



## **RELAZIONE ANNUALE**

**Centro di Referenza nazionale per la Paratubercolosi**  
**IZSLER, Sezione di Piacenza**

(Periodo: dal 1.10.2012 al 30.09.2013)

## Centro di Referenza Nazionale (CRN) Paratubercolosi Relazione sulla attività svolta dal 01.10.2012 al 30.09.2013

### Attività Diagnostica

#### **1) standardizzazione e validazione di metodiche analitiche**

Nel corso dell'anno si è proceduto alla revisione dei seguenti metodi di prova:

- Metodo di prova interno per la ricerca di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) tramite real time PCR in feci, latte e tessuti (MP 09/78, rev.3 del 5.7.2013).
- Metodo di prova interno per la determinazione di anticorpi nei confronti di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* da sangue e latte tramite ELISA indiretta – kit ID VET (MP 04/22, rev.5 del 30.10.2012).

Sono stati inoltre stesi in bozza i seguenti *metodi colturali*:

- Metodo di prova normato (Manuale OIE) per coltura da feci secondo la metodica per centrifugazione (validazione in corso);
- Metodo colturale per centrifugazione da formaggi con utilizzo di terreni sperimentali (Herrold Egg Yolk con aggiunta di mycobactin, sodio piruvato, Penicillina, PANTA e nisina);
- Metodo per coltura da tessuti (da utilizzare sia in diagnostica che in alimenti), mediante centrifugazione secondo la metodica di Hokura, 2011.

Nel mese di settembre 2013 è stato inoltre acquisito un sistema semi-automatico di coltura in terreno liquido (sistema VersaTrek). Sono in corso prove relative a:

- ricerca di MAP da feci;
- ricerca di MAP da tessuti (sia diagnostica che alimenti);
- ricerca di MAP da formaggi. In alcune prove preliminari su Parmigiano Reggiano artificialmente contaminato, con utilizzo di due nuovi terreni di coltura (brodo Herrold e brodo Middlebrook 7H9 supplementati con mycobactin, tuorlo d'uovo, penicillina e Nisina) sono stati ottenuti risultati incoraggianti.

Sono stati inoltre stesi in bozza i seguenti *metodi PCR*:

- Identificazione dei ceppi isolati in coltura mediante f57-qPCR (validazione in corso);

Sono in corso prove relative a:

- Metodo di prova per la ricerca di MAP da latte e derivati previa immunocattura con peptidi specifici;
- Metodo di prova per la ricerca di MAP da tessuti previa estrazione automatica.

Tutti i metodi validati ed emessi in qualità 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

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

- Campioni di sieri 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:
  - *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP);
  - *Mycobacterium porcinum* (agente di false positività in PCR-IS900 per MAP).

Vari IZZSS hanno richiesto, nel corso dell'anno di attività, materiali per la validazione di metodi di prova (ceppi di campo, matrici contaminate, sieri positivi e negativi, DNA di ceppi batterici), nonché consulenza su problemi specifici riguardanti gli aspetti diagnostici.

Sono stati inviati ai vari IZZSS, Università ed altri Enti di ricerca 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;
- standard biomolecolari per qPCR.

## 3) attività analitica

Nel periodo di riferimento si è osservata una sostanziale stabilità dell'attività analitica rispetto all'anno precedente, che si è indirizzata alla diagnosi di infezione prevalentemente dalla specie bovina.

Sui campioni pervenuti sono stati eseguiti complessivamente **42.974 esami**, di cui:

Sierologici	37.400
Microbiologici	1.318
PCR	4.256

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

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

Con l'adozione delle nuove linee guida sulla Paratubercolosi, il test PCR di conferma dalle feci degli animali sospetti clinici diventerà il test di conferma, ai fini della segnalazione dei casi clinici al Servizio Veterinario dell'ASL di competenza.

A tale proposito si segnala che il CRN ha organizzato nel 2013 un ring test per la diagnosi diretta destinato agli IZZSS, con esiti soddisfacenti (vedi punto successivo).

#### **4) circuiti interlaboratorio organizzati dal CRN**

E' stato organizzato dal CRN un circuito interlaboratorio per la diagnosi diretta (coltura e/o PCR), sulla matrice feci, a cui hanno aderito 19 laboratori appartenenti a 10 IZZSS.

Per la realizzazione del ring test è stato utilizzato il sito internet dell'IZSLER, con possibilità di iscrizione on-line, inserimento risultati, upload dei metodi di prova e download di protocolli e report.

I campioni sono stati spediti il 25.3.2013; la scadenza prevista per l'inserimento dei risultati era il 01.08.2013.

I risultati sono stati inseriti da tutti i laboratori partecipanti (ad eccezione di uno) nei tempi previsti.

