

Piano di Attività Centro di Referenza Nazionale (CRN) Paratubercolosi

Anno 2011-2012

Attività Diagnostica

1) standardizzazione e validazione di metodiche analitiche

Nel corso dell'anno si è effettuata la validazione del seguente metodo di prova sulle matrici feci, latte e tessuti:

- Metodo di prova interno per la ricerca di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* tramite real time PCR in matrici di origine animale (MP 09/78, rev.2).

Tutti i metodi sono a disposizione degli altri Istituti, al fine di giungere ad una standardizzazione delle varie metodiche.

Vari IZZSS hanno richiesto, nel corso dell'anno di attività, copia dei vari metodi di prova e delle schede relative ai terreni utilizzati nelle prove batteriologiche, nonché consulenza su problemi specifici riguardanti gli aspetti diagnostici.

2) produzione e distribuzione di reagenti

Sono a disposizione dei vari IZZSS ed Università che ne hanno fatto richiesta:

- sieri di animali infetti e negativi;
- feci di animali infetti e negativi;
- latte di animali infetti e negativi;
- ceppi batterici;
- DNA di ceppi batterici.

Presso il CRN è stata realizzata una biobanca, in cui sono stati codificati:

- Campioni di siero di riferimento positivi e negativi (ELISA e/o AGID) liofilizzati;
- Campioni di latte positivi e negativi al test ELISA, liofilizzati;
- Ceppi batterici tipizzati mediante metodica molecolare, appartenenti alle specie:
 - o *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map);
 - o *Mycobacterium porcinum* (agente di false positività in PCR-IS900 per Map).

3) attività analitica

Nel periodo di riferimento si è osservato un aumento rilevante dell'attività di routine, che si è indirizzata alla diagnosi di infezione prevalentemente dalla specie bovina.

Sui campioni pervenuti sono stati eseguiti complessivamente **45.934 esami**, di cui:

Sierologici	43.322
Microbiologici	1.117
PCR	1.495

I risultati non rivestono importanza epidemiologica, in quanto i campioni sono stati inviati al laboratorio per diverse finalità (animali con forma clinica, monitoraggi a tappeto in allevamenti di stato sanitario sconosciuto, campionamenti mirati ecc.).

Nonostante la conferma diagnostica per la Paratubercolosi non sia prevista da alcuna normativa, il CRN riceve comunque materiale biologico (ceppi, feci, sieri) da vari IIZZSS per la conferma diagnostica.

4) circuiti interlaboratorio organizzati dal CRN

E' stato organizzato dal CRN un circuito interlaboratorio per la diagnosi sierologica (ELISA e/o AGID), su matrice doppia (siero di sangue e latte, liofilizzati) a cui hanno aderito 37 laboratori appartenenti a 10 IIZZSS.

Per la realizzazione del ring test è stato implementato il sito internet dell'IZSLER, con possibilità di iscrizione on-line, inserimento risultati, caricamento e scaricamento documenti, protocolli e report.

I campioni sono stati spediti il 18.6.2012; la scadenza prevista per l'inserimento dei risultati era il 16.07.2012.

I risultati sono stati inseriti da tutti i laboratori partecipanti nei tempi previsti.

Il CRN ha provveduto alla pubblicazione di:

- tabella per la decodifica dei risultati entro 7 giorni dalla scadenza, al fine di provvedere prontamente alla correzione di eventuali non conformità;
- report completo entro 30 giorni dalla scadenza, come previsto dal protocollo.

Il protocollo ed il report del ring test sono disponibili presso il CRN e sul sito IZSLER.

5) ring test a cui ha partecipato il personale del CRN.

Il CRN ha partecipato a:

- 3 prove interlaboratorio (gennaio, aprile, luglio 2012), organizzate a livello europeo, per esame sierologico mediante ELISA (Ente organizzatore: QA Veterinary Laboratory Agency - UK). I risultati sono stati corretti nel 100% dei casi.
- 2 prove interlaboratorio (gennaio e luglio 2012), organizzate a livello europeo, per PCR su feci (Ente organizzatore: QA Veterinary Laboratory Agency - UK). I risultati sono stati corretti nel 100% dei casi.

Epidemiologia

1) creazione banca dati

E' stata realizzata una banca dati sulle caratteristiche genotipiche dei ceppi di campo isolati presso il CRN o inviati al CRN da parte di altri IZS o Enti.

2) sviluppo e gestione di sistemi informativi;

Non esistono al momento sistemi informativi organizzati, finalizzati alla raccolta di dati relativi alla paratubercolosi.

3) studio, sviluppo e gestione di sistemi di sorveglianza, verifica e controllo;

3.a. Piano di monitoraggio nazionale

Il giorno **3 novembre 2011** presso il Ministero della Salute si è svolta una riunione riguardante la presentazione della **proposta di un piano di monitoraggio della paratubercolosi**.

Erano presenti rappresentanti del Ministero della Salute, delle Regioni delle Province Autonome, degli IZZSS e del Centro di referenza.

Alla presentazione è seguita una breve discussione che ha messo in evidenza alcuni punti critici sulle metodiche di diagnosi della malattia, sulle finalità di un progetto di monitoraggio a livello nazionale, comprese le eventuali misure sanitarie da applicare nelle aziende dove si dovesse riscontrare la malattia.

Il CRN ha illustrato la possibilità di effettuare un piano di monitoraggio della paratubercolosi a livello nazionale, sottolineandone la necessità per rispondere alle richieste provenienti da paesi terzi sui prodotti esportati. In particolare, la Cina chiede garanzie relativamente al fatto che il latte per la trasformazione in prodotti esportati non provenga da allevamenti in cui si siano manifestati negli ultimi 12 mesi casi clinici di paratubercolosi; l'India chiede che il prodotto abbia subito un trattamento in grado di inattivare Map. Inoltre è stato evidenziato come, in conseguenza di tali richieste da parte dei paesi terzi, AssoLatte stia incominciando a monitorare lo stato sanitario delle aziende da latte conferenti nei confronti della paratubercolosi. Gli obiettivi del piano sono:

1. stimare la prevalenza della paratubercolosi bovina, in particolare nell'allevamento da latte;
2. individuare gli allevamenti bovini ad alta prevalenza di infezione, distinguendoli da quelli a bassa prevalenza o negativi;
3. sensibilizzare gli allevatori alle problematiche connesse alla Paratubercolosi;
4. fornire indicazioni operative per la riduzione dell'incidenza di casi clinici ed il controllo dell'infezione negli allevamenti infetti;
5. ridurre il rischio per il consumatore di assumere Map vitale tramite consumo di latte e derivati.

Le fasi del progetto, presentate in occasione della riunione del 3.11.2012, erano:

Fase 1: Predisposizione di un monitoraggio nazionale, mediante test ELISA da sangue individuale o latte di massa, sui campioni già prelevati nell'ambito del piano di eradicazione della brucellosi bovina, a seconda delle modalità di controllo attuate nelle diverse regioni e province autonome italiane.

Fase 2: Raccolta e analisi dei dati, con conseguente stima della prevalenza di aziende bovine da latte infette da paratubercolosi e suddivisione delle aziende sulla base della prevalenza intra-aziendale stimata, individuando anche le aziende a maggior rischio di avere casi clinici.

Fase 3: Formazione, con avvio di iniziative diverse da parte del CRN (materiale informativo per gli allevatori, linee guida per il controllo dell'infezione nelle aziende infette, corso di formazione a distanza (FAD) ECM destinato a veterinari ufficiali e aziendali).

Fase 4: Certificazione degli allevamenti negativi, , utilizzando un protocollo, sulla base di esperienze già maturate in Provincia di Lodi e Milano, per la certificazione delle aziende in base alla probabilità assenza di infezione.

