

ALLEGATO 2a.

Diagnosi dell'infezione da complesso *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC)

Sommario

Riferimenti normativi	1
Indicazioni per il percorso diagnostico per l'infezione da complesso <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>M.bovis</i> , <i>M.caprae</i>)	2
1. Prove <i>intra-vitam</i> (prove diagnostiche ufficiali; Allegato III del Regolamento UE 2020/689)	2
1.1. Prove di intradermoreazione alla tubercolina	2
1.2. Prova del gamma-interferone (IGRA)	4
1.3. Prove sierologiche per la rilevazione di anticorpi specifici anti <i>M. bovis</i>	6
2. Indagini diagnostiche <i>post mortem</i>	7
2.1. Esame ispettivo mirato e prelievo dei campioni per le indagini diagnostiche dirette	8
2.2. Esame istopatologico	9
2.3. Rilevamento antigeni del MTBC	9
2.4. Rilevamento dell'acido nucleico di MTBC	9
2.5 Isolamento di MTBC	10
2.6. Caratterizzazione isolati di <i>Mycobacterium</i> spp.	11
2.6.1. Identificazione del ceppo isolato	11
2.6.2. Genotipizzazione	12
3. Conferma della presenza di infezione da MTBC	12

Riferimenti normativi

Regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio del 9 marzo 2016, relativo alle malattie animali trasmissibili e che modifica e abroga taluni atti in materia di sanità animale («Animal Health Law»)

Regolamento (UE) 2017/625 del Parlamento europeo e del Consiglio del 15 marzo 2017 relativo ai controlli ufficiali e alle altre attività ufficiali effettuati per garantire l'applicazione della legislazione sugli alimenti e sui mangimi, delle norme sulla salute e sul benessere degli animali, sulla sanità delle piante nonché sui prodotti fitosanitari, recante modifica dei regolamenti (CE) n. 999/ 2001, (CE) n. 396/2005, (CE) n. 1069/2009, (CE) n. 1107/2009, (UE) n. 1151/2012, (UE) n. 652/2014, (UE) 2016/429 e (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio, dei regolamenti (CE) n. 1/2005 e (CE) n. 1099/2009 del Consiglio e delle direttive 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE e 2008/120/CE del Consiglio, e che abroga i regolamenti

(CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE e 97/78/CE del Consiglio e la decisione 92/438/CEE del Consiglio (regolamento sui controlli ufficiali), art. 34

Regolamento delegato (UE) 2020/689 della Commissione, del 17 dicembre 2019, che integra il regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le norme relative alla sorveglianza, ai programmi di eradicazione e allo status di indenne da malattia per determinate malattie elencate ed emergenti, art. 6

Manuale dei test diagnostici e dei vaccini per animali terrestri dell'Organizzazione mondiale per la salute animale (Manuale WOAH). Chapter 3.1.13. Mammalian tuberculosis (infection with *Mycobacterium tuberculosis* complex)

(https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.13_Mammalian_tuberculosis.pdf)

Bovine Tuberculosis European Union Reference Laboratory (EURL). Procedure Operative Standard (SOP) e Linee guida per la diagnosi della Tuberculosis Bovina
(<https://www.visavet.es/bovinetuberculosis/databases/protocols.php>)

Ai sensi dell'art. 6, punto 1 del Regolamento (UE) 2020/689, i Servizi Veterinari delle ASL e i laboratori ufficiali degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali assicurano che il prelievo di campioni, le tecniche, la convalida e l'interpretazione dei metodi diagnostici utilizzati per la diagnosi di infezione da MTBC siano conformi:

alla normativa specifica adottata conformemente al regolamento (UE) 2016/429 e alle informazioni e alle indicazioni pertinenti rese disponibili sui siti web del laboratorio di riferimento dell'Unione europea (EURL TB), VISAVET dell'Università di Madrid, e della Commissione;

se non contemplati dalla normativa, dalle informazioni e dalle indicazioni di cui alla lettera a), alle procedure descritte nel manuale dei test diagnostici e dei vaccini per animali terrestri dell'Organizzazione mondiale per la salute animale (Capitolo 3.1.13 Tuberculosis dei mammiferi);

se non contemplati alle lettere a) e b) del presente paragrafo, ai metodi definiti da norme nazionali o, se tali norme non esistono, ai metodi pertinenti sviluppati o in uso presso il laboratorio Nazionale di Riferimento (LRN-TB), sito presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sede di Brescia, convalidati in base a protocolli scientifici accettati internazionalmente o metodi pertinenti sviluppati presso i laboratori ufficiali convalidati da circuiti interlaboratorio periodici in base a protocolli scientifici accettati internazionalmente.

