

Caratterizzazione istopatologica delle lesioni granulomatose indotte da *Mycobacterium microti* in linfonodi retrofaringei e mandibolari di cinghiali selvatici

Università degli Studi di Milano - Dipartimento di Medicina Veterinaria (DIMEVET)
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER)

Infezione da *M. microti* nel cinghiale

Transboundary and Emerging Diseases

ORIGINAL ARTICLE

Spatiotemporal and Ecological Patterns of *Mycobacterium microti* Infection in Wild Boar (*Sus scrofa*)

M. Chiari¹, N. Ferrari^{1,2}, D. Giardiello¹, D. Avisani¹, M. L. Pacciarini¹, L. Alborali¹, M. Zanoni¹ and M. B. Boniotti¹

Summary

Mycobacterium microti has recently been described as the causative agent of tuberculosis-like lesions in wild boar (*Sus scrofa*), a reservoir specie of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) in some European Mediterranean ecosystem. Through a five-year survey on tuberculosis in free-living wild boars, the epidemiological trend of *M. microti* infections and the host and population risk factors linked with its occurrence were described. Retropharyngeal and mandibular lymph nodes of 3041 hunted wild boars from six different districts were macroscopically inspected. The sex and age of each animal were registered, as well as the animal abundance in each district. Lesions compatible with tuberculosis (190) were collected and analysed using a *gyrB* PCR–RFLP assay. *M. microti* was identified directly in 99 tissue samples (Prev = 3.26%; 95% CI: 2.67–3.97%), while neither *Mycobacterium bovis*, nor other members of the MTBC were detected. The probability of being *M. microti* positive showed spatio-temporal variability, with 26% of increase of risk of being infected for each year. Moreover, a positive effect of wild boar abundance and age on the prevalence was detected. The generalized increase in the European wild boar population, coupled with its sensitivity to *M. microti* infection, poses a future concern for the identification and management of MTBC members in wild boar.

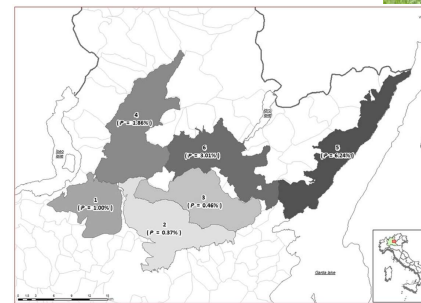


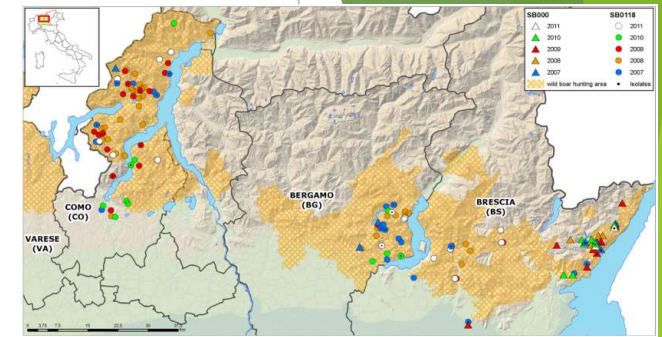
Fig. 1. Prevalence of *Mycobacterium microti* in wild boar in different hunting areas characterized by a footstep mountain habitat where wild boar is completely free-living and is not specifically managed for hunting. (Province of Brescia, Italy).

Infezione da *M. microti* nel cinghiale

Detection and Molecular Characterization of *Mycobacterium microti* Isolates in Wild Boar from Northern Italy

M. Beatrice Boniotti,^a Alessandra Gaffuri,^a Daniela Gelmetti,^a Silvia Tagliabue,^a Mario Chiari,^a Anna Mangeli,^a Matteo Spisani,^b Claudia Nassuato,^c Lucia Gibelli,^a Cristina Sacchi,^a Mariagrazia Zanoni,^a M. Lodovica Pacciarini^a