A seguito della riunione del 3 novembre, il Ministero ha inviato una **lettera (prot.0002873-P-15/02/2012)** a Regioni, Province autonome e IIZZSS, in cui illustrava quanto emerso.

A seguito della valutazione, dei commenti e delle osservazioni pervenuti da parte delle Regioni e Province autonome in merito all'oggetto, il Ministero ha chiesto al CRN di raccogliere, per il tramite degli IIZZSS, secondo procedure standardizzate, eventuali dati relativi a programmi di monitoraggio sulla paratubercolosi bovina effettuati negli ultimi 10 anni.

Al CRN è stato chiesto di effettuare l'analisi degli stessi, al fine di giungere ad una stima il più possibile completa della prevalenza e della reale situazione sulla diffusione della malattia sul territorio nazionale.

Il CRN ha predisposto, in collaborazione con il CEREV, una scheda in formato Excel in cui sono stati definiti i campi informativi per la raccolta di dati di prevalenza delle diverse regioni italiane. La scheda è stata trasmessa a tutti gli IIZZSS da parte del Ministero con relativa nota prot.0002873-P-15/2/2012.

Nessuna regione ha inviato i dati con il format richiesto; fa eccezione il Servizio Veterinario Provinciale di Trento che ha inviato i dati completi di un'indagine effettuata su tutti gli allevamenti nel 2012, chiedendo al CRN una relazione sullo stato sanitario della provincia. La relazione è stata inviata entro alcuni giorni. I dati sono riportati in tabella. Alcune Regioni, direttamente o tramite gli IIZZSS di riferimento, hanno inviato dati in forma aggregata.

Regione	Anno	Prevalenza apparente aziende infette	Prevalenza apparente animali infetti	Metodologia
Veneto	2002	48.8%	3.5%*	ELISA individuale
Lombardia	2003-2005	43.7%	2.6%*	ELISA individuale
Lazio	2002	42.0%	2.5%*	ELISA individuale
Umbria e Marche	2008	52,8%	4,6%**	ELISA individuale
Piemonte	2007-2008	9.5%	N.D.	ELISA latte massa
Trento	2012	17.7%	2.5%***	ELISA individuale
Emilia-Romagna	2011-2012	14.5%	N.D.	ELISA latte massa

* = animali di età superiore a 12 mesi

**=animali di età superiore a 24 mesi

***=animali di età superiore a 36 mesi

Altre Regioni (Puglia, Basilicata e Sicilia) hanno risposto, direttamente o tramite gli IIZZSS di riferimento, che non hanno alcun dato disponibile.

3.b. Piano di intervento nazionale

Il CRN ha elaborato un Piano di Controllo e Certificazione nei confronti della paratubercolosi che ha trasmesso al Ministero ed ha avuto il seguente iter:

- 6 luglio 2012: invio da parte del Ministero della proposta di Piano alle Regioni con richiesta di invio dei commenti entro il 20 luglio 2012;
- Agosto 2012: raccolta osservazioni e proposte;
- Settembre 2012: revisione del Piano da parte del CRN;
- 25 settembre 2012: incontro a Roma presso il Ministero della Salute con le Regioni, le Province Autonome e gli IIZZSS per la condivisione della stesura definitiva del Piano.

Viene di seguito riportata l'ultima versione del Piano, condiviso in occasione della riunione del 25 settembre 2012, di prossima emissione da parte del Ministero sotto forma di Linee Guida.

Linee Guida per l'adozione di Piani di controllo e certificazione nei confronti della Paratubercolosi bovina

1. Definizioni

Ai sensi delle presenti linee guida si intende per:

- a. *Sospetto clinico di Paratubercolosi*: un caso di diarrea cronica associata a cachessia, in un bovino di età superiore a 24 mesi. Non sono sospetti clinici di paratubercolosi i bovini clinicamente sani, risultati positivi ad un test per la diagnosi di paratubercolosi.
- b. *Caso clinico di Paratubercolosi*: un caso di diarrea cronica associata a cachessia, in un bovino di età superiore a 24 mesi, confermato da una prova diagnostica diretta di biologia molecolare.
- c. *Piano aziendale di gestione sanitaria (PGS)*: documento programmatico redatto secondo i criteri dell'allegato 1 ai fini della prevenzione o del controllo dell'infezione paratubercolare in azienda.
- d. *Prova sierologica*: una prova ELISA, svolta su campioni di sangue o latte individuali dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale.
- e. *Prova diagnostica diretta*: una prova di biologia molecolare o colturale, svolta dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale.
- f. *Sieroprevalenza*: rapporto tra il numero di soggetti risultati positivi alla prova sierologica e il numero di soggetti sottoposti a prova.

2. Obiettivi

Attraverso l'applicazione di un piano di controllo e certificazione conforme alle presenti linee guida si vogliono raggiungere i seguenti obiettivi:

- a. raccogliere dati statistici sull'incidenza di casi clinici di paratubercolosi e sulla diffusione dell'infezione da *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* nel patrimonio bovino nazionale;
- b. permettere la certificazione per il commercio consapevole degli animali e dei prodotti derivati;
- c. fornire agli allevatori strumenti per prevenire l'introduzione dell'infezione da *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* nei propri allevamenti;
- d. fornire agli allevatori strumenti per il controllo dell'infezione nei propri allevamenti.

Parte I (punti 3-9): Misure sanitarie obbligatorie per il controllo della Paratubercolosi bovina

3. Segnalazione

- a. I sospetti clinici di paratubercolosi bovina, come definiti al punto 1, lettera a, sono segnalati all'Azienda Sanitaria Locale competente da parte di:
 - medici veterinari pubblici e privati;
 - proprietari e detentori degli animali.
- b. Ricevuta la segnalazione, la ASL provvede al prelievo di un campione di feci per la conferma del sospetto clinico sui capi oggetto della segnalazione.
- c. La ASL competente registra i casi clinici di paratubercolosi nel Sistema Informativo sulle Malattie Animali (SIMAN) del Ministero della Salute.

4. Provvedimenti

A seguito della rilevazione di casi clinici di paratubercolosi, il Servizio Veterinario della ASL competente per territorio dispone nell'allevamento interessato:

- a. il blocco delle movimentazioni degli animali delle specie sensibili verso altri allevamenti da riproduzione;
- b. la verifica delle informazioni registrate in BDN e della corretta identificazione degli animali esistenti in allevamento;
- c. l'isolamento degli animali con forma clinica, fino alla macellazione;
- d. visita clinica sull'effettivo dell'allevamento ed esecuzione di un controllo sierologico su tutti i bovini di età superiore a 36 mesi.

5. Revoca dei provvedimenti

Il blocco delle movimentazioni di cui al punto 4, lettera a, viene revocato immediatamente dopo la macellazione dei soggetti con paratubercolosi in forma clinica.

Il Servizio Veterinario ASL comunica al Proprietario/Detentore degli animali gli esiti del controllo sierologico di cui al punto 4, lettera d, e dispone il vincolo sanitario per i soli animali sieropositivi, conformemente al punto 8 delle linee guida.

6. Sorveglianza al macello

Il Veterinario ufficiale del macello, qualora alla visita *ante mortem* rilevi la presenza di un sospetto clinico di paratubercolosi, accompagnato da lesioni caratteristiche, preleva un campione di feci oppure della valvola ileo-ciecale per l'esecuzione di una prova diagnostica diretta di biologia molecolare.

L'eventuale esito positivo della prova verrà al più presto comunicato al Servizio veterinario competente territorialmente per l'allevamento di provenienza del capo malato, per l'adozione delle misure previste dal punto 4 delle presenti linee guida.