La accuratezza media dei laboratori partecipanti è risultata molto soddisfacente, sia per l'analisi colturale (0.989) che per la PCR (0,989), con performances dei laboratori in miglioramento rispetto ai ring test precedenti.

Il CRN ha provveduto alla pubblicazione sul sito IZSLER, nella sezione dedicata, dei seguenti documenti:

- tabella per la decodifica dei risultati entro 7 giorni dalla scadenza del ring test, 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:

- 4 prove interlaboratorio (ottobre 2012, gennaio, aprile, luglio 2013), 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 2013), 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 ricevuti da altri IIZZSS o Enti di ricerca.

### **2) sviluppo e gestione di sistemi informativi;**

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

Con l'adozione delle nuove Linee guida sulla paratubercolosi, il Ministero si è impegnato ad integrare le funzionalità del Sistema Informativo Nazionale Veterinario per la Sicurezza Alimentare (SINVSA), al fine della gestione informatica delle attività previste dalle Linee Guida, in particolare per la registrazione di:

- casi clinici, ai fini della certificazione per l'esportazione in alcuni Paesi terzi che richiedono l'assenza di casi clinici negli ultimi 12 mesi;
- qualifica sanitaria assegnata all'allevamento.

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

#### ***3.a. Linee guida (nazionali) per l'adozione di Piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria degli allevamenti nei confronti della paratubercolosi bovina***

Il CRN ha collaborato con il Ministero della Salute per la realizzazione dell'iter di approvazione delle "Linee guida per l'adozione di Piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria degli allevamenti nei confronti della paratubercolosi bovina", iniziato nel corso dell'anno precedente.

In settembre 2012 il Piano è stato revisionato dal CRN, alla luce delle osservazioni ricevute dalla Regioni e province autonome di Trento e Bolzano ed è stata redatta una bozza finale, che è stata presentata dal CRN (N.Arrigoni, M.Tamba) alle Regioni e province autonome di Trento e Bolzano presso il Ministero della Salute il 25 settembre 2012 (vedi nota Ministero prot.21246 del 21/11/2012).

Le Linee Guida sono quindi state presentate dal Ministero e dal Centro di Referenza (N.Arrigoni) alle Associazioni di produttori, presso la sede del Ministero della Salute, a Roma, in data 5 Dicembre 2012.

Successivamente il CRN (N.Arrigoni) ha nuovamente presentato le linee guida alle Associazioni di produttori, in una riunione organizzata presso la sede di Confagricoltura, a Roma, in supporto al Ministero della Salute.

In data 19 marzo 2013 le Linee guida sono state sottoposte dal Ministero della Salute al Consiglio Superiore di Sanità (sezione IV) che ha espresso *parere favorevole*, pur con alcune raccomandazioni da tenere in considerazione nella stesura definitiva del documento; il documento è stato quindi modificato dal CRN conformemente alle raccomandazioni del Consiglio Superiore di Sanità.

In data 10 ottobre 2013 le Linee guida sono state presentate in Conferenza Stato Regioni a Roma, e sono state quindi approvate ed adottate nella seduta del 17 ottobre 2013, a cui il CRN (Dr. N.Arrigoni) ha presenziato in supporto al Ministero della Salute.

Viene riportata in allegato (allegato 1) l'ultima versione del Piano, approvato dalla Conferenza Stato regioni.

### ***3.b. Piano regionale di controllo e certificazione nei confronti della Paratubercolosi bovina in Regione Lombardia***

La Regione Lombardia ha anticipato la pubblicazione delle linee guida nazionali con l'approvazione di un Piano Regionale, pubblicato sul Bollettino Ufficiale Regione Lombardia del 24 luglio 2013.

Il "Piano regionale di controllo e certificazione nei confronti della Paratubercolosi bovina" (D.d.g.s 6845/2013) è rivolto a fornire indicazioni circa le modalità di certificazione del latte i cui derivati siano destinati all'esportazione verso paesi terzi ed è stato redatto secondo le indicazioni comprese nelle Linee guida proposte dal Centro di Referenza Nazionale per la Paratubercolosi e successivamente approvate in Conferenza Stato-Regioni.

### ***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 Emilia-Romagna, mediante test PCR sul latte di massa di ogni allevamento prelevato, contestualmente al campione per Brucellosi e Leucosi, da parte dei Servizi veterinari della Regione Emilia-Romagna. Il Piano aveva come obiettivo principale quello di definire la prevalenza delle aziende con latte di massa positivo (presenza di MAP nel latte rilevato mediante test qPCR) e di quantificare, ai fini dell'analisi del rischio, il numero di batteri presenti nei campioni positivi.

