

ESTRATTO



Volume 28 - Numero 6
Giugno 2015

ISSN 0394-9303 (cartaceo)
ISSN 1827-6296 (online)

Notiziario

dell'Istituto Superiore di Sanità

**Il *Mycobacterium bovis*
e la resistenza agli antibiotici:
l'importanza del monitoraggio sul territorio**

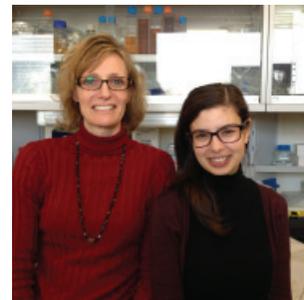
F. Armas, C. Marianelli

Poste Italiane S.p.A. - Spedizione in abbonamento postale - 70% - DCB Roma



www.iss.it

IL MYCOBACTERIUM BOVIS E LA RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI: L'IMPORTANZA DEL MONITORAGGIO SUL TERRITORIO



Federica Armas e Cinzia Marianelli

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, ISS

RIASSUNTO - Il *Mycobacterium bovis* è l'agente eziologico principale della tubercolosi bovina (bTB) e appartiene a *M. tuberculosis* complex. Il patogeno presenta un quadro epidemiologico di infezione complesso, che coinvolge gli animali domestici e selvatici, e l'uomo. *M. bovis* è in grado di causare nell'uomo una patologia indistinguibile da quella causata dall'*M. tuberculosis*. La popolazione che lavora a contatto con gli animali o con i loro prodotti è a maggior rischio d'infezione. In Italia, il programma di eradicazione della bTB ha portato a una graduale riduzione della malattia nella maggior parte delle regioni. In Sicilia, al contrario, la bTB è ancora un grosso problema. Un precedente studio ha riportato in Sardegna l'isolamento da bovini di ceppi di *M. bovis* resistenti ai due principali antibiotici utilizzati nel trattamento della tubercolosi nell'uomo, l'isoniazide e la rifampicina. Questo dato supporta l'importanza della sorveglianza del fenomeno dell'antibiotico-resistenza per i ceppi di *M. bovis* circolanti nei territori maggiormente a rischio. Recentemente, l'Istituto Superiore di Sanità ha condotto studi di antibiotico-sorveglianza in alcune aree ad alta incidenza di bTB, escludendo, per il momento, la circolazione di ceppi animali di *M. bovis* resistenti agli antibiotici testati nelle aree studiate.

Parole chiave: *Mycobacterium bovis*; tubercolosi bovina; resistenza agli antibiotici

SUMMARY (*Mycobacterium bovis and antibiotic resistance: the relevance of the territorial monitoring*) - *Mycobacterium bovis* is the main etiological agent of bovine tuberculosis (bTB) and belongs to the *M. tuberculosis* complex. The pathogen has an intricate epidemiological pattern of infection involving domestic and wild animals, as well as humans. *M. bovis* is able to cause a disease pathologically indistinguishable from that caused by *M. tuberculosis* in humans. The highest risk groups include farmers, meat packers, veterinarians and zoo keepers. In Italy, the national eradication program resulted in a gradual reduction of bTB prevalence in most regions. In Sicily, on the other hand, bTB is still a major concern. In a previous study, *M. bovis* strains isolated from cattle in Sardinia were found to be resistant to isoniazid and rifampin, the main drugs used to treat tuberculosis in humans. These findings highlight the relevance of the territorial monitoring of antibiotic resistance. The Italian National Institute of Health has recently carried out studies on antibiotic resistance surveillance in bTB endemic areas. Results showed the isolation of sensitive animal *M. bovis* isolates toward all the drugs tested in the areas under study.

Key words: *Mycobacterium bovis*; bovine tuberculosis; antimicrobial resistance

cinzia.marianelli@iss.it

Il *Mycobacterium bovis*, un bacillo immobile, asporigeno e acido-resistente, appartenente al *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC), è il principale agente eziologico della tubercolosi bovina (bTB). La bTB ha importanti ricadute a livello socio-economico e di salute pubblica. Essa colpisce l'uomo e gli animali e si presenta con decorso per lo più cronico e depauperante, caratterizzata da processi produttivi di tipo granulomatoso con formazione di noduli (tubercoli) e processi essudativi. Le lesioni possono

coinvolgere tutti gli organi e i tessuti, con particolare frequenza i linfonodi, i polmoni, l'intestino, il fegato, la milza, e le sierose pleurica e peritoneale.