Approximately 23,000 hunter-harvested wild boars from the pre-Alpine area of northern Italy were examined for tuberculosis over a 9-year period (2003 to 2011). Retropharyngeal and mandibular lymph nodes from the wild boars were examined grossly, and 1,151 of the lymph nodes were analyzed in our laboratory by histology (728 samples) and culture isolation (819 samples). *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC)-specific PCR (1,142 samples) was used for molecular-level detection in tissue samples, as was a *gyrB* restriction fragment length polymorphism (RFLP) assay (322 samples). Lesions compatible with tuberculosis and indistinguishable from those described in cases of *Mycobacterium bovis* infection had been observed since 2003. *Mycobacterium microti* was identified directly in 256 tissue samples by the adopted molecular approaches. However, only 26 *M. microti* strains were obtained by culture isolation due to the well-known difficulties in isolating this slow-growing mycobacterium. During 2006, a prevalence study was performed in two provinces of the area, and the diffusion of *M. microti* was calculated to be 5.8% (95% confidence intervals surrounding the estimated prevalences [CI_{95%}], 3.94 to 7.68%). Over the following years (2007 to 2011), the presence of *M. microti* appeared to be stable. All isolates were genotyped by spoligotyping and exact tandem repeat analysis (ETR types A to F). In addition to the typical vole type (SB0118), a new spoligotype lacking the 43 spacers was found. Spoligotyping was also applied directly to tissue samples, and a geographical cluster distribution of the two spoligotypes was observed. This is the first report studying the diffusion and genetic variability of *M. microti* in wild boar.



Scopo del progetto

- Caratterizzare da un punto di vista istopatologico le lesioni indotte da *M. microti* in linfonodi retrofaringei e mandibolari di cinghiali selvatici.
- Tali caratterizzazione sarà per lo più basata sulla valutazione di specifiche caratteristiche istopatologiche già utilizzate da altri autori per studiare le lesioni indotte da altri membri del *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC).
- In particolare i parametri valutati saranno:
 - Numero delle lesioni granulomatose
 - Grading delle lesioni granulomatose
 - Numero di macrofagi giganti multinucleati (MGM) in ciascun lesione granulomatosa
 - Numero di bacilli alcol-acido resistenti (BAAR) in ciascun granuloma
- Tali variabili saranno infine analizzate dal punto statistico e saranno inoltre confrontate anche con i risultati delle analisi microbiologiche specifiche per *Mycobacterium* spp.

Comparative Pathology of the Natural infections by *Mycobacterium bovis* and by *Mycobacterium caprae* in Wild Boar (*Sus scrofa*)

W. L. García-Jiménez^{1,2}, J. M. Benítez-Medina¹, P. Fernández-Llario¹, J. A. Abecia³, A. García-Sánchez⁴, R. Martínez¹, D. Risco¹, A. Ortiz-Peláez⁵, F. J. Salguero², N. H. Smith⁶, L. Gómez⁷ and J. Hermoso de Mendoza¹

Summary

The potential role of wild animals in the maintenance and spread of tuberculosis (TB) infection in domestic livestock is of particular importance in countries where eradication programs have substantially reduced the incidence of bovine tuberculosis but sporadic outbreaks still occur. *Mycobacterium bovis* is the agent mainly isolated in wildlife in Spain, but recently, infections by *Mycobacterium caprae* have increased substantially. In this study, we have analysed 43 mandibular lymph nodes samples containing TB-like lesions from 43 hunted wild boar from Madrid and Extremadura (central and south-western regions of Spain). After isolation, identification and typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates, we found that 23 mandibular lymph nodes involved *M. caprae* infections and 20 *M. bovis*. The lesions were compared for histopathology (different granuloma stage and number of multinucleated giant cells (MNGCs)), and acid-fast bacilli (AFBs) were quantified in the Ziehl-Neelsen-stained slides. Granulomas produced by *M. caprae* showed more stage IV granulomas, more MNGCs and higher AFBs counts than those induced by *M. bovis*. In conclusion, lesions caused by *M. caprae* would be more prone to the excretion of bacilli, and infected animals result as a high-risk source of infection for other animals.