A fronte di una prevalenza apparente di aziende positive in ELISA dal latte di massa (= con almeno un controllo positivo su 3 eseguiti) del 14,5 %, in base ad una precedente indagine svolta nel 2011, si è rilevata una positività in PCR del 2,5%. Aumentando la sensibilità del test, tramite selezione di un valore di cut-off più inclusivo, si è raggiunta una positività del 5,5% (167/3052).

Con una metodica di quantificazione in qPCR, applicabile solo per un numero di batteri superiore a 10/ml, si è rilevato come la presenza di MAP sia quantificabile solo su 5 campioni positivi (range tra 10 e 100 batteri/ml). Di conseguenza, si può concludere che il livello di contaminazione del latte di massa da parte di MAP in regione Emilia-Romagna è molto basso. Considerando la capacità della pastorizzazione di abbattere di almeno  $4 \log_{10}$  il contenuto di MAP nel latte, il rischio di sopravvivenza nel latte pastorizzato appare limitato. L'elaborazione di questi dati ai fini dell'analisi del rischio mediante idonei modelli matematici è in corso.

E' inoltre in programma un approfondimento sulle aziende con latte di massa positivo per la verifica dei principali fattori di rischio ipotizzati (prevalenza animali infetti, igiene scadente).

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

Il CRN (N.Arrigoni) ha partecipato ad una riunione in data 7.3.2013 in cui si è stato affrontato il problema del passaggio dallo schema di certificazione delle province di Lodi e

Milano, adottato rispettivamente nel 2007 (det. n.113 del 23/04/2007) e nel 2008 (Det. n.20 del 02/04/2008), allo schema proposto dalle nuove linee guida proposte al Ministero della Salute dal CRN. Entrambi gli schemi prevedono test annuali, in base ai quali l'allevamento viene categorizzato in vari livelli, cui corrispondono livelli di garanzia crescente di assenza di infezione in allevamento, in funzione degli anni di test negativi. Il CRN ha elaborato una proposta di conversione che è stata adottata dalle ASL di Lodi e Milano.

### **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](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](http://www.izsler.it/pls/izs_bs/v3_s2ew_CONSULTAZIONE.mostra_pagina?id_pagina=508)).

I Manuali ed il loro utilizzo sono stati illustrati nel corso di vari interventi pubblici e sono stati inseriti nelle "Linee guida per l'adozione dei piani di controllo e per l'assegnazione di della qualifica sanitaria nei confronti della paratubercolosi".

## **4) aggiornamenti epidemiologici sulle materie di competenza**

### **4.a Raccolta di dati di diffusione di infezione sul territorio italiano**

E' stata predisposta dal CRN 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 IZZSS da parte del Ministero della Salute con relativa nota prot.0002873-P-15/2/2012. Nessuna regione ha inviato al CRN i dati con il format richiesto. Il Servizio Veterinario Provinciale di Trento ha inviato al CRN 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 al Servizio Veterinario di Trento entro alcuni giorni; i dati sono riassunti nella tabella seguente.

Alcune Regioni, direttamente o tramite gli IZZSS di riferimento, hanno inviato dati in forma aggregata. I dati sono riportati nella tabella seguente.

<b>Regione</b>	<b>Anno</b>	<b>Prevalenza apparente aziende</b>	<b>Prevalenza apparente animali</b>	<b>Metodologia</b>
Veneto	2002	64.6%	3.5%	ELISA individuale
Lombardia	2003-2005	43.7%	2.6%	
Lazio	2002	42.0%	2.5%	
Umbria e Marche	2008	52,81%	4,62%	
Trento	2012	17.7%	2.5%	
Piemonte	2007-2008	9.47%	N.D.	ELISA latte massa
Emilia-Romagna	2011-2012	14.5% (41.7% dei negativi erano positivi al test ELISA su 30 capi)	N.D.	

E' da rilevare che le prime 5 indagini mostrano una prevalenza di allevamenti infetti superiore perché la sensibilità della metodica di rilevazione adottata (ELISA su sangue individuale) è decisamente superiore rispetto a quella adottata nelle ultime due indagini, dove la metodica adottata (ELISA su latte di massa) consente la rilevazione solo degli allevamenti a prevalenza intra-aziendale medio-alta.

Le Regioni che, direttamente o tramite gli IZZSS di riferimento, hanno risposto che non hanno alcun dato disponibile sono:

- Puglia e Basilicata
- Sicilia

Tutte le altre Regioni non hanno risposto.

IL CRN ha trasmesso i dati raccolti al Ministero.

#### ***4 b Valutazione costo-beneficio dell'intervento (controllo e certificazione)***

Nell'anno in corso l'attività del CRN si è rivolta alla valutazione dei danni economici legati alla presenza di paratubercolosi negli allevamenti bovini.