Indicazioni per il percorso diagnostico per l'infezione da complesso *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis*, *M.bovis*, *M.caprae*)

1.Prove *intra-vitam* (prove diagnostiche ufficiali; Allegato III del Regolamento UE 2020/689)

1.1.Prove di intradermoreazione alla tubercolina

Campo di applicazione

Sono previsti i seguenti test intradermici (Allegato III del Regolamento UE 2020/689):

Prova di intradermotuberculinizzazione singola (IDTs): questa prova richiede un'unica inoculazione intradermica della tubercolina bovina. E' la prova diagnostica ufficiale con la sensibilità più elevata e va utilizzata come prova di riferimento per l'acquisizione ed il mantenimento dello status di indennità degli stabilimenti e per i controlli sui capi soggetti a movimentazione.

Prova di intradermotuberculinizzazione comparativa (IDTc): questo test richiede un'iniezione di tubercolina bovina e un'iniezione di tubercolina aviaria somministrate simultaneamente. E' la prova diagnostica ufficiale con la specificità più elevata e può essere utilizzata nell'ambito delle indagini per la conferma di eventuali casi sospetti o per il mantenimento della qualifica in stabilimenti che storicamente mostrano reazioni falsamente positive non confermate alla IDT singola.

Trattandosi di una prova diagnostica che viene eseguita sul campo e non nelle condizioni controllate di laboratorio, il servizio Veterinario della ASL predispone una procedura che specifichi come viene garantita la affidabilità dei test tuberculinici effettuati. Tale procedura deve riportare almeno:

Le modalità con cui viene svolta o verificata la formazione dei veterinari incaricati delle prove, in particolare quando si tratti di veterinari ufficiali di nuova assunzione o di veterinari non dipendenti dal SSR/SSN;

Le modalità con cui viene periodicamente verificata la disponibilità e la funzionalità dell'attrezzatura necessaria alla prova (siringa, cutimetro, lettore di boli, ecc.) e le modalità di conservazione e trasporto delle tubercoline da parte dei veterinari incaricati della prova;

Le modalità con cui viene svolta l'attività di supervisione da parte dei veterinari ufficiali (es. sopralluoghi congiunti; riconrollo di allevamenti indenni da parte di veterinari ufficiali esperti);

Le verifiche sulle modalità di esecuzione delle prove in caso di riscontro di casi confermati di infezione da MTBC (lesioni *post mortem*, confermate da prove diagnostiche dirette) inviati per la macellazione regolare e sottoposti a prova tuberculinica con esito favorevole da meno di 6 mesi.

Procedura di esecuzione delle prove di intradermoreazione alla tubercolina

L'antigene per la prova intradermica della tubercolina è un derivato proteico purificato (PPD) denominato "tubercolina". Questo reagente viene preparato dai prodotti della crescita e della lisi del *Mycobacterium bovis* (PPD bovina) o *M. avium* (PPD aviaria). Le tubercoline da utilizzare nelle prove di IDT sono preparate secondo le indicazioni riportate nel Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals del WOA (fondato come OIE) dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, Teramo e dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia. Prima dell'immissione sul mercato la potenza di ogni lotto prodotto viene controllata dall'Istituto Superiore di Sanità, delegato per tale attività dal LNR di Brescia, per verificare se rientra nei parametri di tolleranza previsti dal manuale del WOA.

Le procedure per l'esecuzione della prova tuberculinica e per l'interpretazione dei risultati in bovini, caprini e camelidi sono disponibili sul sito dell'EURL-TB

(<https://www.visavet.es/bovinetuberculosis/databases/protocols.php>).