Selezione dei campioni

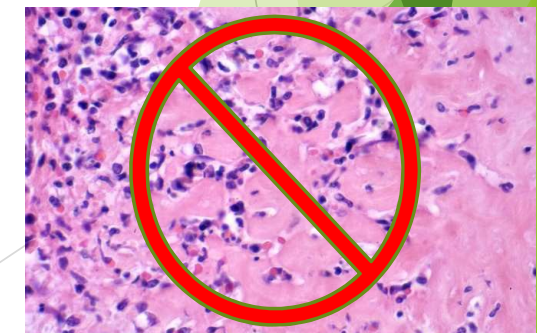
- Dall'archivio del Laboratorio di Istologia IZSLER sono stati selezionati casi (2014-2018) di linfonodi retrofaringei e mandibolari di cinghiali risultati positivi ad una Restriction Fragment Length Polymorphism PCR (RFLP-PCR) del gene *gyrB* identificante *M. microti*
- La scelta di selezionare i casi di interesse in base ai risultati molecolari e non microbiologici è stata dettata dal fatto che *M. microti* è un membro del MTBC la cui crescita risulta particolarmente difficile
- I casi RFLP-PCR positivi per *M. microti* e di cui fosse disponibile materiale fissato in formalina ed incluso in paraffina (FFPE) sono risultati 125
- Sono stati esclusi (22) i campioni con artefatti da autolisi, da congelamento e da mal fissazione, i campioni non esibenti alterazioni patologiche riconducibili a infezione da MTBC ed i campioni nel quale fossero evidenti processi patologici diversi da quelli riconducibili ad infezione da MTBC
- Sono stati selezionati in ultima analisi 103 casi (125-22)



