Vogel C., Marcotte E.M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet.* 2012 Mar 13; 13(4):227-32. doi: 10.1038/nrg3185.

-Wards B.J., Collins D.M., de Lisle G.W. (1995). Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, 43: 227-240.

-Wood P.R., Jones S.L. (2001). Bovigam: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis*; 81: 147-155.

-Wood P.R., Rothel J.S. (1994). In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*; 40: 125-135.

-Wood P.R., Corner L.A., Rothel J.S., Baldock C., Jones S.L., Cousins D.B., McCormick B.S., Francis B.R., Creeper J., Tweedle N.F. (1991). Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*; 31: 71-79.

-Juste R., Perez V. (2011). Control of Paratuberculosis in sheep and goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*; vol 27: pp. 127-138.

Sitografia

Arrigoni N. (2008): "La diagnostica di laboratorio in sanità animale"

<http://www.ruminantia.it/la-nuova-linea-guida-per-la-gestione-della-paratubercolosi/>

Ringraziamenti

Un immenso ed infinito grazie va alle dott.sse Emanuela Leonardi, Elisa Gerace, Vincenza Cannella e Laura Russotto che mi ha supportato e sopportato sempre e comunque nella buona e soprattutto nella cattiva sorte. GRAZIE!

Grazie alla prof.ssa Rosa Alduina dell'Università di Palermo che ha permesso la realizzazione della parte biomolecolare mettendo a disposizione tutta la sua esperienza e competenza.

Grazie al dott. Di Marco Lo Presti Vincenzo che ha reso possibile lo svolgimento di tutte le attività inerenti il progetto dandomi sempre la massima fiducia e sostegno.

Dulcis in fundo un grazie speciale alla dott.ssa Maria Vitale la mia mentore, guida professionale e mamma acquisita ed al prof.Santino Prospero per avermi sempre riservato consigli preziosi offrendomi tutta la sua gentilezza, disponibilità e professionalità.