7. Qualifiche sanitarie

Entro un anno dall'approvazione delle presenti linee guida, il Servizio Veterinario ASL competente per territorio assegna, sulla base delle informazioni sanitarie agli atti, la qualifica sanitaria per la paratubercolosi ad ogni allevamento bovino, secondo lo schema di cui all'allegato 2 delle stesse linee guida.

Ad eccezione del livello PT0 "Allevamento senza qualifica sanitaria", la qualifica viene assegnata su richiesta dell'allevatore e ha durata di 12 mesi. Qualora non siano rispettati i requisiti per il mantenimento di cui all'Allegato 2, l'azienda perde la qualifica e assume il livello PT0 ("Allevamento senza qualifica sanitaria").

La qualifica sanitaria viene registrata nella banca dati dell'anagrafe zootecnica nazionale e mantenuta aggiornata sulla base delle informazioni agli atti del Servizio Veterinario.

8. Movimentazione animale

I soggetti senza sintomi clinici di paratubercolosi, risultati positivi a una prova sierologica o diagnostica diretta per paratubercolosi non possono essere venduti ad un'altra azienda da riproduzione.

Entro un anno dall'approvazione delle presenti linee guida, per qualsiasi movimentazione di bovini verso allevamenti da riproduzione, la qualifica sanitaria nei confronti della paratubercolosi è riportata sulla dichiarazione di provenienza (riquadro E del Modello 4).

L'introduzione di bovini provenienti da allevamenti con qualifica sanitaria per paratubercolosi inferiore alla propria comporta la perdita della qualifica ottenuta. In tal caso l'allevamento assume la qualifica dell'allevamento di provenienza degli animali introdotti.

9. Prove di laboratorio

Le prove diagnostiche per l'ottenimento ed il mantenimento della qualifica sanitaria devono essere svolte dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale competente per territorio.

Ad eccezione dei controlli sierologici di cui ai punti 3, 4 e 6 che rimangono a carico del Fondo Sanitario Nazionale, i costi di tali prove sono a carico del proprietario degli animali.

Le Regioni e Province Autonome, anche tramite gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali, rendono disponibili i dati relativi agli esiti degli esami svolti nell'ambito dei piani di controllo e certificazione al Centro Nazionale di Referenza, secondo protocolli definiti dalla Direzione Generale della Sanità Animale e dei Farmaci Veterinari del Ministero della Salute.

Parte II (punti 10-11): Misure volontarie: Piano aziendale di gestione sanitaria e protocolli di certificazione

10. Piano aziendale di gestione sanitaria (PGS)

La predisposizione e l'applicazione di un piano aziendale di gestione sanitaria per il controllo della paratubercolosi negli allevamenti infetti è volontaria.

Il piano aziendale contiene le misure minime di cui all'allegato 1 delle presenti linee guida ed è approvato dal Servizio veterinario dell'ASL competente per territorio.

11. Livelli di certificazione

L'attribuzione delle qualifiche sanitarie di allevamento certificato nei confronti della paratubercolosi (dal livello PT3 al livello PT5) viene attuata solo in seguito a specifica richiesta da parte del detentore dell'allevamento.

Per ottenere una qualifica sanitaria di allevamento certificato per paratubercolosi, i detentori dovranno possedere i requisiti previsti dall'Allegato 2 delle linee guida.

La qualifica di allevamento certificato nei confronti della paratubercolosi ha validità di 12 mesi e viene mantenuta se permangono i requisiti, non vengono introdotti soggetti provenienti da allevamenti con qualifiche inferiori e una prova sierologica, svolta con cadenza almeno annuale secondo uno dei protocolli di cui all'Allegato 2, ha dato esito favorevole.

Allegato 1 – Requisiti minimi per la stesura di un Piano aziendale di gestione sanitaria nei confronti della paratubercolosi

Il Piano aziendale di gestione sanitaria è basato sulla valutazione del rischio di introduzione e diffusione dell'infezione in allevamento, utilizzando, a seconda dell'indirizzo produttivo dell'allevamento, i seguenti strumenti, predisposti dal Centro Nazionale di referenza per la Paratubercolosi e disponibili sul relativo sito

(http://www.izsler.it/izs_bs/s2magazine/index1.jsp?idPagina=441):

- Allegato 1A: Manuale per il controllo della Paratubercolosi negli allevamenti di bovine da latte
- Allegato 1B: Manuale per il controllo della Paratubercolosi negli allevamenti di bovine da carne (linea vacca-vitello)

Allegato 2 – Qualifiche sanitarie degli allevamenti bovini

Qualifiche sanitarie degli allevamenti

Sono previste le seguenti qualifiche sanitarie nei confronti della paratubercolosi

Livello	Descrizione	Requisiti per l'ottenimento della qualifica	Requisiti per il mantenimento della qualifica
PT0	Allevamento senza qualifica sanitaria	- non soddisfa i requisiti previsti per i livelli successivi	//
PT1	Allevamento a basso rischio	- nessuna segnalazione di casi clinici negli ultimi 12 mesi, e - sieroprevalenza uguale o inferiore al 5% a un controllo a campione svolto almeno secondo il protocollo S1	- nessuna segnalazione di casi clinici negli ultimi 12 mesi, e - sieroprevalenza uguale o inferiore al 5% a un controllo a campione svolto almeno secondo il protocollo S1 negli ultimi 12 mesi
PT2	Allevamento negativo	- nessuna segnalazione di casi clinici negli ultimi 12 mesi, e - nessuna sieropositività a un controllo a campione svolto almeno secondo il protocollo S1	- nessuna segnalazione di casi clinici negli ultimi 12 mesi, e - nessuna sieropositività a un controllo a campione svolto almeno secondo il protocollo S1 negli ultimi 12 mesi
PT3	Allevamento certificato (livello PT3)	- possedere qualifica PT2 da almeno 24 mesi, - nessuna segnalazione di casi clinici, e - nessuna sieropositività a un controllo svolto secondo il protocollo S2	- nessuna segnalazione di casi clinici negli ultimi 12 mesi, e - nessuna sieropositività a un controllo a campione svolto almeno secondo il protocollo S1 negli ultimi 12 mesi
PT4	Allevamento certificato (livello PT4)	- possedere qualifica PT3 da almeno 12 mesi, - nessuna segnalazione di casi clinici, e - nessuna sieropositività a un controllo svolto secondo il protocollo S2	- nessuna segnalazione di casi clinici negli ultimi 12 mesi, e - nessuna sieropositività a un controllo a campione svolto almeno secondo il protocollo S1 negli ultimi 12 mesi
PT5	Allevamento certificato (livello PT5)	- possedere qualifica PT4 da almeno 12 mesi, - nessuna segnalazione di casi clinici, e - nessuna sieropositività a un controllo svolto secondo il protocollo S2	- nessuna segnalazione di casi clinici negli ultimi 12 mesi, e - nessuna sieropositività a un controllo a campione svolto almeno secondo il protocollo S1 negli ultimi 12 mesi

Protocolli per il controllo sierologico degli allevamenti

A seconda che si voglia acquisire o mantenere una delle qualifiche sanitarie previste dal piano nazionale di controllo, sono adottati due diversi protocolli di campionamento.

Protocollo S1

Il protocollo S1 permette l'acquisizione delle qualifiche sanitarie fino a PT2.

Se svolto con cadenza almeno annuale permette il mantenimento della qualifica ottenuta (da PT1 a PT5).