NO LESIONI



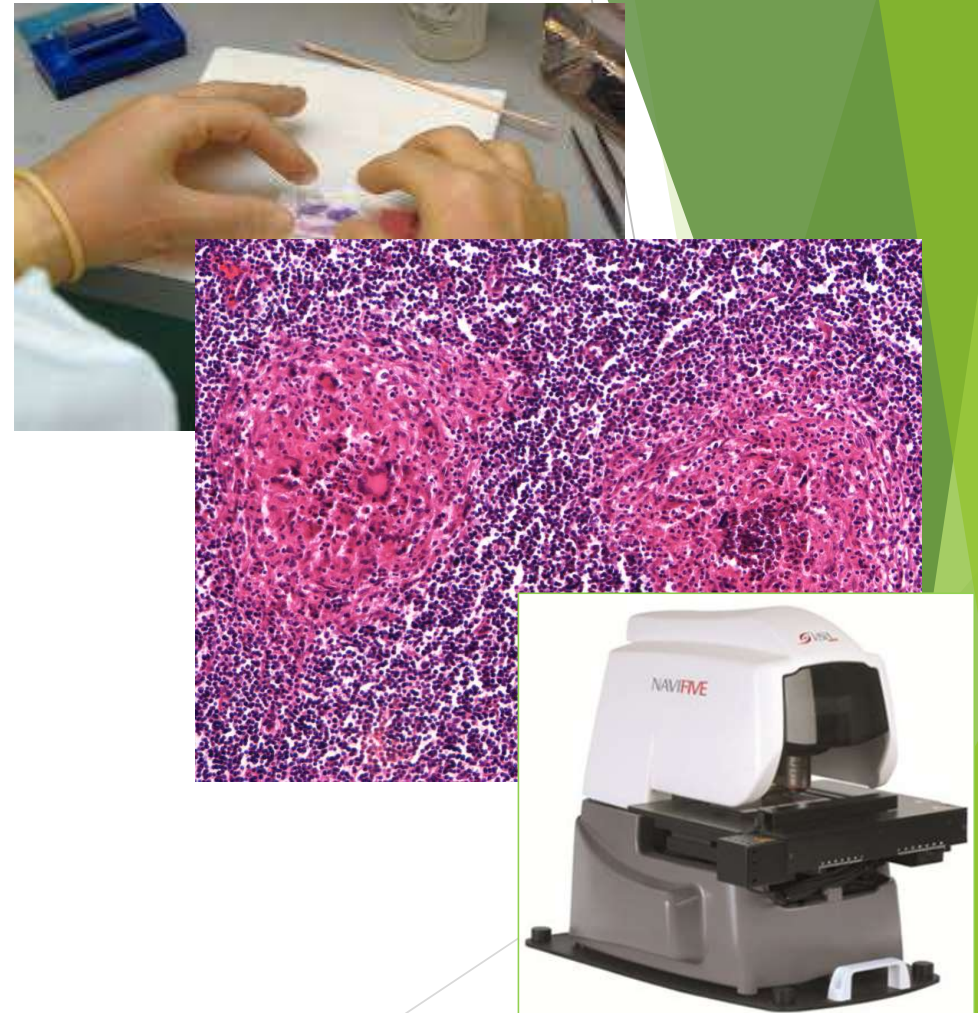
ARTEFATTI DA AUTOLISI E DA CONGELAMENTO



ALTRE LESIONI

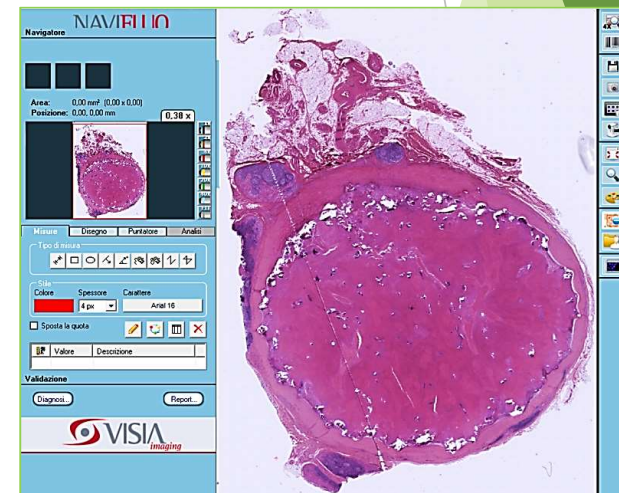
Processazione istologica

- Per ogni blocco FFPE sono state tagliate 2 sezioni seriali spesse 4 μm
- Una sezione per ogni caso è stata sottoposta a colorazione Ematossilina-Eosina (EE)
- Una sezione per ogni caso è stata sottoposta a colorazione Ziehl-Neelsen (ZN)
- I vetrini EE sono stati quindi scansionati con modalità 20x accurata tramite scanner istologico VISIA NaviFIVE



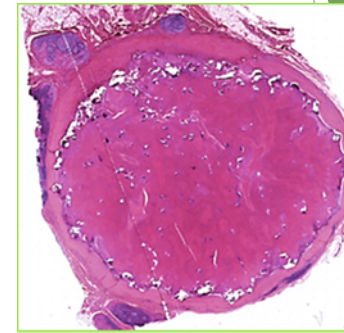
Istopatologia: sezioni EE

- I vetrini EE sono stati visionati ad ingrandimento 40x mediante microscopio (MO) OLYMPUS CX31
- Ogni qual volta venisse identificata una lesione granulomatosa quest'ultima è stata ricercata anche nella versione scansionata dello stesso vetrino EE
- Per ogni vetrino EE l'area linfonodale totale e l'area delle singole lesioni granulomatose è stata quindi calcolata mediante analisi di immagine ed espressa in μm^2
- La versione virtuale dei vetrini EE, ed in particolare le aree di interesse identificate e corrispondenti alle singole lesioni granulomatose è stata anche utilizzata per registrare gli altri parametri istologici valutati nei rispettivi vetrini fisici (sia vetri EE che ZN)



Istopatologia: sezioni EE

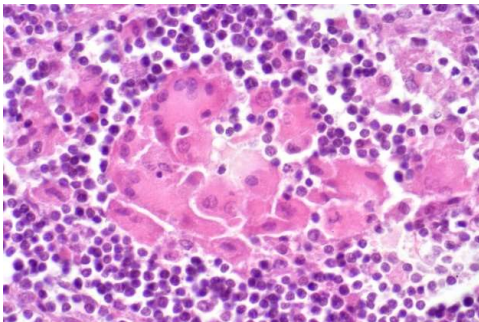
- Tramite MO ogni lesione granulomatosa è stata valutata e classificata come completamente od incompletamente presente nella sezione istologica analizzata
- Utilizzando il MO ogni lesione granulomatosa è stata classificata applicando il grading descritto da Wangoo *et al.* 2005 per la classificazione delle lesioni indotte da *M. bovis* nel bovino e già utilizzata da altri autori per classificare le lesioni indotte da *M. bovis* e *M. caprae* nei cinghiali
- Utilizzando il MO ogni lesione granulomatosa è stata accuratamente e completamente visionata ad ingrandimento 40x ed i MGM sono stati contati