In particolare, si è voluto valutare l'approccio costo-beneficio dell'applicazione di un piano di controllo e dell'applicazione di un piano di certificazione, facendo riferimento ai contenuti delle "Linee Guida per il controllo e la attribuzione della qualifica sanitaria nei confronti della Paratubercolosi", recentemente elaborate dal CRN per la Paratubercolosi su richiesta del Ministero della Salute. Le Linee Guida prevedono la segnalazione obbligatoria dei casi clinici di Paratubercolosi e l'adesione volontaria ad un sistema di classificazione del rischio, basato sugli esiti di esami sierologici eseguiti secondo protocolli codificati. Negli allevamenti negativi, l'allevatore può aderire al Piano di Certificazione, mentre, in caso di allevamenti infetti, può applicare un Piano di Controllo, basato sull'adozione di misure di biosicurezza e di opportuni test diagnostici. Sono stati analizzati i danni economici causati dalla Paratubercolosi ed è stata eseguita una analisi costo-beneficio rispettivamente di un Piano di Controllo e di Certificazione in una azienda tipo di 100 vacche, con produzione media annua di 90 qli. Relativamente al controllo, si è tenuto conto dei costi dei programmi diagnostici e della gestione sanitaria e dei benefici derivanti dalla riduzione dei danni economici causati dalla paratubercolosi. La simulazione prevede diverse situazioni di prevalenza iniziale dell'infezione e assume un azzeramento dei danni nel giro di 7 anni. Calcolando il delta tra i costi e i benefici per le tre situazioni di prevalenza, il delta è positivo per le aziende ad alta prevalenza (4.232,0 €/annuo); positivo, ma più ridotto, per le aziende a media prevalenza (1.029,7 €/annuo) ed è lievemente negativo per gli allevamenti a bassa prevalenza (-376,7 €/anno). Anche per la certificazione si è tenuto conto dei costi dei test diagnostici e della gestione sanitaria per il mantenimento dell'indennità e dei benefici ipotetici derivanti da un pagamento differenziato del latte e degli animali venduti. Dall'analisi risulta che la semplice applicazione di un premio di qualità variabile da 0,002 a 0,005 €/lt, sommato alla qualificazione commerciale dei capi venduti, porterebbe ad un vantaggio economico costante nel mantenimento della certificazione.

Tale ricerca è stata oggetto di una tesi della responsabile del Centro di Referenza Nazionale (N.Arrigoni) al un Corso di Formazione Manageriale per Direttore Responsabile di Struttura Complessa, sostenuta il 27 novembre 2012 presso la sede di Eupolis Lombardia (SDS, Scuola di direzione in sanità) ed è stata adattata per la pubblicazione su una rivista scientifica nazionale (vedi pubblicazioni).

## 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 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: G.Bolzoni). La ricerca ha avuto inizio il 1.10.2011 ed è terminata il 30.12.2012. I risultati del progetto, relativamente ad 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, sono stati illustrati al XIV Congresso Nazionale SIDiLV (Sorrento, 24-26 ottobre 2012) e alla giornata IZSLER per la presentazione dei risultati delle ricerche correnti (Brescia, 29 novembre 2012);
- Progetto di ricerca corrente IZS LE 2011/012: "Paratubercolosi nella fauna selvatica: approfondimenti diagnostici ed epidemiologici" (Responsabile scientifico: N.Arrigoni). Il progetto ha avuto inizio il 01.09.2012 e terminerà il 31.08.2014. È iniziato il piano di campionamento sul territorio di competenza IZSLER. Sono stati analizzati 215 campioni di intestini di ruminanti selvatici, 46 campioni di feci, e 860 campioni di siero. I livelli di positività sono elevati in PCR dai tessuti (27,9%), mentre sono molto limitati per i test sierologici ELISA (<1%). Allo scopo di confrontare e migliorare le tecniche diagnostiche sierologiche, è stata realizzata una sieroteca (da implementare nel corso del secondo anno di attività) composta da 37 campioni di siero di varie specie selvatiche (cervo, muflone, capriolo, camoscio), con stato di infezione accertato mediante PCR e/o AGID, da utilizzare per la valutazione in parallelo di kit sierologici ELISA. Dato che le metodiche colturali sono risultate positive solo nel 24% dei campioni positivi al test PCR, sono state introdotte alcune tecniche sperimentali per il miglioramento della loro sensibilità, tramite metodiche per centrifugazione e metodiche semi-automatizzate in terreno liquido (sistema VersaTrek);
- 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: 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 3 ceppi di MAP (1 ceppo ATCC e 2 ceppi di campo con caratteristiche genetiche diverse), da utilizzare nelle prove di challenge, da eseguire nel 2° anno di attività.