Una traduzione in italiano della procedura per la diagnosi nel bovino è disponibile sul sito del LNR dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (http://archive.izsler.it/pls/izs_bs/v3_s2ew_consultazione.mostra_pagina?id_pagina=1818)

Le procedure per l'esecuzione della prova tubercolinica e per l'interpretazione dei risultati in ovini, suini, animali esotici e da zoo sono riportati nel capitolo 3.01.13 "Mammalian Tuberculosis" del Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals del WOAH (<https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>)

Interpretazione dei risultati

L'interpretazione si basa su osservazioni cliniche e sull'aumento dello spessore della piega cutanea (mm) rilevato nei siti di inoculazione 72 ore (\pm 4 ore) dopo l'iniezione di PPDs rispetto allo spessore di partenza. La IDT prevede tre possibili esiti:

Reazione negativa;

Reazione dubbia;

Reazione positiva.

Gli animali che non presentano reazione negativa vanno considerati come sospetti di infezione e sottoposti a indagine epidemiologica e a ulteriori indagini per confermare o escludere l'infezione da MTBC. Qualora la reazione positiva o dubbia si verifichi nell'ambito di un controllo effettuato in uno stabilimento con infezione confermata (focolaio) gli animali non negativi vanno classificati come casi confermati di infezione.

1.2. Prova del gamma-interferone (IGRA)

Campo di applicazione

Anche la prova di rilascio del gamma-interferone (IFN- γ) o IGRA è una prova diagnostica ufficiale riportata nell'Allegato III del Reg. Del. (UE) 689/2020. Gli animali infettati da batteri appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex hanno linfociti periferici sensibili agli antigeni di questi micobatteri. Il rilascio di gamma interferone da linfociti sensibilizzati durante un periodo di incubazione di 18-24 ore con antigene specifico (PPD) viene misurato in un sistema di coltura del sangue intero. Il test si avvale del confronto tra la produzione di interferone gamma in seguito alla stimolazione con PPD aviaria (PPD-A) e bovina (PPD-B). L' IFN- γ rilasciato viene rilevato mediante ELISA.

L'IGRA è raccomandata nei casi in cui si sospetta un deficit di risposta alla prova tubercolinica o si voglia aumentare la sensibilità della procedura diagnostica. Può essere eseguita in parallelo con la prova tubercolinica effettuando il prelievo di sangue il giorno stesso della inoculazione. L'IGRA è particolarmente indicato nelle seguenti situazioni:

Operazioni di risanamento in stabilimenti con casi di infezione da MTBC confermata;

Indagini in stabilimenti indenni in seguito al riscontro di lesioni anatomo-patologiche sospette al macello (Mod. 10/33);

Controlli per il mantenimento dello status di indennità di allevamenti allo stato brado o semibrado;

Controlli pre-movimentazione di allevamenti transumanti da province non indenni verso province con status di indenne da infezione.

Procedura per il prelievo dei campioni ematici

Prima di eseguire il prelievo è necessario concordare con il laboratorio: numero di campioni da prelevare, data e orario previsto per la consegna dei campioni.

Prelevare da ogni animale il campione di sangue dalla vena giugulare in provetta tipo “vacutainer” contenente Litio o Sodio Eparina. Il volume deve essere di almeno 7 ml per provetta e comunque non inferiore al volume indicato dal laboratorio. E’ possibile effettuare il prelievo dalla vena caudale, segnalandolo nel verbale di prelievo, ma in questo caso è necessario che l’area di prelievo sia pulita per evitare la contaminazione fecale del campione ematico. Prima di riporre la provetta, invertirla delicatamente più volte in modo che l’anticoagulante si distribuisca in tutto il campione di sangue.

Consegnare i campioni prelevati, accompagnati da un documento riportante gli identificativi degli animali soggetti a prelievo (es. Mod. 2/33) preferibilmente entro 8 ore dal prelievo e comunque entro le 24 ore. Durante il trasporto i campioni devono essere tenuti a temperatura ambiente (tra 18 e 25 °C).

Procedura

Nella IGRA vengono utilizzati kit commerciali e per ciascuno di essi specifiche procedure operative standard (SOP) per la specie bovina e caprina sono disponibili sul sito web dell’EURL-TB (<https://www.visavet.es/bovinetuberculosis/databases/protocols.php>).