Tale protocollo prevede il controllo sierologico di tutti i bovini riproduttori maschi di età superiore a 24 mesi, di tutti i bovini di età superiore a 24 mesi acquistati negli ultimi 12 mesi e su un campione di bovini femmina di età superiore a 36 mesi nati in azienda, nel numero riportato nella seguente tabella:

N. vacche >36 mesi presenti	N. vacche > 36 mesi da esaminare
1 - 41	Tutte
42 - 50	41
51 - 60	49
61 - 100	55
101 - 300	62
301- 500	63
>501	65

Tale protocollo permette di rilevare, con una confidenza dell'85%, gli allevamenti con prevalenza superiore al 5%, considerando l'impiego di un test con sensibilità del 58%.

Il controllo può essere indifferentemente svolto su campioni di sangue o di latte individuale.

Interpretazione dei risultati:

- Tutti i campioni danno esito negativo: all'allevamento può essere assegnata la qualifica PT2. In caso di allevamenti già in possesso di qualifica superiore a PT2, la qualifica viene mantenuta.
- Uno o più campioni danno esito positivo: è necessario calcolare la sieroprevalenza (capi positivi / capi testati x 100). In caso di sieroprevalenza uguale o inferiore a 5%, può essere assegnata la qualifica PT1; in caso di sieroprevalenza superiore a 5 %, viene assegnata la qualifica PT0.

In caso di singola sieropositività in allevamenti già in possesso di qualifica PT3 o superiore, è opportuno, prima dell'aggiornamento della qualifica, procedere ad esami diagnostici diretti sul capo sieropositivo. Se il soggetto sieropositivo risulta negativo all'esame diretto sulle feci, il capo è considerato negativo, ma deve essere incluso nel campionamento dell'anno successivo, se ancora presente in allevamento.

Protocollo S2

Il protocollo S2 permette l'acquisizione della qualifica di allevamento certificato (da PT3 a PT5).

Tale protocollo prevede il controllo sierologico su tutti i bovini femmina di età superiore a 36 mesi, su tutti i bovini riproduttori maschi di età superiore a 24 mesi e tutti i riproduttori di età superiore a 24 mesi introdotti negli ultimi 12 mesi.

Il controllo può essere indifferentemente svolto su campioni di sangue o di latte individuale.

La qualifica sanitaria viene assegnata/mantenuta se tutti i campioni prelevati danno esito negativo alle prove diagnostiche.

In caso di singola sieropositività in allevamenti con qualifica PT3 o superiore, è opportuno, prima dell'aggiornamento della qualifica, procedere ad esami diagnostici diretti sul capo sieropositivo.

Se il soggetto sieropositivo risulta negativo all'esame diretto sulle feci, il capo è considerato negativo, ma deve essere incluso nel campionamento dell'anno successivo, se ancora presente in allevamento.

3.c. Piano di monitoraggio regionale (Emilia Romagna)

Nell'anno in corso è stato realizzato un monitoraggio su tutto il patrimonio bovino da latte della Regione, allo scopo di stimare la prevalenza di infezione paratubercolare, mediante test ELISA sul latte di massa di ogni allevamento, contestualmente al prelievo per Brucellosi e Leucosi.

Il Piano aveva come obiettivo principale, oltre che aggiornare la stima relativa alla prevalenza di paratubercolosi, quello di sensibilizzare gli allevatori alla gestione della problematica.

E' da tenere presente che il test ELISA sul latte di massa è poco sensibile ed è nota dalla bibliografia la sua capacità di mettere in evidenza solo le aziende ad elevata prevalenza, anche se il campionamento ripetuto tende ad aumentare la sensibilità della metodica. Sono state sottoposte a controllo 3.412 aziende, da cui è stato prelevato ripetutamente il latte di massa (84% degli allevamenti campionati per 3 almeno volte, 11% campionati 2 volte, 5% campionati una volta).

La prevalenza di aziende positive al latte di massa (= con almeno un controllo positivo) si attesta al 14.5 %.

Come già dimostrato da precedenti indagini, le aziende di grandi dimensioni hanno maggiori probabilità di risultare positive.

Per valutare la sensibilità del test ELISA su latte di massa, su circa 200 aziende che avevano almeno 2 controlli negativi, è stato eseguito un approfondimento attraverso un campione ambientale di feci (analizzato mediante PCR e coltura) e attraverso un campione randomizzato di sangue su 30 capi di età superiore a 36 mesi.

I risultati confermano la bassa sensibilità del test ELISA su latte di massa.

Infatti, delle aziende risultate negative al latte di massa:

- il 42.5% è risultato positivo al campionamento individuale di sangue;
- il 5% è risultato positivo al campionamento ambientale di feci.

Da una stima non definitiva, la prevalenza di aziende infette è del 52-55%, dato in linea con quello delle altre regioni, seppur con metodiche di campionamento diverse.

3.d. Piano di Certificazione nelle Province di Lodi e Milano

Il CRN ha partecipato alla stesura di un Piano di Certificazione per la Paratubercolosi, su richiesta dall'Associazione Allevatori della province di Milano e Lodi, in collaborazione con le rispettive ASL. Tale Piano, a carattere volontario, è stato approvato dall'ASL di Lodi (det. n.113 del 23/04/2007) e dall'ASL di Milano (Det. n.20 del 02/04/2008). Il piano prevede test annuali mediante esame sierologico ELISA e/o colture fecali, in base ai quali l'allevamento viene categorizzato in 4 livelli, cui corrispondono livelli di garanzia crescente di assenza di infezione in allevamento.

Assemblando i dati delle 2 province, al 30 settembre 2012, 28 aziende hanno ottenuto la certificazione, di cui 18 di 1° livello, 7 di 2° livello, 3 di 3° livello.

Il CRN fa parte del Comitato tecnico, che ha il compito di valutare i risultati del piano ed eventualmente proporre modifiche per migliorarne l'efficacia, nonché promuovere azioni di sostegno.

3.e Manuali per il Controllo della Paratubercolosi

Sono a disposizione sul sito del CRN due *Manuali per il Controllo per la Paratubercolosi*, uno destinato agli allevamenti di vacche da latte (<http://www.izsler.it/pls/izs bs/v3 s2ew CONSULTAZIONE.mostra pagina?id pagina=507>) e uno a quelli di vacche da carne (<http://www.izsler.it/pls/izs bs/v3 s2ew CONSULTAZIONE.mostra pagina?id pagina=508>).

I due Manuali sono stati revisionati in data 30.9.2012.

I Manuali ed il loro utilizzo sono stati illustrati nel corso di vari interventi pubblici.

4) aggiornamenti epidemiologici sulle materie di competenza

Progetto innovativo ASL Milano 1

Nell'anno in corso è stata realizzata, da parte dei Servizi veterinari dell'ASL Milano 1 in collaborazione con il CRN, un'indagine su un campione di 47 allevamenti della provincia di Milano che includeva sia aziende certificate che non certificate, con lo scopo di:

- definire il livello di prevalenza di aziende ed animali infetti;
- verificare la possibilità di stimolare l'applicazione di misure di biosicurezza, attraverso una formazione specifica e l'utilizzo di questionari mirati.

Le analisi hanno evidenziato una prevalenza apparente di aziende positive (aziende con almeno un capo positivo al test sierologico) pari al 63,8% e una prevalenza apparente di capi positivi del 4,5%.

I risultati degli esami sierologici sono stati comunicati agli allevatori; congiuntamente sono state consigliate misure atte al biocontenimento di Map, rivolte in particolare alla gestione dei capi positivi e alle necessarie modifiche del management aziendale.

Attraverso la somministrazione di un questionario agli allevatori si sono raccolti elementi utili a conoscere il livello di consapevolezza e di interesse relativamente alla conoscenza dello stato di infezione, alla consapevolezza dei danni economici legati alla patologia e alla disponibilità ad applicare i fondamentali criteri di biosicurezza e biocontenimento.