Il CRN è inoltre coinvolto nei seguenti Progetti di Ricerca Corrente di altri IIZZSS, 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: P. Mazzone). Il progetto è iniziato il 1.8.2011 ed è terminato il 31.7.2013. I risultati depongono per una sopravvivenza di MAP ai processi di produzione di biogas, seppure in concentrazione decrescente durante tutte le fasi del processo. I risultati sono stati presentati al XIV Congresso Nazionale SiDiLV (Sorrento 24-26 ottobre 2012), al Congresso nazionale della Società italiana di Buiatria (Piacenza, 18-20 aprile 2013) ed al 16th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (WAVLD) (Berlino, 5-8 giugno 2013).
- Progetto di ricerca corrente IZS VE 2010/102: “Fibrogenesi ed infiammazione nella paratubercolosi bovina: interazioni ospite-patogeno” (Responsabile scientifico: N. 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: P. 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.
- Progetto di ricerca corrente IZS PLV 2008/106: “Approccio multitask finalizzato al controllo dell'infezione da *M. avium* subsp. *paratuberculosis*: valutazioni sull'efficacia diagnostica di un protocollo integrato e analisi dei fattori genetici di resistenza alla malattia” (Resp. Scientifico: M. Gorla). Il progetto è iniziato il 31/10/2009 ed è stato prolungato al 30.6.2013. I risultati sono in corso di elaborazione. Il CRN (N. Arrigoni) ha partecipato ad una riunione presso l'IZS di Torino, il 21.3.2013, per una prima valutazione dei risultati. Tali risultati, relativi ai protocolli diagnostici post mortem utilizzati e ai risultati della tipizzazione dei ceppi di MAP, saranno presentati al congresso SiDiLV 2013.

### **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: L. Sechi).

Le Unità Operative coinvolte sono:

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

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

Durante i primi mesi di attività sono state messe a punto le metodiche PCR semi-quantitative 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.

E' stato realizzato uno studio di contaminazione mediante qPCR sul latte di massa delle oltre 3000 aziende da latte della regione Emilia Romagna, in base al quale la contaminazione del latte è risultata molto limitata.

E' stato pianificato un campionamento da uno stabilimento di produzione di carne macinata, da realizzare in un periodo di tempo di 6 mesi circa, per un totale di circa 200 campioni.

E' stato messo a punto un metodo innovativo per la distinzione di forme vitali e non vitali di MAP all'interno della matrice latte, mediante una metodica di separazione magnetica seguita da trattamento con propidium monoazide.

I primi risultati del progetto sono stati presentati al 16th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (WAVLD) (Berlino, 5-8 Giugno 2013).

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

- E' terminata il 30.6.2013 una ricerca 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 un'indagine, mediante qPCR, sulla presenza di MAP nel latte di massa e, in parallelo, sui filtri di mungitura di aziende bovine appartenenti a 3 diverse regioni italiane. Su un campione di aziende è stata eseguita un'indagine individuale in ELISA per la valutazione della sensibilità delle metodiche precedenti. E' in corso l'elaborazione dei dati per la stesura di alcuni paper scientifici da presentare su riviste impattate.
- Continua la collaborazione con il Parco Tecnologico Padano, con uno studio sulla resistenza genetica del bovino nei confronti dell'infezione Paratubercolare e di correlazione della virulenza dei ceppi con le loro caratteristiche genotipiche. Nell'anno in corso sono stati inviati al Parco tecnologico Padano 60 ceppi di MAP, completi di dati anamnestici.

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

- In Regione Emilia Romagna è stato avviato un progetto sperimentale, in collaborazione con i Servizi veterinari e il CEREV (IZSLER), per la valutazione dei danni economici della paratuberculosis, legato sia alla presenza dei casi clinici che subclinici. Sono stati selezionati alcuni allevamenti, in cui sono stati campionati animali di età superiore a 36 mesi per essere sottoposti ai test diagnostici (sierologia ELISA e/o coltura).

Sono stati confrontati i dati di mortalità e di riforma tra aziende con positività sierologica per paratuberculosis (casi) e aziende sieronegative (controlli). E' importante sottolineare che le aziende controllo non sono aziende sicuramente libere da paratuberculosis, ma aziende nelle quali, in base alla sensibilità del test e all'età dei capi sottoposti a campionamento, la paratuberculosis ha prevalenza reale inferiore al 10% (CI 85%).