M. bovis è considerato uno dei patogeni con il più ampio spettro d'ospite. Oltre all'uomo e al bovino, il patogeno infetta diverse specie di animali domestici e selvatici (1). Nell'uomo, il patogeno è in grado di provocare forme di malattia indistinguibili per gravità, lesioni e decorso rispetto alla forma causata dall'*M. tuberculosis* (2). ▶

Negli animali, il contagio avviene generalmente per via aerogena, talvolta per ingestione ed eccezionalmente attraverso lesioni cutanee. L'ingestione di latte crudo contaminato è la prima causa di contagio nell'uomo.

Nei Paesi industrializzati, l'implementazione di programmi di controllo negli allevamenti ha ridotto con successo la prevalenza della bTB negli animali, rendendo le infezioni umane da *M. bovis* eventi occasionali. Al contrario, nei Paesi in via di sviluppo, l'assenza di adeguati controlli negli allevamenti, unitamente ad aspetti socio-culturali quali il consumo di latte non pastorizzato, il contatto stretto con gli animali, la povertà, la malnutrizione e l'elevato tasso di infezione da HIV, rendono la popolazione ad altissimo rischio di infezione (3).

In generale, l'impatto di *M. bovis* sulla popolazione è sottostimato. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), in accordo con l'International Office of Epizootics (OIE) e la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), ha classificato recentemente la bTB come una zoonosi negletta, riferendosi in modo speciale ai Paesi ad alto rischio.

In Italia, la bTB negli animali è soggetta ai piani di controllo sin dal 1964. Nel panorama nazionale, alcune province e regioni sono state dichiarate ufficialmente indenni ai sensi della normativa comunitaria. Tuttavia, in Piemonte, Valle d'Aosta, Liguria e in tutte le regioni del centro-sud, isole comprese, la bTB è ancora presente. La Sicilia è risultata la regione con la più alta prevalenza e incidenza di tubercolosi bovina e bufalina sul territorio; l'aumento sulla base dei dati disponibili del numero di nuove aziende positive (da



177 nel 2012 a 357 nel 2013) e della prevalenza di aziende positive (dal 2,37% nel 2012 al 4,19% nel 2013) nella regione ha influito sul dato nazionale di prevalenza, che è passato dallo 0,61% del 2012 allo 0,95% del 2013 (4).

La multi-resistenza agli antibiotici

Il DM n. 592 del 15 dicembre 1995 stabilisce le misure sanitarie da applicare agli allevamenti bovini e bufalini dell'intero territorio nazionale per conseguire l'eradicazione della bTB. La prova ufficiale per la diagnosi *in vivo* della malattia è il test di intradermoreazione alla tubercolina bovina. I capi risultati positivi al test (casi di tubercolosi o di sospetta malattia) devono essere segnalati all'Unità sanitaria locale competente per territorio, e isolati, marcati e macellati al più presto.

Nell'uomo, la tubercolosi è una malattia infettiva curabile e può essere sconfitta con le terapie appropriate, ma soprattutto con la diagnosi precoce.

Negli ultimi anni è stato documentato un crescente aumento di isolati di *M. tuberculosis* resistenti a uno o più antibiotici comunemente usati per il trattamento della tubercolosi. Secondo l'OMS, i ceppi multi-resistenti (multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB) sono quelli che mostrano resistenza ad almeno due antibiotici di prima linea, come l'isoniazide e la rifampicina; i ceppi con resistenze multiple (extensively drug-resistant tuberculosis, XDR-TB) sono quelli resistenti all'isoniazide, alla rifampicina, a un fluorochinolone e a un antibiotico iniettabile di seconda linea. La resistenza agli antibiotici antitubercolari è dovuta, nell'*M. tuberculosis*, alla comparsa di mutazioni spontanee (mutazioni puntiformi) nei geni target, che si verificano, fortunatamente, a una frequenza molto bassa (10-6-10-8).

La circolazione di ceppi multi-resistenti è un problema rilevante per l'elevato rischio di mortalità. I rapporti dell'OMS segnalano un aumento dell'incidenza della tubercolosi resistente agli antibiotici in diversi Paesi nel mondo, compresa l'Italia. Ciò rende la sorveglianza dei ceppi di micobatteri multi-resistenti, un'esigenza globale.