Dalle risposte pervenute, la stragrande maggioranza degli allevatori (91,2%) pensa che in generale la paratubercolosi sia un problema sanitario ed economico per l'allevamento del bovino da latte, ma in particolare solo il 31,1% pensa che sia un problema per il proprio allevamento. Questi dati da una parte giustificano gli sforzi compiuti e le energie impegnate per contrastare la diffusione della paratubercolosi, ma ci portano a pensare che l'allevatore non abbia la conoscenza reale dell'impatto economico della malattia nel proprio allevamento e tenda per questo a sottostimarla. Si pensa che probabilmente il caso clinico isolato non desti preoccupazione o non venga diagnosticato. Conforta il fatto che la maggior parte degli intervistati (77%) abbia discusso con il proprio veterinario di quali pratiche adottare per poter contrastare il problema.

I risultati del questionario danno l'impressione che l'interesse nei confronti della patologia sia elevato, ma che gli allevatori siano restii ad utilizzare risorse proprie per affrontare il problema. Nel campo della biosicurezza resta ancora molto da fare, in particolare nella corretta gestione del parto e dei vitelli, punti cardine per evitare il contagio. Le esigenze segnalate dagli allevatori sono quelle di avere a disposizione aziende certificate per l'approvvigionamento di animali e la necessità di un intervento economico esterno di supporto.

I risultati dell'indagine sono in corso di pubblicazione.

Ricerca e sperimentazione

1) Progetti di ricerca finanziati dal Ministero della Salute (titolo, stato dell'arte dei lavori, ecc.)

Ricerca Corrente

- Progetto di Ricerca Corrente IZS LE 2009/019: "Tipizzazione molecolare dei ceppi di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) e sue applicazioni in epidemiologia molecolare" (Responsabile scientifico: Dr. N. Arrigoni). La ricerca ha avuto inizio il 1.9.2010 ed è terminata il 31.8.2012. Sono state messe a punto metodiche di sub-tipizzazione molecolare di Map (VNTR, SSR) che sono state applicate su ceppi circolanti sul territorio nazionale. I risultati del progetto sono stati divulgati in 2 pubblicazioni su riviste impattate e presentati in 3 congressi, di cui uno nazionale e due internazionali (vedi sezione pubblicazioni).
- Progetto di ricerca corrente IZS LE 2010/016: "Formaggi a base di latte sottoposto a trattamento termico: valutazione della fosfatasi alcalina e della sopravvivenza di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*" (Responsabile scientifico: Dr. G. Bolzoni). La ricerca ha avuto inizio il 1.10.2011 e terminerà il 30.12.2012. I primi risultati del progetto verranno illustrati al XIV Congresso Nazionale SIDiLV e riguardano i dati preliminari di una metodica che, attraverso il trattamento con propidium monoazide e la successiva applicazione della PCR real time, è in grado di differenziare le forme vitali di Map da quelle non vitali.
- Progetto di ricerca corrente IZS LE 2011/012: "Paratubercolosi nella fauna selvatica: approfondimenti diagnostici ed epidemiologici" (Responsabile scientifico: Dr. N. Arrigoni). Il progetto ha avuto inizio il 1.09.2012 e terminerà il 31.08.2014. Sono stati al momento definiti i criteri per la realizzazione del piano di campionamento.
- Progetto di ricerca corrente IZS LE 2011/017: "Validazione di processi di produzione dei principali formaggi D.O.P. destinati all'esportazione nei mercati extra europei" (Responsabile scientifico: Dr. P. Daminelli). Il progetto ha avuto inizio il 03.09.2012 e terminerà il 02.09.2014. Sono stati stesi i protocolli per la realizzazione degli studi di challenge sulle principali produzioni tipiche italiane (Grana Padano, Parmigiano Reggiano, Taleggio, Gorgonzola, Asiago). Sono state avviate le colture di Map da utilizzare nelle prove di challenge.

Il Centro di Referenza è inoltre coinvolto nei seguenti Progetti di Ricerca Corrente di altri IZZSS, in cui, oltre ad eseguire attività specifica nell'ambito dei vari progetti, fornisce consulenza sulle metodiche analitiche ed eventuale attività di conferma:

- Progetto di ricerca corrente (IZS UM) 2010/101: "Valutazione della presenza di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in reflui zootecnici utilizzati per la produzione di biogas" (Responsabile scientifico: Dr. Piera Mazzone). Il progetto è iniziato il 1.8.2011 e terminerà il 31.7.2013. I primi risultati depongono per una sopravvivenza di Map ai processi di produzione di biogas, seppure in

concentrazione decrescente durante tutte le fasi del processo. I primi risultati saranno presentati al XIV Congresso Nazionale SIDiLV;

- Progetto di ricerca corrente (IZS VE) 2010/102: "Fibrogenesi ed infiammazione nella paratubercolosi bovina: interazioni ospite-patogeno" (Responsabile scientifico: Dr. Nicola Pozzato). Il progetto è iniziato il 1.7.2011 e terminerà il 30.06.2014. Il CRN deve procedere alla tipizzazione dei ceppi da utilizzare nelle infezioni sperimentali delle cellule in coltura;
- Progetto di ricerca corrente (IZS UM) 2011/110: "Impiego di Johnina sperimentale nel gamma-interferon test per la diagnosi precoce di paratubercolosi bovina e bufalina" (Responsabile scientifico: Dr. Piera Mazzone). Il progetto è iniziato il 3.9.2012 e terminerà il 2-9-2014. L'IZSUM ha prodotto la Johnina, nell'ambito di un precedente progetto di ricerca corrente, a partire da ceppi di campo diffusi sul territorio nazionale e tipizzati con metodiche biomolecolari dal CRN. Il presente progetto ha come obiettivo quello di eseguire test in campo su allevamenti positivi e negativi per paratubercolosi, allo scopo di verificare le performances della stessa johnina nell'ambito del test del gamma interferon, in parallelo con johnine commerciali prodotte in altri paesi.

Ricerca Finalizzata

Il CRN partecipa come capofila ad un progetto di Ricerca Finalizzata (Area: FOOD SAFETY) dal titolo "Risk evaluation of human exposure to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and comparative analysis of strains of human and animal origin" (Principal investigator: Leonardo Sechi).

Le Unità Operative coinvolte sono:

- UO 1 (Capofila): IZSLER Piacenza, Centro Referenza Nazionale Paratubercolosi (Dr. N.Arrigoni)
- UO 2: Università Sassari, Dipartimento di Scienze biomediche (Prof. L.Sechi)
- UO 3: IZSLER Brescia, Analisi del rischio (Dr. S. Pongolini,)
- UO 4: IZSLER Brescia, Microbiologia predittiva (Dr. P.Daminelli,)
- UO 5: IZSLER Pavia (Dr. M.Fabbi)

Il progetto è stato approvato dal Ministero della Salute ed ha avuto avvio il 2.12.2011.

Durante i primi mesi di attività sono state messe a punto le metodiche PCR

semiquantitative per la valutazione dell'entità della contaminazione del latte di massa, da utilizzare per valutare l'esposizione dell'uomo a Map attraverso il consumo di latte.

Sono anche allo studio metodiche che, attraverso l'utilizzo di fagi, riescano e definire, oltre alla presenza di Map nel campione, la sua vitalità, da utilizzare in prodotti alimentari di varia natura.

2) Progetti di ricerca finanziati da altri Enti (titolo, stato dell'arte dei lavori, ecc.)