Nello studio sono stati confrontati i dati relativi a capi con stato sanitario sconosciuto, ma appartenenti ad aziende con e senza sieropositività per paratuberculosis, rilevando comunque differenze tra il numero di capi riformati per anno e l'età al momento dell'invio al macello. E' possibile che tali differenze siano in parte legate al management aziendale, ma comunque le differenze rilevate per queste variabili sono risultate significative. Nella nostra indagine la maggior voce di perdita di profitto registrata tra aziende caso e aziende controllo è relativa alla perdita di produzione latte legata alla minore vita produttiva degli animali.

Complessivamente nelle aziende sieropositive i maggiori costi stimati rapportati a 100 vacche allevate / anno sono risultati pari a 25430 €, corrispondenti ad un minore guadagno di circa 250 € per vacca allevata ogni anno. Questi dati indicano che la presenza di capi sieropositivi per paratuberculosis in azienda è associata alla presenza di un importante danno economico e depongono a favore dell'applicazione di un piano aziendale di controllo della malattia che nel medio periodo permetterebbe un recupero di redditività dell'azienda.

## Aggiornamento e formazione professionale

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

- Il CRN (N.Arrigoni) ha partecipato come docente al corso di aggiornamento “La paratubercolosi: aspetti epidemiologici e piano di controllo nell’allevamento”, organizzato da Azienda USL di Ferrara, a Ferrara, l’11.10.2012, con 2 relazioni dal titolo: “Inquadramento eziologico, patogenetico, clinico-anatomopatologico, diagnostico ed epidemiologico della paratubercolosi” e “Valutazione dei costi zootecnici e rischi in sanità pubblica; piani di controllo della paratubercolosi”;
- Il CRN (N.Arrigoni) ha partecipato come docente al Corso di aggiornamento ECM per veterinari: “Nuove normative, patologie emergenti e strategie d’intervento per gli animali da reddito” con una relazione dal titolo “Paratubercolosi: come contrastarla?”, organizzato dall’Ordine dei Veterinari di Lodi, a Lodi il 12.11.2012;
- Il CRN (C.Garbarino) ha partecipato come docente al Corso di aggiornamento per veterinari e allevatori dal titolo “La paratubercolosi ovi-caprina”, organizzato dall’Istituto Agrario S.Michele all’Adige (TN) in collaborazione con l’IZS Venezia, presso la Federazione Provinciale Allevatori di Trento, a Trento, il 10.12.2012;
- Il CRN (N.Arrigoni) ha partecipato come docente al corso ECM per personale tecnico IZSLER: “Paratubercolosi: introduzione alla patologia, aspetti diagnostici in laboratorio, controllo della malattia in allevamento e linee guida piano nazionale”, organizzato dall’IZSLER a Brescia, il 11.2.2013, con tre relazioni dai titoli: “Strumenti diagnostici: utilizzo ed interpretazione”, “Piano di gestione salitaria nell’allevamento bovino da latte e da carne: strumenti e metodi”, e “Paratubercolosi come possibile zoonosi a aspetti di sicurezza alimentare”;
- Il CRN (N.Arrigoni, C.Garbarino) ha partecipato, in collaborazione con il CEREV (Centro Epidemiologico Regione Emilia Romagna, M.Tamba) alla realizzazione del corso per veterinari ASL e IZS dal titolo “Formazione sul campo per lo sviluppo di competenze in epidemiologia veterinaria”, finalizzato a fornire le basi per la conduzione di studi epidemiologici, con particolare riferimento agli studi caso-controllo per la paratubercolosi. Combinando l’attività di formazione di 3 giornate svolta in aula presso l’IZS di Bologna (10.1.2013, 28.2.2013, 23.5.2013) e l’attività di ricerca svolta in campo e in autoformazione (studio e lavoro individuale), i partecipanti al corso hanno approfondito le loro conoscenze e competenze nel campo della Epidemiologia Veterinaria. Per dare massima applicazione alle tecniche apprese durante le lezioni frontali, infatti, ai discenti è stata proposta l’attuazione di uno specifico Progetto di ricerca sulla valutazione dell’impatto sui parametri produttivi della Paratubercolosi nell’allevamento bovino da latte. Durante il corso, infatti i discenti hanno individuato ciascuno 2-3 allevamenti bovini da latte nei quali:
  - somministrare questionari
  - effettuare controlli diagnostici (sierologici)
  - selezionare casi e controlli

- raccogliere dati sanitari e produttivi sia direttamente che utilizzando banche dati informatizzate
- elaborare i dati raccolti per evidenziare eventuali differenze tra i parametri produttivi e sanitari tra le aziende/capi positivi e quelli negativi.

Relativamente ai risultati raggiunti, tutti i discenti hanno partecipato alle attività di aula e in campo mostrando interesse all'argomento trattato e collaborando fattivamente per il raggiungimento degli obiettivi previsti.