Il laboratorio che analizza i campioni deve utilizzare un metodo di prova accreditato. I campioni devono essere prelevati, manipolati ed etichettati o identificati in modo tale da garantirne il valore legale e la validità scientifica e tecnica.

Il Regolamento (UE) 2020/689 fissa in 6 settimane l’età minima per i test diagnostici ufficiali, tuttavia l’EURL-TB raccomanda di eseguire la prova su animali con più di sei mesi di età e a distanza di almeno 60 giorni dalla prova intradermica. In caso di campionamenti che coinvolgano anche questa tipologia di animali si ricorda che per la valutazione dei risultati della prova occorre tenere sempre presenti tutte le informazioni supplementari (esiti delle altre prove diagnostiche, anamnesi clinica, storia epidemiologica dello stabilimento, ecc.).

L’immunosoppressione causata dal recente trattamento con desametasone o dal parto può deprimere il rilascio di IFN- γ agli antigeni micobatterici. Gli animali che hanno ricevuto un’iniezione di desametasone da meno di una settimana, o che hanno partorito da meno di 4 settimane, se risultati negativi, dovrebbero essere sottoposti a nuovo esame per ridurre la possibilità di un risultato falso negativo. Il laboratorio può prevedere l’impiego, nella fase di stimolazione linfocitaria del test, di un mitogeno aspecifico per valutare la vitalità e l’efficienza dei linfociti; in tal caso nel metodo

andrà specificata la modalità di interpretazione dell'esito.

Tempi di risposta

Il laboratorio che effettua la prova è tenuto a fornire i risultati della prova entro 5 giorni lavorativi dal ricevimento dei campioni.

Gli animali che presentano reazione positiva alla prova vanno considerati come sospetti di infezione e sottoposti a indagine epidemiologica e a ulteriori indagini per confermare o escludere l'infezione da MTBC. Qualora la reazione positiva si verifichi nell'ambito di un controllo effettuato in uno stabilimento con infezione confermata (focolaio) gli animali positivi vanno classificati come casi confermati di infezione.

1.3. Prove sierologiche per la rilevazione di anticorpi specifici anti M. bovis

Campo di applicazione

I test sierologici sono stati proposti come uno strumento diagnostico ausiliario per integrare i metodi diagnostici ufficiali basati sulla risposta cellulo-mediata, aumentando la possibilità di rilevare animali infetti e aiutando a controllare la tubercolosi negli animali domestici e selvatici. Questi test potrebbero essere particolarmente utili per individuare animali anergici che non rispondono alle prove diagnostiche basate sulla risposta cellulo-mediata.

L'ELISA è la tecnica più diffusa, tuttavia sono state sviluppate piattaforme sierologiche alternative (test a flusso laterale, immunodosaggi multi-antigene o test chemiluminescenti multiplex). I vantaggi di questi test sono la loro semplicità, economicità e minori esigenze logistiche rispetto, per esempio, all'IGRA, in quanto non richiedono la tempestiva stimolazione dei linfociti T, e i campioni possono essere conservati per un tempo prolungato prima dell'analisi. La loro sensibilità è inferiore a quella dei test allergici, in particolare negli animali con infezione precoce, anche se aumenta nelle fasi avanzate della malattia. L'uso di combinazioni di antigeni specifici, come MPB83, MPB70, ESAT-6 e CFP-10, o complessi multiproteici ricavati dalla PPD bovina (es. P22) aumenta la sensibilità e la specificità di questi test.

I test sierologici sono utili per rilevare le infezioni da MTBC nella fauna selvatica o negli animali detenuti negli zoo perché sono facili da eseguire e forniscono risultati immediati. Sebbene la loro sensibilità sia limitata, questi metodi sono importanti laddove non sono disponibili test immunologici e dove la prova tubercolinica si è dimostrata inefficace.

Negli allevamenti bovini il test potrebbe essere utilizzato per le seguenti finalità:

1. Confermare, ma non negare, la diagnosi di casi sospetti clinici.
2. Individuare animali infetti da *Mycobacterium bovis* in stato anergico e pertanto non positivi alla

prova tubercolinica o all'IGRA, ma che presentano risposta anticorpale specifica contro M.bovis.