Generalmente, l'*M. bovis*, come l'*M. tuberculosis*, è sensibile a tutti gli antibiotici di prima linea, fatta eccezione per la pirazinamide. Nell'uomo la terapia

standard prevista per l'*M. tuberculosis* risulta di solito efficace anche per l'*M. bovis*. Alcuni studi mostrano che la rifampicina e l'isoniazide sono gli antibiotici chiave per il trattamento della malattia.

Così come per l'*M. tuberculosis*, anche l'*M. bovis* può acquisire la resistenza a uno o più antibiotici. Si parla di resistenza primaria quando un soggetto è infettato da un ceppo tubercolare già resistente, mentre si parla di resistenza acquisita quando il ceppo diventa resistente in conseguenza di un trattamento inadeguato. Nel 1997, per la prima volta, è stata descritta la caratterizzazione di ceppi di *M. bovis* multi-resistenti isolati da un'epidemia nosocomiale (5). In letteratura, studi successivi hanno documentato l'isolamento di ceppi di *M. bovis* multi-resistenti in pazienti mai trattati per la tubercolosi (6-8). La letteratura riporta svariati casi di infezione di *M. bovis* in pazienti affetti da AIDS (9, 10).

Il ruolo dell'ISS

Mentre gli isolati umani di micobatterio sono sottoposti di routine al test della sensibilità agli antibiotici al fine di approntare la corretta terapia antibiotica, la sensibilità agli antibiotici degli isolati animali non è, al contrario, coperta da programmi di sorveglianza.

La fonte principale di contagio per l'uomo da *M. bovis* è rappresentata dal contatto con animali infetti e dall'ingestione dei loro prodotti. Gli operatori dei parchi, i medici veterinari, gli allevatori, gli addetti alla lavorazione delle carni e il personale dei mattatoi sono a maggior rischio di infezione.

Casi di bTB umana resistente a uno o più antibiotici sono stati documentati in letteratura. In Spagna, nel 1997, è stata descritta un'epidemia nosocomiale di *M. bovis* resistente a 11 diversi antibiotici, in 30 pazienti affetti da HIV-1: nessun paziente è sopravvissuto (10, 11). In Irlanda, è stato recentemente riportato un aumento dell'incidenza della bTB umana, con il 28.5% dei ceppi di *M. bovis* resistenti all'isoniazide (6). Merita sottolineare che i casi sopra citati sono relativi a resistenze primarie, cioè i soggetti sono stati infettati da ceppi tubercolari resistenti.

In Sudafrica, è stato recentemente documentato l'isolamento dal latte bovino di ceppi di *M. bovis* resistenti sia all'isoniazide che alla rifampicina (12).



Anche in Sardegna è stato documentato l'isolamento dai bovini di ceppi di *M. bovis* resistenti sia alla rifampicina che all'isoniazide (68% degli isolati) e sono state caratterizzate le mutazioni genetiche associate alla resistenza (13). Quest'ultimo studio evidenzia la circolazione in Italia di ceppi *M. bovis* MDR e pone l'attenzione sul possibile rischio per l'uomo di contrarre un'infezione tubercolare MDR. Alla luce di questi dati si auspica una sorveglianza della sensibilità ai farmaci antitubercolari degli isolati di *M. bovis*, perlomeno nelle zone a maggior rischio.

Il Reparto di Profilassi e Controllo delle Zoonosi Batteriche del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare dell'Istituto Superiore di Sanità svolge ricerche mirate alla profilassi e al controllo delle principali zoonosi negli animali serbatoio, con particolare riferimento alle zoonosi oggetto di profilassi di Stato obbligatorie per gli animali da reddito, come la brucellosi e la tubercolosi.