Al termine del corso i discenti hanno acquisito:

- capacità di condurre studi caso controllo
  - capacità di individuare i principali bias ed errori che possono rendere non validi i risultati di uno studio
  - nozioni tecniche per favorire l'applicazione di un piano aziendale di controllo della paratubercolosi.
- Il CRN (N.Arrigoni) ha partecipato come docente al Seminario organizzato nell'ambito del progetto EPISUD su iniziativa del Parco Tecnologico Padano, il giorno 26/03/2013 intitolato "Ruolo ed attività del Centro di riferimento per la paratubercolosi dell'Istituto Zooprofilattico di Piacenza: eziopatogenesi, epidemiologia, aspetti diagnostici e di sicurezza alimentare, controllo e certificazione nei confronti dell'infezione paratubercolare negli allevamenti";
  - Il CRN (N.Arrigoni), in qualità di responsabile scientifico, ha coordinato la realizzazione del Corso FAD "La paratubercolosi", in collaborazione con il Centro di Riferenza nazionale per la Formazione (IZSLER). Tale corso, gratuito e destinato sia a veterinari che a biologi, è stato reso disponibile da agosto 2013 sul sito [www.formazioneveterinaria.it](http://www.formazioneveterinaria.it). Il corso è mirato alla formazione dei veterinari aziendali di fiducia e pubblici sul problema paratubercolosi, partendo dalle conoscenze di base sulla malattia (modalità di trasmissione, situazione epidemiologica sul territorio nazionale), per arrivare all'utilizzo degli strumenti messi a disposizione dal Centro di Riferenza Nazionale per il controllo dell'infezione (test diagnostici, piani di biosicurezza). Il fine è quello di formare i veterinari pubblici e privati, affinché gli stessi possano svolgere al meglio il ruolo previsto nell'ambito delle Linee Guida nazionali per la paratubercolosi, che vengono anch'esse illustrate all'interno del FAD.
- Nell'ambito di tale corso sono stati illustrati tutti gli aspetti relativi alla paratubercolosi, utilizzando docenti tutti appartenenti all'IZSLER. In particolare gli aspetti trattati ed il relativo docente sono di seguito riportati:
- Danni economici e situazione epidemiologica (M.Tamba);
  - Patogenesi, clinica e anatomia patologica (M.Luini);
  - Strumenti diagnostici: utilizzo ed interpretazione (A.Santi);
  - Piano di gestione sanitaria nell'allevamento bovino da latte e da carne: strumenti e metodi (N.Arrigoni);
  - Paratubercolosi nei piccoli ruminanti e nelle specie selvatiche (C.Garbarino);

- Paratubercolosi come possibile zoonosi e aspetti di sicurezza alimentare (S.Pongolini);
- Proposta di Linee guida di intervento (M.Tamba).

Per ogni argomento è stata realizzata, oltre alla presentazione con voce narrante dei vari argomenti, una relazione scritta che è stata resa disponibile sullo stesso sito.

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

- IL CRN (M.Ricchi) ha presentato (presentazione orale) il lavoro “Ricerca di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vitale mediante cattura peptidomagnetica e trattamento con propidium monoazide in campioni di latte” (Autori: De Cicco C, Ricchi M, Garbarino CA, Cammi G e Arrigoni N) alla Giornata della Ricerca IZSLER – Brescia, 29 novembre 2012;
- Il CRN (N.Arrigoni) ha partecipato al Workshop “From John’s disease to Croh’s disease: still more question than answers”, organizzato da Hochschule Hannover, ad Hannover, nei giorni 12-13 marzo 2013;
- Il CRN (M.Ricchi) ha partecipato al 16th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (WAVLD) (Berlino, 5-8 giugno 2013), presentando (sotto forma di poster) un lavoro dal titolo: “Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk samples by magnetic-peptide separation followed by quantitative PCR after PMA treatment” (Autori: De Cicco C, Arrigoni N, Cerutti G, Garbarino C, Cammi G, Ricchi M);
- IL CRN (M.Ricchi) ha partecipato al LXVII Convegno Nazionale SISVet (Brescia), 17-19 settembre 2013, presentando (sotto forma di poster) un lavoro dal titolo: “Survey on tank milk contamination by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Emilia-Romagna region” (Autori: Savi R, De Cicco C, Ricchi M, Pongolini S, Licata E, Tamba M, Panella G, Cerutti G, Cammi G, Arrigoni N);
- Il CRN sta organizzando, su incarico dell’International Association for Paratuberculosis, il 12° International Colloquium on Paratuberculosis, che si svolgerà a Parma, dal 22 al 26 giugno 2014.