3. Come test di screening, per identificare gli animali con maggiore probabilità di avere lesioni tubercolari visibili all'ispezione post mortem.

Procedura

I test sierologici vengono eseguiti su campioni di siero.

Nei programmi di autocontrollo, per massimizzare la sensibilità dei test sierologici è consigliabile effettuare il prelievo dei campioni ematici nei 15-30 giorni successivi alla prova tubercolinica. Questa

pratica, che sfrutta l'effetto booster stimolato dalla inoculazione di PPD bovina, è raccomandata anche per i camelidi.

In genere per la diagnosi sierologica di tubercolosi vengono utilizzati kit commerciali. E' opportuno preferire kit valutati dal WOA. L'elenco dei test validati è disponibile sul sito web del WOA: <https://www.woah.org/en/what-we-offer/veterinary-products/diagnostic-kits/the-register-of-diagnostic-kits/>.

Interpretazione del risultato

Trattandosi di test non ufficiali, gli animali che presentano reazione positiva al test sierologico non sono considerati sospetti di infezione, ma vanno comunque segnalati al servizio veterinario competente per lo stabilimento che procederà alla conferma del risultato attraverso l'esecuzione di una prova diagnostica ufficiale.

2.Indagini diagnostiche *post mortem*

Tutti gli animali dichiarati sospetti dall'Autorità competente devono essere sottoposti ad indagini per confermare o escludere l'infezione da MTBC. Dal momento che al momento non sono disponibili test diagnostici diretti *intra vitam* conformi alla normativa per la conferma di infezione da MTBC, la conferma deve avvenire attraverso la macellazione di uno o più capi sospetti sui quali saranno effettuate prove diagnostiche *post mortem*.

2.1. Esame ispettivo mirato e prelievo dei campioni per le indagini diagnostiche dirette

Campo di applicazione

L'esame ispettivo mirato ed il prelievo dei campioni per le indagini diagnostiche dirette va eseguito su tutti i casi dichiarati sospetti di infezione, sia su quelli sottoposti a macellazione in seguito ad un risultato non negativo alle prove diagnostiche ufficiali *intra-vitam*, sia su quelli riscontrati con lesioni compatibili con la tubercolosi alla macellazione regolare.

L'esame ispettivo mirato deve essere effettuato anche in capi macellati provenienti da stabilimenti con infezione da MTBC confermata (sia positivi che negativi alle prove diagnostiche ufficiali). In caso di riscontro di lesioni tubercolari in questi animali, vanno prelevati campioni per le indagini diagnostiche dirette in un campione da almeno un animale per partita.

Procedura

Esaminare con grande cura gli organi più frequentemente esposti all'infezione tubercolare:

polmoni (nell'infezione per via aerogena),

intestino e fegato (nell'infezione per via orale),

tutti i linfonodi regionali, in particolare quelli della testa e del torace.

All'esame ispettivo esterno ed alla palpazione degli organi e dei linfonodi tributari seguiranno dei tagli paralleli a distanza di pochi centimetri uno dall'altro, al fine di evidenziare la presenza di tubercoli miliari o submiliari che altrimenti potrebbero sfuggire all'esaminatore. Una volta localizzata la lesione procedere al prelievo dell'organo colpito.

In assenza di lesioni macroscopiche visibili (NVL), in soggetti positivi o sospetti, prelevare le amigdale e linfonodi di ciascuno dei pacchetti rappresentativi dell'apparato digerente, respiratorio e mammario:

linfonodi della testa (sottomandibolari e retrofaringei);

linfonodi tracheo-bronchiali;

linfonodi mediastinici;

linfonodi epatici;

linfonodi mesenterici;

linfonodi prescapolari;

Per queste operazioni, soprattutto se riguardano più animali, può essere richiesto il supporto del personale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale competente.