Per tutelare la salute di tutti coloro che sono, o possono venire, a contatto con animali infetti o con i loro derivati, il Reparto ha svolto, in collaborazione con gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali, un'attività di monitoraggio della bTB e della sensibilità agli antibiotici degli isolati di *M. bovis* in alcune aree ad alta incidenza. Diversi isolati di *M. bovis* provenienti da allevamenti bovini in Calabria (n. 58) e ►

Tabella – Risultati del monitoraggio della sensibilità agli antibiotici in due aree endemiche alla bTB

n. isolati animali di <i>M. bovis</i>	Specie dell'ospite	Data dell'isolamento	Area di studio	Risultati	Bibliografia
58	bovino	2007-2011	Calabria	Ceppi sensibili	Dati non pubblicati
53	Suino nero, bovino, ovino	2007-2012	Sicilia, Parco dei Nebrodi	Ceppi sensibili	(14)

da allevamenti di suino nero, bovini e ovini in Sicilia (n. 53) sono stati sottoposti ai saggi di antibiotico-resistenza nei confronti di isoniazide, rifampicina, etambutolo, streptomina e kanamicina. Sono stati utilizzati sia il saggio standard delle proporzioni in terreno solido Middlebrook 7H11 che il saggio colorimetrico REMA (resazurin microtitre assay). I risultati, riassunti in Tabella, hanno evidenziato la circolazione nelle aree studiate di ceppi animali di *M. bovis* sensibili ai principali antibiotici antitubercolari.

In conclusione, nonostante i risultati soddisfacenti in termini di sensibilità agli antibiotici ottenuti in questo studio pilota, si ritiene importante non abbassare la guardia e controllare la sensibilità agli antibiotici dei ceppi di bTB, soprattutto se gli isolati provengono da allevamenti infetti. L'attività di controllo consentirebbe di prevenire la trasmissione accidentale all'uomo di ceppi resistenti o multi-resistenti che destano grave preoccupazione in tema di salute pubblica. ■

Dichiarazione sui conflitti di interesse

Gli autori dichiarano che non esiste alcun potenziale conflitto di interesse o alcuna relazione di natura finanziaria o personale con persone o con organizzazioni, che possano influenzare in modo inappropriato lo svolgimento e i risultati di questo lavoro.

Riferimenti bibliografici

- O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis* 1995;76Suppl 1:1-46.
- Wedlock DN, Skinner MA, de Lisle GW, et al. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microbes Infect* 2002;4:471-80.
- Michel AL, Müller B, van Helden PD. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: a problem, or not? *Vet Microbiol* 2010;140:371-81.
- www.salute.gov.it/relazioneAnnuale2013/paginaAttivitaRA2013.jsp?sezione=capitolo1&capitolo=sanitaanimale1¶grafo=malattieinfettive1&id=2035
- Blázquez J, Espinosa de Los Monteros LE, Samper S, et al. Genetic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol* 1997;35(6):1390-3. Erratum in: *J Clin Microbiol* 1998;36(8):2398.
- McLaughlin AM, Gibbons N, Fitzgibbon M, et al. Primary isoniazid resistance in *Mycobacterium bovis* disease: a prospect of concern. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186(1):110-1. Erratum in: *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186(8):807-8.
- Bilal S, Iqbal M, Murphy P, et al. Human bovine tuberculosis - remains in the differential. *J Med Microbiol* 2010;59:1379-82.
- Hughes VM, Skuce R, Doig C, et al. Analysis of multi-drug-resistant *Mycobacterium bovis* from three clinical samples from Scotland. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003;7:1191-8.
- Valerga M, Viola C, Thwaites A, et al. *Mycobacterium bovis* tuberculosis in a female patient with AIDS. *Rev Argent Microbiol* 2005;37(2):96-8.
- Rivero A, Márquez M, Santos J, et al. High rate of tuberculosis reinfection during a nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* strain B. *Clin Infect Dis* 2001;32(1):159-61.
- Guerrero A, Cobo J, Fortún J, et al. Nosocomial transmission of *Mycobacterium bovis* resistant to 11 drugs in people with advanced HIV-1 infection. *Lancet* 1997;350(9093):1738-42.
- Silaigwana B, Green E, Ndip RN. Molecular detection and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis complex* from cattle at a dairy farm in the Nkonkobe region of South Africa: a pilot study. *Int J Environ Res Public Health* 2012;9(6):2045-56.
- Sechi LA, Zanetti S, Sanguinetti M, et al. Molecular basis of rifampin and isoniazide resistance in *Mycobacterium bovis* strains isolated in Sardinia, Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(6):1645-8.
- Marianelli C, Armas F, Boniotti MB, et al. Multiple drug-susceptibility screening in *Mycobacterium bovis*: new nucleotide polymorphisms in the embB gene among ethambutol susceptible strains. *Int J Infect Dis* 2014;33C:39-44.