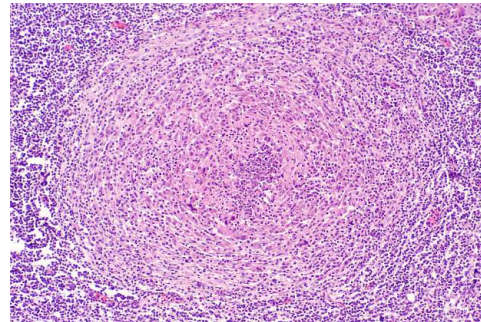
LESIONE COMPLETA



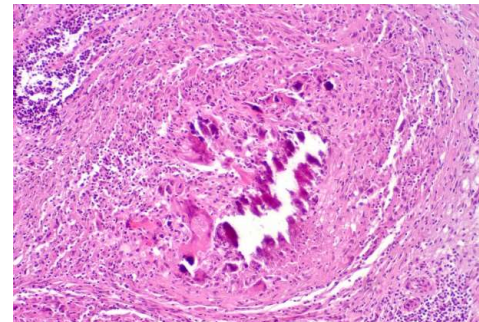
LESIONE INCOMPLETA



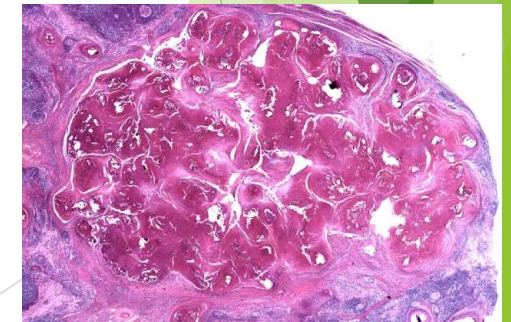
PRIMO GRADO



SECONDO GRADO



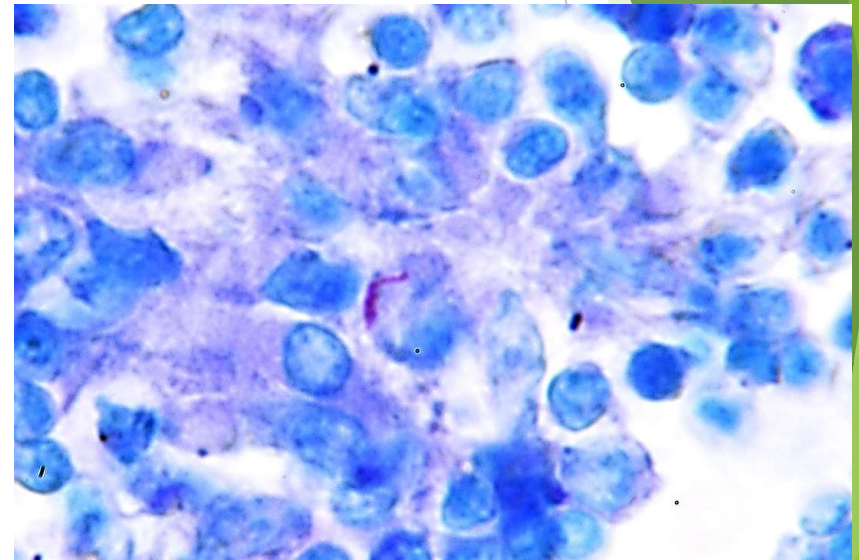
TERZO GRADO



QUARTO GRADO

Istopatologia: sezioni ZN

- Utilizzando il MO ogni lesione granulomatosa identificata nei vetrini EE ed riportata nel vetro virtuale è stata ricercata nel rispettivo vetrino ZN
- Utilizzando il MO ogni lesione granulomatosa è stata quindi accuratamente e completamente visionata ad ingrandimento 40x. Ogni qual volta venisse identificato un elemento ritenente carbol-fucsina lo stesso è stato poi visualizzato a 100x ad immersione in modo da valutare se la silhouette dell'elemento fosse compatibile con un BAAR e nel caso per discernere BAAR molto vicini fra loro
- Il numero totale di BAAR per ogni granuloma è stato quindi appuntato nel vetrino EE virtuale associando tale dato agli altri parametri analizzati



Dati

- Tutti i dati ricavati sono stati quindi inseriti all'interno di un foglio di calcolo Excel

Anno di conferimento

Numero
identificativo

Tipo di dato.

In rosso: dati di un caso in cui in almeno 1 granuloma è stato identificato almeno un BAAR
In giallo: dati di un caso in cui in nessun granuloma sono stati identificati BAAR

Numero totale di
granulomi
presenti nella
sezione

Numero di MGM

Grado della
lesione

Completezza
della lesione
nella sezione.
C: completa
I: incompleta

Risultato dell'esame colturale
per *Mycobacterium* spp.
P: positivo
N: negativo

Es. dati afferenti al caso 938 del 2014

- La riga identificata come «Total lymph node area» identifica l'area dell'intera sezione istologica. Nella stessa riga sono indicati il numero totale di granulomi identificati nell'intera sezione, l'area dell'intera sezione ed il risultato dell'esame colturale per *Mycobacterium* spp.