Il trasporto, agli IZZSS competenti per territorio, deve avvenire a temperatura controllata, nel più breve tempo possibile; il congelamento rappresenta un sussidio per necessità in quanto interferisce con la vitalità dei micobatteri e con l'esame istologico. Nel caso non possano essere consegnati

entro le 48 ore, i campioni vanno refrigerati per l'esecuzione delle prove diagnostiche dirette. Nel caso in cui si voglia procedere anche con l'esame istologico porre una parte dei campioni in formalina tamponata al 10%. In caso di lesioni di pochi millimetri, va privilegiato l'esame colturale e/o di biologia molecolare.

2.2 Esame istopatologico

Campo di applicazione

L'esame istologico deve essere sempre richiesto in caso di riscontro di lesioni compatibili con la tubercolosi in animali sospetti sottoposti a macellazione regolare o macellati perché non negativi ad una prova diagnostica ufficiale.

Procedura

La prova viene eseguita sull'aliquota dei campioni fissata in formalina tamponata al 10%. Nel caso di lesione compatibile con infezione tubercolare, il laboratorio potrà anche eseguire la ricerca dei bacilli acido-resistenti mediante colorazione di Ziehl-Neelsen. Nel referto dovranno essere indicati da parte del laboratorio gli elementi per confermare la presenza di lesioni tubercolari o, eventualmente, per ottenere una diagnosi differenziale da lesioni compatibili.

Tempi di risposta

Il laboratorio, dato il carattere non conclusivo della prova, è tenuto a produrre il rapporto di prova relativo all'esame istologico assieme al risultato dell'esame colturale o di biologia molecolare (PCR).

2.3. Rilevamento antigeni del MTBC

Campo di applicazione

Sebbene alcuni Istituti Zooprofilattici Sperimentali eseguano prove immunoistochimiche che utilizzano sieri policlonali anti *Mycobacterium bovis* volte ad evidenziare la presenza di antigeni di questo agente patogeno nelle lesioni specifiche, tali prove per essere utilizzate per la conferma di infezione devono essere validate e accreditate come richiesto dalla normativa comunitaria. In assenza di una procedura diagnostica validata, gli esiti delle indagini immunoistochimiche vanno usati solamente a eventuale supporto dei risultati delle altre prove diagnostiche dirette per la conferma di infezione da MTBC.

2.4. Rilevamento dell'acido nucleico di MTBC

Campo di applicazione

La rilevazione dell'acido nucleico di MTBC viene effettuata mediante prove di biologia molecolare (PCR diretta). Tale prova va sempre eseguita sui campioni prelevati da animali dichiarati sospetti di infezione sottoposti a esame ispettivo mirato o in caso di macellazione regolare e presenza di lesioni compatibili con tubercolosi. Il rilevamento dell'acido nucleico da campione biologico deve permettere di determinare la presenza di MTBC e, possibilmente, di *M. bovis* o *M. caprae*.

Procedura

Sul sito dell'EURL-TB sono attualmente disponibili linee guida (<https://www.visavet.es/bovinetuberculosis/databases/protocols.php>):

DNA isolation from tissue samples (basato sull'estrazione con colonnine Qiagen (DNA blood and Tissue kit).

Real time for the detection of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) basato sull'amplificazione dell'elemento d'inserzione IS6110.

Real Time PCR for detection of *Mycobacterium bovis* (basato sull'amplificazione della “flanking region of Difference RD4”).

La procedura di estrazione dell'acido nucleico indicata dall'EURL-TB è applicabile solo da quei laboratori che hanno la possibilità di eseguire l'estrazione dell'acido nucleico in un laboratorio BSL3.

Se l'estrazione dell'acido nucleico non viene eseguita in un laboratorio BSL3 è necessario inattivare il campione tramite bollitura in un laboratorio BSL3 e poi procedere al trasferimento del campione inattivato al laboratorio di analisi molecolari.

Inoltre, il protocollo per il rilevamento di MTBC dell'EURL-TB, basato sull'amplificazione dell'elemento d'inserzione IS6110, ha mostrato cross-reattività con *Mycobacterium marinum* e *Mycobacterium avium* subsp. *Hominissuis*. Pertanto, lo stesso EURL-TB consiglia di applicare due metodi molecolari basati su target diversi per assicurare la specificità del risultato.