- E' stata avviata, nel mese di aprile 2011, una ricerca (scadenza prorogata al 30.6.2013) dal titolo "Valutazione della prevalenza e del livello di contaminazione da Map nel latte alimentare". La ricerca, finanziata dall'Università degli Studi di Bologna,

Dipartimento di Scienze mediche Veterinarie, prevede una indagine in PCR sulla presenza di Map nel latte di massa e, in parallelo, sui filtro di mungitura. Su un campione di aziende è in corso una indagine individuale in ELISA per la valutazione della sensibilità delle metodiche precedenti. Nel primo anno di attività sono state messe a punto le metodiche PCR ed è iniziata l'indagine sui campioni di latte individuale in ELISA, che è in corso di completamento.

- Continua la collaborazione con il Parco Tecnologico Padano, con uno studio sulla resistenza genetica del bovino nei confronti dell'infezione Paratuberculare e di correlazione della virulenza dei ceppi con le loro caratteristiche genotipiche.

3) Altre ricerche (titolo, stato dell'arte dei lavori, ecc.)

- Si è concluso un progetto con il Policlinico IRCCS S.Matteo di Pavia (Dr. P.Marone), il Gruppo Policlinico di Monza (Prof. A. Giacosa) e l'Università di Milano (Prof. C. Bandi), dal titolo "Studio dell'infezione/colonizzazione da *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in pazienti con morbo di Crohn e in ruminanti". I risultati sono stati pubblicati su rivista impattata (vedi sezione pubblicazioni).
- In Regione Emilia Romagna è stato avviato un progetto sperimentale, in collaborazione con i Servizi veterinari e il CEREV, per la valutazione dei danni economici della paratuberculosis, legato sia alla presenza dei casi clinici che subclinici. Durante il prossimo anno verranno selezionati alcuni allevamenti, verranno campionati animali di età superiore a 36 mesi per essere sottoposti ai test diagnostici della paratuberculosis (sierologia ELISA e/o coltura). Verranno quindi raccolti i dati produttivi/riproduttivi relativi ad animali positivi e negativi e sottoposti a confronto.
- Nell'anno in corso sono state realizzate:
 - o 1 tesi di laurea ("Piano di controllo della paratuberculosis del bovino in Italia", Università degli Studi di Parma, Facoltà di Medicina Veterinaria, Relatore Prof. S.Cavirani, Correlatore Dr. N.Arrigoni, Laureando Dr. E.Martinelli);
 - o 1 tesi di specializzazione ("Piano di monitoraggio della paratuberculosis: aspetti applicativi", Università degli Studi di Parma, Facoltà di Medicina Veterinaria, Relatore Prof. C.Cabassi, Correlatore Dr. N.Arrigoni, Specializzanda Dr. C.Grisanti).

Aggiornamento e formazione professionale

1) Corsi che il CRN ha organizzato o a cui ha partecipato

- N.Arrigoni ha partecipato come relatore al “Seminario avanzato teorico/pratico di Buiatria” organizzato dal Centro Studi Clinica Veterinaria S.Francesco, a S.Nicolò (PC) il 8 ottobre 2011, con una relazione dal titolo “Paratubercolosi: perché preoccuparsi” ;
- N.Arrigoni ha partecipato come relatore al corso ECM “Biosicurezza nell’allevamento dei bovini attraverso lo studio delle loro malattie”, organizzato dal Servizio Sanitario Regionale Emilia-Romagna, presso INFORMO, ASL Modena, il 6 ottobre 2011, con due relazioni dal titolo: “Biosicurezza per la profilassi della Paratubercolosi” e “Applicazione pratica: utilizzo di una scheda per la valutazione del rischio di trasmissione della Paratubercolosi in aziende da latte e da carne”;
- N.Arrigoni ha partecipato come relatore al corso “Iniziativa formativa interna sul campo: Piano di monitoraggio della paratubercolosi in Emilia Romagna”, presso l’ASL di Piacenza, il giorno 9.11.2011;
- N.Arrigoni ha partecipato come relatore al Corso ECM per medici veterinari, organizzato dall’Ordine dei Veterinari di Brescia, a Brescia il 12.11.2011, con una relazione dal titolo “Paratubercolosi: sanità animale e sicurezza alimentare”;
- N.Arrigoni ha partecipato come relatore al corso ECM “Esperienze caratterizzanti l’attività di laboratorio e di elaborazione scientifica delle strutture IZSLER operanti in Emilia Romagna anche alla luce delle competenze di nuova acquisizione”, tenutosi a Bologna il 9 novembre 2011, con una relazione dal titolo “Paratubercolosi: Indagine in Emilia Romagna: primi risultati”;
- N.Arrigoni ha partecipato come relatore al Corso per medici veterinari, organizzato a Piacenza il 29.11.2011, con una relazione dal titolo “Paratubercolosi: perché preoccuparsi?”;
- N.Arrigoni ha partecipato come relatore all’incontro di formazione per veterinari e allevatori sulla Paratubercolosi, a Torino, il 25 gennaio 2012;
- N.Arrigoni ha partecipato come relatore al corso ECM “Impianto normativo comunitario: prospettive e criticità” organizzato dalla Società Italiana di Medicina Veterinaria Preventiva, a Folgaria (TN), il 27 febbraio 2012, con tre relazioni dal titolo: “Attualità sulla Paratubercolosi”, “Presenza di *Mycobacterium avium paratuberculosis* nella catena alimentare” e “Paratubercolosi: prospettive future”;
- N.Arrigoni ha partecipato come relatore all’incontro di formazione per veterinari e allevatori sulla Paratubercolosi, organizzata dall’Associazione Allevatori di Piacenza, a Piacenza, il 28 febbraio 2012;
- N.Arrigoni ha partecipato come relatore all’incontro di formazione per veterinari e allevatori sulla Biosicurezza per il controllo della Paratubercolosi, a Bascapè (PV), il 28 marzo 2012;

- N.Arrigoni ha partecipato come relatore al corso ECM “Produzione del bovino da latte e da rimonta” organizzato dalla Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche a Brescia il 16.5.2012 con una relazione dal titolo: “La paratubercolosi”;
- N.Arrigoni ha partecipato come relatore al corso “Formazione teorico-pratica per lo sviluppo di competenze in epidemiologia veterinaria”, organizzato dall’IZSLER a Bologna il 29.6.2012 con 2 relazioni dal titolo “Paratubercolosi bovina: eziologia, patogenesi, diagnosi e strumenti per il controllo” e “Esercitazione: applicazione dei manuali di biosicurezza”
- N.Arrigoni ha partecipato come relatore al corso di aggiornamento “La paratubercolosi bovina e il morbo di Crohn: similitudini e problematiche”, organizzato dall’Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Umbria e delle Marche a Perugia, il 27 settembre 2012, con due relazioni dal titolo “La paratubercolosi bovina: la malattia, fattori di rischio e biosicurezza” e “Paratubercolosi: focus sulle novità nazionali ed internazionali”.

2) Convegni/congressi che il C. d. R. ha organizzato o a cui ha partecipato

- Il Centro di Referenza Nazionale sulla Paratubercolosi, in collaborazione con il Centro di Referenza nazionale per la Formazione (IZSLER Brescia), su specifica richiesta del Ministero della Salute, ha organizzato il **V Convegno Nazionale sulla Paratubercolosi, dal titolo “Paratubercolosi: prospettive per la sanità animale e per la salute pubblica”** (Responsabile scientifico: Dr.ssa Arrigoni, CRN).

Il convegno si è svolto a Roma, presso l’Auditorium del Ministero della Salute, il 10 novembre 2011. Hanno partecipato alla giornata di formazione 87 persone, tra veterinari, biologi e medici, provenienti per lo più da Aziende Sanitarie Locali, da Istituti Zooprofilattici Sperimentali, dal Ministero della Salute e dalle Regioni.