- La riga identificata come «Granuloma» identifica una singola lesione granulomatosa. Nella stessa riga sono indicati l'area occupata dalla lesione, il numero di MGM, il grado del granuloma, il numero di BAAR e la completezza o meno della lesione nella sezione istologica

Year	Number	Description (R: ZN+ lym	Granulo	Area (µm²)	Multinu	Granulo	Number of acid	Granulo	Microbiology
2014	938	Total lymph node area	15	136888621,5					P
2014	938	Granuloma		72958729,92	3	4	9 I		
2014	938	Granuloma		10897,45	1	1	0 C		
2014	938	Granuloma		37471,76	3	1	0 C		
2014	938	Granuloma		395082,5	1	3	0 C		
2014	938	Granuloma		15901,19	3	1	0 C		
2014	938	Granuloma		12305,28	1	1	0 C		
2014	938	Granuloma		35289,01	2	1	0 C		
2014	938	Granuloma		12475,17	0	1	0 C		
2014	938	Granuloma		22451,59	1	1	0 C		
2014	938	Granuloma		15762,75	2	1	0 C		
2014	938	Granuloma		4001,86	1	1	0 C		
2014	938	Granuloma		5862,64	1	1	0 C		
2014	938	Granuloma		17949,7	4	1	0 C		
2014	938	Granuloma		47237,26	0	1	0 C		
2014	938	Granuloma		684,92	1	1	0 C		
2014	1025	Total lymph node area	4	198136568,9					N
2014	1025	Granuloma		81025,42	5	3	0 C		
2014	1025	Granuloma		950059,23	0	3	0 C		
2014	1025	Granuloma		9875691,52	0	4	0 I		
2014	1025	Granuloma		11552713,47	1	4	0 I		

Analisi statistica

- Vorremmo analizzare dal punto di vista statistico i dati sin qui riportati.
- In particolare:
 - Vorremmo valutare le **dimensioni** (se è possibile in doppio, sia includendo che escludendo i granulomi incompleti) dei vari granulomi stratificate in base al grado dei granulomi stessi e vedere se c'è associazione tra questi valori e:
 - ✓ grado della lesione
 - ✓ presenza o meno di MGM
 - ✓ numero di MGM
 - ✓ positività o meno per la presenza ($n>0$ vs $n=0$) di BAAR
 - ✓ numero di BAAR
 - ✓ positività o meno dell'esame microbiologico specifico per *Mycobacterium spp.*
 - Vorremmo valutare la distribuzione dei 4 **gradi** delle lesioni nei campioni e vedere se c'è associazione tra i vari gradi (per esempio se i gradi 4° sono spesso associati ai gradi 1°). Inoltre valutare l'associazione tra grado e:
 - ✓ presenza o meno di MGM
 - ✓ numero di MGM
 - ✓ positività o meno per la presenza ($n>0$ vs $n=0$) di BAAR
 - ✓ numero di BAAR
 - ✓ positività o meno dell'esame microbiologico specifico per *Mycobacterium spp.*

Analisi statistica

- Vorremmo valutare la presenza/assenza ed il numero di **MGM** nei vari granulomi divisi in base al grado dei granulomi stessi e vedere se c'è un'associazione tra questi valori e:
 - ✓ positività o meno per la presenza ($n>0$ vs $n=0$) di BAAR
 - ✓ numero di BAAR
 - ✓ positività o meno dell'esame microbiologico specifico per *Mycobacterium spp.*
- Vorremmo valutare la presenza/assenza ed il numero di **BAAR** nei vari granulomi e vedere se c'è un'associazione tra questi valori e:
 - ✓ positività o meno dell'esame microbiologico specifico per *Mycobacterium spp.*
- Calcolare la sensibilità della **colorazione ZN** e dell'esame **microbiologico** confrontandoli con il nostro esame di riferimento (*gyrB* RFLP-PCR)

Analisi statistica

.....IN PRATICA VEDERE SE C'E' QUALSIASI TIPO DI ASSOCIAZIONE TRA TUTTE LE VARIABILI ANALIZZATE E TRA QUESTE E TUTTO CIO' CHE PUO' ESSERE ESTRAPOLATO DAI DATI STESSI

.....ED OVVIAMENTE SIAMO APERTI AD EVENTUALI CONSIGLI/SPUNTI