Il Laboratorio Nazionale di Riferimento per la Tubercolosi da *M. bovis* (LRN-TB) fornisce a richiesta le procedure in uso e i relativi report di validazione relativi ai protocolli di estrazione dell'acido nucleico e delle reazioni PCR.

Tempi di risposta

Il laboratorio è tenuto a produrre il rapporto di prova relativo alla prova PCR entro 3 settimane (15 giorni lavorativi) dal ricevimento del campione.

2.5. Isolamento di MTBC

Campo di applicazione

L'isolamento colturale è la prova principale per confermare la presenza di infezione da MTBC in uno stabilimento con casi sospetti e va sempre effettuata nell'ambito delle indagini volte a confermare la presenza dell'infezione. Tale prova viene eseguita su campioni prelevati da animali dichiarati sospetti di infezione sottoposti a esame ispettivo mirato.

L'isolamento colturale permette l'identificazione presuntiva di microrganismi compatibili con MTBC, che devono essere successivamente caratterizzati mediante test biochimici e/o di biologia molecolare.

Procedura

Indicazioni specifiche sui metodi diagnostici per l'isolamento dei micobatteri da campioni biologici sono riportati:

- a) sul sito web dell'EURL-TB;
- b) nel manuale WOA.

Per l'isolamento primario dei micobatteri sono utilizzati generalmente terreni colturali solidi. E' comunque raccomandato l'impiego in parallelo terreni colturali solidi e liquidi. Tale combinazione infatti consente di migliorare le performance del test. Il Laboratorio Nazionale di Riferimento per la Tubercolosi da *M. bovis* (LRN-TB) fornisce a richiesta le procedure in uso e i relativi report di validazione.

Tempi di risposta

Il laboratorio che effettua la prova è tenuto a produrre il rapporto di prova relativo all'esame colturale entro 90 giorni dal ricevimento del campione.

2.6. Caratterizzazione isolati di *Mycobacterium* spp.

2.6.1. Identificazione del ceppo isolato

Campo di applicazione

In caso di isolamento colturale, l'identità dell'isolato deve essere sempre determinata in modo da confermare la presenza di isolati del gruppo MTBC. Ai fini del programma di sorveglianza ed eradicazione è importante identificare il *M.bovis* e/o il *M.caprae*.

Procedura

L'identificazione di *M.bovis*/*M.caprae* può avvenire tramite metodi molecolari o metodi fenotipici/biochimici che lo distinguano da *M. avium* o da altri micobatteri ambientali.

L'identificazione con metodi molecolari è preferibile in quanto fornisce risultati in tempi più rapidi. Specifiche indicazioni sono riportate sul Manuale del WOAHA al Capitolo 3.1.13. Il LNR-TB mette a disposizione a richiesta le procedure in uso e i report di validazione dei metodi utilizzati.

Tempi di risposta

I tempi di risposta per la caratterizzazione del ceppo sono di 2 settimane (10 giorni lavorativi) dall'isolamento o dall'arrivo del ceppo in laboratorio.

2.6.2. Genotipizzazione

Campo di applicazione

La genotipizzazione di tutti i ceppi isolati durante l'attività di sorveglianza ed eradicazione è fortemente consigliata. I dati dei profili genetici dei ceppi isolati forniscono informazioni utili a determinare le catene di trasmissione e le fonti d'infezione. Sono pertanto dati importanti per la completezza dell'indagine epidemiologica, e permettono di adottare misure di intervento più appropriate ai singoli casi.

Procedura

I ceppi devono essere inviati tempestivamente al LNR-TB per l'analisi del genotipo. Attualmente la genotipizzazione viene eseguita tramite le tecniche di Spoligotyping e Multi Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) di 12 marcatori, ma nel caso di genotipi diffusi, per i quali tale analisi non è esaustiva, viene affiancata l'analisi dell'intero genoma (WGS).

Nel caso non sia possibile inviare in tempi brevi i ceppi vivi, è possibile inviare tempestivamente il ceppo inattivato ed in un momento successivo i ceppi vivi. La raccolta dei ceppi da parte dell'LNR è fondamentale per gli approfondimenti epidemiologici e a fini di ricerca.

Tempi di risposta

I tempi di risposta per la genotipizzazione classica sono di 3 settimane (15 giorni lavorativi) dall'arrivo del ceppo in laboratorio.