Il primo obiettivo del convegno verteva sulla comunicazione dello stato dell’arte sulla Paratubercolosi, attraverso la presentazione delle esperienze di lotta alla malattia in atto in vari Paesi europei ed extraeuropei, in particolare illustrando l’esperienza olandese del Programma di Assicurazione Qualità dal latte di massa. Sono state inoltre riportate le esperienze italiane, al momento limitate ad iniziative provinciali o regionali, nel campo del monitoraggio, del controllo e della certificazione degli allevamenti.

Obiettivo ultimo del convegno era porre le basi per la creazione di un gruppo di lavoro costituito dai rappresentanti del Ministero, e dei Servizi Veterinari Regionali italiani, degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali, del Centro di Referenza Nazionale per la Paratubercolosi, al fine di porre le basi per iniziative future comuni e condivise, sia nel campo della sanità animale che della sicurezza degli alimenti.

Programma del Convegno

8.30-9.00: Saluto delle Autorità (Rappresentanti Ministero e IZSLER)

9.00-9.45: Attualità sulla Paratubercolosi – N.Arrigoni (CRN)

9.45-10.30: Morbo di Crohn e paratubercolosi: la storia infinita? C.Prantera
(Osp.S.Camillo, Roma)

10.30-11.15: Map e salute pubblica – L.Sechi (Università Sassari)

11.15-12.00: Map e catena alimentare – S.Pongolini (CRN)

12.00-13.00: Discussione

14.00-14.45: Aggiornamento sulle iniziative in atto in Europa – N.Arrigoni (CRN)

14.45-15.30: L'esperienza Olandese: il Programma assicurazione qualità del latte –
M.Weber (GD Animal Health Service, Deventer)

15.30-16.15: Le possibilità di intervento: monitoraggio e certificazione – M.Tamba
(CEREV, IZSLER Bologna)

16.15-17.00: La vaccinazione: una prospettiva applicabile? – R.Juste (Neiker, Bilbao)

17.00-18.00: Conclusioni e prospettive - L.Ruocco (Ministero Salute)

- N.Arrigoni ha partecipato come relatore al convegno ECM “Giornata di studio sulla paratubercolosi: la diagnosi, il territorio, la politica: ricomporre il puzzle” organizzata dall’IZS Lazio e Toscana, a Viterbo, il 12 dicembre 2011, con due relazioni dal titolo: “Diagnosi della paratubercolosi . interpretazione critica del dato diagnostico” e “I piani per la paratubercolosi. Monitoraggio e certificazione: vizi e virtù”;
- N.Arrigoni ha partecipato come relatore al convegno ECM “Micobatteri atipici: patogeni del futuro?” con una relazione dal titolo “Paratubercolosi: possibili aspetti zoonosici”, organizzata a Brescia, il 23 febbraio 2012, dalla Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche;
- N.Arrigoni ha partecipato come relatore al XLIV Congresso Nazionale della Società italiana di Buiatria, ECM, organizzato dalla SIB, a Piacenza il 19-21 aprile 2012, con una relazione dal tema: “Paratubercolosi: stato dell’arte e prospettive”;
- N.Arrigoni e M.Ricchi hanno partecipato all’11th International Colloquium on Paratuberculosis (Sydney, 5 – 10 febbraio 2012), organizzato dalla International Association for Paratuberculosis. In questa occasione il CRN ha presentato 3 poster (vedi sezione pubblicazioni), di cui uno è stato selezionato per la presentazione orale, eseguita dal Dr.Ricchi (“High resolution melting with unlabelled probe for short sequence repeat analysis in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subtyping”);
- C.Garbarino ha partecipato come relatrice al XX Congresso Nazionale organizzato dalla SIPAOC, a Siracusa, il 26-27 settembre 2012, con due relazioni dal titolo “Il Centro di Referenza Nazionale per la Paratubercolosi: compiti e attività” e “Paratubercolosi ovi-caprina: approccio alla diagnosi e a controllo”;
- Il CRN ha ricevuto dall’International Association for Paratuberculosis l’incarico di organizzare il 12° International Colloquium on Paratuberculosis a Parma dal 22 al 26 giugno 2014.

Nel corso del 2012 sono stati realizzati:

- il sito del convegno (www.icp2014.eu);

- la casella mail del convegno (info@icp2015.eu);
- una locandina informativa e del materiale pubblicitario che è stato distribuito in occasione dell'11th International Colloquium of Paratuberculosis (Sidney, febbraio 2012);
- il budget preventivo del convegno che è stato presentato dalla Dr.ssa Arrigoni al Board of Directors in occasione dell'11th International Colloquium of Paratuberculosis (5-9 febbraio 2012), ed approvato dallo stesso Board, dopo le modifiche richieste (ricomprensione le spese di gestione degli abstract e organizzare una riunione di un gruppo ristretto FIL-IDF sui piani di controllo per la paratubercolosi);
- la 1° riunione del Comitato Organizzatore Locale, a Parma il 27 marzo 2012, in cui sono stati affidati incarichi organizzativi ai vari componenti del Comitato.

3) comitati scientifici e gruppi di lavoro a cui ha partecipato il personale del CRN

- Gruppo di lavoro Ministeriale sulla Paratubercolosi, riunitosi a Roma, presso il Ministero della Salute, in data 3 novembre 2011 e 25 settembre 2012 per discutere dei piani di monitoraggio e di intervento a livello nazionale (N.Arrigoni).
- Gruppo di lavoro Regione Emilia-Romagna sulla Paratubercolosi, per la realizzazione di un piano di monitoraggio e intervento regionale, riunitosi l'8.6.2012 (N.Arrigoni).
- Gruppo di lavoro Regione Lombardia sulla Paratubercolosi, per la realizzazione di un piano di monitoraggio e intervento regionale, riunitosi il 21.5.2012 e il 5.7.2012 (N.Arrigoni).
- Comitato tecnico previsto dal Programma volontario di Certificazione per la Paratubercolosi bovina nella province di Lodi e Milano, riunitosi a Lodi il 7.3.2012 (N.Arrigoni).
- Gruppo di lavoro inter-regionale per l'esportazione di formaggi DOP, che si è riunito presso la Regione Lombardia in data 26.6.2012. Tale gruppo, di cui fanno parte i Servizi Veterinari delle Regioni, Assolatte e i vari Consorzi di tutela dei formaggi DOP, ha l'obiettivo di mettere in campo iniziative atte a fornire dati sperimentali sulla sopravvivenza di Map all'interno delle varie tipologie di formaggi. Questo si è reso necessario a fronte della stipula di accordi commerciali tra il nostro Paese e Paesi terzi, come l'India, che chiedono garanzie sul fatto che i trattamenti tecnologici cui sono sottoposti i prodotti siano sufficienti ad inattivare Map. In collaborazione con il Reparto di Microbiologia Alimenti dell'IZSLER di Brescia, sono quindi stati messi a punto dei programmi di contaminazione e caseificazione sperimentale dei vari prodotti. Il CRN ha preparato i ceppi di campo e i ceppi ATCC necessari per gli inoculi sperimentali del latte destinato ad essere trasformato nelle varie tipologie di formaggi, ed ha effettuato delle prove sperimentali preliminari per verificare l'efficacia dell'affioramento nel ridurre la concentrazione di Map nel latte, che risulta di circa al 90% (G.Cammi).

Consulenze, attività di docenza, collaborazioni nazionali

1) Consulenze richieste ad esterni

- Nulla da segnalare.