I tempi di risposta per il WGS sono di 4 settimane (20 giorni lavorativi) dall'arrivo del ceppo in laboratorio.

3. Conferma della presenza di infezione da MTBC

La classificazione di un caso confermato di infezione da MTBC viene fatta dal Servizio veterinario ASL competente per lo stabilimento con casi sospetti. Si tratta di una diagnosi che deve tenere conto di diversi elementi, quali:

Gli esiti delle prove diagnostiche ufficiali;

Gli esiti dell'indagine epidemiologica, che comprenda anche una analisi del contesto in cui i casi sospetti sono stati rilevati;

Gli esiti delle ulteriori indagini, quali esami ispettivi, istologici e diagnostici diretti.

Non è infatti possibile classificare come infetto un animale o un allevamento solamente sulla base degli esiti positivi delle prove diagnostiche ufficiali (IDT e IGRA), anche qualora si presentassero in un alto numero di soggetti, ma devono essere verificate le seguenti condizioni:

da un campione prelevato da uno o più animali è stato isolato un micobatterio appartenente al MTBC (*M.tuberculosis*; *M.bovis*; *M caprae*). L'isolamento di MTBC anche in un solo animale permette di dichiarare infetto lo stabilimento (gruppo di animali) in cui questo animale ha vissuto.

Una volta che in uno stabilimento è confermata la presenza di infezione da MTBC non è necessario confermare la presenza dell'infezione in tutti i capi risultati positivi alle prove diagnostiche detenuti nel suddetto stabilimento.

Di regola l'isolamento del MTBC è sempre richiesto per la conferma di infezione in stabilimenti indenni situati in province o regioni con lo status di indenne da malattia.

Data la non elevata sensibilità dell'esame colturale, è possibile confermare la presenza dell'infezione anche quando ricorrono i seguenti casi:

in un campione prelevato da un animale o da un gruppo di animali che presentano segni clinici compatibili con la malattia (comprese le lesioni tubercolari) o una connessione epidemiologica con un caso sospetto o confermato è stato individuato mediante PCR l'acido nucleico specifico di un micobatterio appartenente al MTBC; oppure

in un campione prelevato da un animale o da un gruppo di animali che presentano segni clinici compatibili con la malattia o una connessione epidemiologica con un caso sospetto o confermato è stato ottenuto un risultato positivo utilizzando un metodo diagnostico indiretto (IDT e/o IGRA).

In assenza di isolamento dell'agente patogeno, la conferma della presenza di infezione da MTBC quando ricorrono le condizioni di cui alle lettere b) e c) va effettuata negli stabilimenti situati in province non indenni. Fino a che non si arrivi all'isolamento di MTBC è comunque opportuno continuare a richiedere l'esame colturale dai soggetti positivi alle prove sottoposti a macellazione.

Nella tabella successiva sono riportate, con il relativo riferimento normativo, le condizioni che permettono la conferma di infezione da MTBC.

			Esito Prove diagnostiche dirette	Esito Prove diagnostiche indirette
--	--	--	---	---

Riferimento articolo 9 Reg. (UE) 2020/689	Connessione epidemiologica con un caso sospetto o confermato¹	Segni clinici compatibili²	Rilevazione acido nucleico specifico (PCR)	Prova colturale	Prova tubercolinica singola o comparativa	Prova del gamma-interferon
Paragrafo 2, lettera a)				Isolamento <i>M.bovis</i> / <i>M.caprae</i>		
Paragrafo 2, lettera b)	Presenza		Positiva			
Paragrafo 2, lettera b)		Presenza	Positiva			
Paragrafo 2, lettera c)	Presenza				Positiva o Dubbia	
Paragrafo 2, lettera c)		Presenza			Positiva o Dubbia	
Paragrafo 2, lettera c)	Presenza					Positiva
Paragrafo 2, lettera c)		Presenza				Positiva

¹Il collegamento epidemiologico deve essere documentato nell'indagine epidemiologica (Allegato 2.c) e supportato dall'esito di prove diagnostiche

²Con riferimento alla definizione di caso sospetto di cui all'Allegato 2 al presente decreto