2) Consulenze e pareri tecnici forniti ad esterni

Presso il CRN (tutor Dr. Ricchi) sono stati svolti stage formativi per i seguenti Enti:

- IZS Piemonte Liguria e Valle d'Aosta (Sezione di Aosta) - Dr. Guidetti Cristina e Dr. Botti Velca, nei giorni 23-24 gennaio 2012, per apprendere le tecniche colturali e PCR relative alla paratubercolosi;
- Parco Tecnologico Padano (Lodi) - Dr.ssa Valeria Messina, nei giorni 19 e 20 marzo 2012, per apprendere le tecniche di coltura e tipizzazione molecolare relative a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*;
- Parco Tecnologico Padano (Lodi) – Dr. Enrico Zanetti, nei giorni 11 e 12 giugno 2012, per apprendere le tecniche di coltura e tipizzazione molecolare relative a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*;
- IZS Piemonte Liguria e Valle d'Aosta (Sezione di Torino) - Dr. Romano Angelo, nei giorni 18-19 giugno 2012, per apprendere le tecniche di tipizzazione molecolare relative a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Al CRN sono afferite numerose richieste telefoniche o via posta elettronica, da parte di altri IIZZSS, per chiarimenti sulle metodiche diagnostiche e sulla gestione del problema in allevamento.

Sono pervenute inoltre numerose richieste di chiarimento sull'interpretazione dei dati diagnostici e sulla gestione del problema in allevamento, da parte di veterinari liberi professionisti e AUSL di varie regioni italiane.

3) Attività di docenza

L'attività di docenza realizzata nel corso dell'anno è documentata al punto Aggiornamento e formazione professionale (Corsi che il C. d. R. ha organizzato o a cui ha partecipato, Convegni/congressi che il C. d. R. ha organizzato o a cui ha partecipato).

Consulenze e collaborazioni europee

L'IZSLER, rappresentato dai Centri di referenza per la tubercolosi e per la paratubercolosi, partecipa ad un network internazionale relativo al Progetto EMIDA "MYCBACTDIAGNOSIS".

Il meeting iniziale di questo progetto si è svolto presso il centro AHVLA di WEYBRIDGE nei giorni 30-31 maggio 2012. Insieme ai rappresentanti di Brescia (Dr.ssa Pacciarini e Dr.ssa Boniotti) ha partecipato per il CRN il Dr.M.Ricchi.

Lo scopo del primo incontro è stato quello di definire i compiti all'interno dei sotto-progetti relativi a ciascun laboratorio partecipante. In particolare il CRN, in associazione con il Centro di referenza per la tubercolosi (Dr.ssa Pacciarini) ha avuto il compito di definire criteri per la raccolta di campioni di siero provenienti da animali infetti da paratubercolosi e di partecipare alla raccolta dei medesimi, fornendo dati relativi sia allo stato di infezione, che al suo stadio, da utilizzare nella validazione di metodiche diagnostiche innovative.

Consulenze e collaborazioni internazionali

- E' stato realizzato uno stage formativo per la ricerca di Map da latte e derivati (tutor: Dr.ssa Irene Grant) presso la Queen's University di Belfast, a cui hanno partecipato il Dr. M.Ricchi e la Dr.ssa G.Cammi (8-11 luglio 2012).

La Dr.ssa Grant è attiva da anni nel settore della rilevazione di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, specialmente dalla matrice latte, ed ha al suo attivo numerose pubblicazioni sull'argomento.

In occasione della visita sono state approfonditi i seguenti argomenti:

- Metodica di cattura con fagi per l'individuazione di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vitale da campioni di latte;
 - Metodiche alternative alla coltura per l'individuazione di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vitale da matrici alimentari.
-
- E' stato presentato un progetto da parte di una ricercatrice statunitense, dr. Jeanette McDonald, da anni attiva nei programmi di formazione per la paratubercolosi negli Stati Uniti, per una collaborazione nell'ambito della formazione continua veterinaria. Il progetto (Fulbrigh Project "National Education Program for Veterinary Practitioners, Students, and Producers"), interamente finanziato dagli Stati Uniti, prevede una consulenza sull'attivazione dei piani di formazione per veterinari ed allevatori, in via di attivazione in Italia a supporto del Piano Nazionale, anche attraverso l'attivazione di piattaforma e-learning. Il progetto è in via di valutazione.

Publicazioni scientifiche e divulgative

Vedi All. 5 (copia del frontespizio).

1. Pistone D, Marone P, Pajoro M, Fabbi M, Vicari N, Daffara S, Dalla Valle C, Gabba S, Sasseria D, Verri A, Montagna M, Epis S, Monti C, Strada EG, Grazioli V, Arrigoni N, Giacosa A, Bandi C (2012): *Mycobacterium avium* paratuberculosis in Italy: commensal or emerging human pathogen? *Digestive and Liver Disease* (2012): 44, 461-465
2. Ricchi M, Barbieri G, Cammi G, Garbarino CA, Arrigoni N. (2102). High-resolution melting with unlabelled probes for short sequence repeat analysis in *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis sub-typing. *Proceedings of 11th International Colloquium on Paratuberculosis, February 5th-10th, 2012 Sydney (Aus), 259-260*
3. Garbarino CA, Cammi G, Archetti I, Amadori M, Panella G, Ricchi M, Tranquillo V, Arrigoni N (2012): Heat treatment and gamma-irradiation of bovine colostrum: impact on survival of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP) and other pathogens and on immunoglobulin content. *Proceedings of 11th International Colloquium on Paratuberculosis, February 5th-10th, 2012 Sydney (Aus), 197*
4. Battioni F, Amadori M, Archetti I, Taddei R, Arrigoni N (2012): Micro-filtration treatment of bovine colostrum infected by *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP): preliminary results. *Proceedings of 11th International Colloquium on Paratuberculosis, February 5th-10th, 2012 Sydney (Aus), 394*
5. Zavanella M, Pinsi G, Bertoloni G, Zanoni R, Arrigoni N, Catania S, Belletti GL, Idotta G, Tagliabue S, D'Incau M, Salogni C, Zanoni MG, Pacciarini M (2012). *Micobatteri atipici: Patogeni del futuro?* Ed. Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche – Brescia, gennaio 2012.
6. Giacometti F, Serraino A, Finazzi G, Daminelli P, Losio ML, Arrigoni N, Piva S, Florio D, Riu R, Zanoni RG (2012): Sale of raw milk in Northern Italy: food safety implications and comparison of different analytical methodologies for detection of foodborne pathogens. *Foodborne pathogens and disease*. 9, 4, 1-5
7. C. Piras, A. Soggiu, L. Bonizzi, H. A. Hussein, V. Greco, N. Arrigoni, A. Urbani, P. Roncada (2012): Immunoreactive proteins of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis, *Congresso EuPA/BSPR Proteomics Meeting, 9-12 luglio 2012, Glasgow, Scotland, 12-1145, p.125.*
8. Mazzone P, Vitale N, Ricchi M, Corneli S, Mangili P, Papa P, Biagetti M, Sebastiani C, Caporali A, Raber A, Pezzotti G, Arrigoni N, Cagiola M (2012): Use of experimental Johnin in the gamma-interferon test in cattle infected by *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: preliminary data. *Proc.2 Congress of EAVLD, 1-4-july, 2012, Kazimierz Dolny, Poland.S3-P-21.*

Sito Web

All'interno del sito dedicato sono disponibili le informazioni relative alla malattia, i manuali per il controllo e i piani di certificazione.

E' inoltre disponibile un depliant divulgativo dal titolo "Paratubercolosi nell'allevamento della bovina da latte", destinato ad allevatori e veterinari.

Nell'anno in corso è stata inoltre implementata la piattaforma interattiva con cui vengono gestiti i ring test (proficiency test) organizzati dal CRN; nell'anno in corso è stata utilizzata per gestire il ring test per la diagnosi sierologica mediante ELISA e/o AGID.

Il Responsabile del Centro di Referenza Nazionale per la Paratubercolosi

Dott. Norma Arrigoni