Fino ad oggi sono stati realizzati:

- il sito del convegno ([www.icp2014.eu](http://www.icp2014.eu)), aggiornato con i dati del Comitato organizzatore e del Comitato scientifico;
- la casella mail del convegno ([info@icp2015.eu](mailto:info@icp2015.eu));
- la formalizzazione del Patrocinio ricevuto da Regione Emilia-Romagna, Comune di Parma, Provincia di Parma, Università degli Studi di Parma, Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche;
- il budget preventivo del convegno approvato dal Board della International Association for Paratuberculosis;
- la definizione del programma scientifico, con i nomi degli “invited speakers” e dei “review and perspective speakers”;
- le deadlines e le regole per la presentazione degli abstract e dei full papers;
- la policy per gli sponsor;

- la formalizzazione del contratto con il Centro Congressi di Parma per ospitare l'evento.

Nel periodo di riferimento sono state realizzate due riunioni del Comitato Organizzatore Locale, a Parma il 11.12.2012 e il 26.9.2013, in cui sono stati affidati incarichi organizzativi ai vari componenti del Comitato.

**1) 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 e la sede di Confagricoltura, in data rispettivamente 5 dicembre 2012 e 13 febbraio 2013, a cui il CRN (N.Arrigoni) ha partecipato in supporto al Ministero della Salute, per presentare e discutere la proposta di Linea Guida nazionale alle Associazioni di Produttori.
- Gruppo di lavoro della Regione Emilia-Romagna sulla Paratubercolosi, per la revisione critica delle Linea Guida nazionali e per la realizzazione di un piano di intervento regionale nei confronti della paratubercolosi (N.Arrigoni, M.Tamba);
- Gruppo di lavoro della Regione Lombardia sulla Paratubercolosi, per la revisione critica delle Linea Guida nazionali e per la realizzazione di un piano di intervento regionale nei confronti della paratubercolosi, riunitosi a Milano presso la sede della regione Lombardia il 12.10.2012, a cui il CRN ha partecipato (N.Arrigoni) in supporto della Regione Lombardia;
- Comitato tecnico previsto dal Programma volontario di Certificazione per la Paratubercolosi bovina nella province di Lodi e Milano, riunitosi a Lodi il 7.3.2013 (N.Arrigoni) per la definizione degli opportuni passaggi dal Piano locale al Piano nazionale;
- Gruppo di lavoro inter-regionale per l'esportazione di formaggi DOP, di cui fanno parte i Servizi Veterinari delle Regioni, Assolatte e i vari Consorzi di tutela dei formaggi DOP, con 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 svolto le seguenti attività:

- 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%;

- partecipato alla stesura del protocollo di sperimentazione per valutare la dinamica di comportamento di MAP durante la produzione di Grana Padano DOP e Parmigiano Reggiano DOP;
- messo a punto e valutato l'utilizzo di terreni selettivi (HEY-PM-PPN, HEY-ANV) per l'isolamento MAP da matrici casearie, con particolare riferimento alle caratteristiche delle matrici (formaggio, cagliata, siero).

## **Consulenze, attività di docenza, collaborazioni nazionali**

### **1) Consulenze richieste ad esterni**

E' stato stipulato un accordo di collaborazione scientifica con il Veterinary Research Institute di Brno (Czech Republic), sede del laboratorio di riferimento OIE per la paratubercolosi, allo scopo di migliorare le conoscenze sulla diagnostica, sviluppando metodiche innovative e svolgere l'attività di training reciproco nell'ambito dello sviluppo di attività di ricerca.

### **2) Consulenze e pareri tecnici forniti ad esterni**

E' stato formulato un parere tecnico-scientifico ufficiale su richiesta della Regione Lombardia, relativamente alla proposta di Piano Regionale di intervento nei confronti della paratubercolosi. Il parere tecnico, formulato dal responsabile del CRN (N.Arrigoni) in data 5.6.2013, è stato favorevole, pur con alcune raccomandazioni (vedi allegato 2).

Presso il CRN sono stati svolti stage formativi per i seguenti Enti:

- Parco Tecnologico Padano: I. Della Noce, il giorno 05.09.2013, ha frequentato i laboratori del CRN per l'approfondimento di metodiche alternative alla coltura per la determinazione della vitalità batterica (tutor M.Ricchi);
- Parco Tecnologico Padano: F.Palazzo, il giorno 12.6.2013, ha frequentati i laboratori del CRN per apprendere le metodiche sierologiche ELISA (tutor C.Garbarino);
- Università degli Studi di Pisa: A.Galiero, dal 15 al 19.04.2013, ha frequentato i laboratori del CRN per approfondire le metodiche colturali e PCR per la ricerca di MAP da varie matrici (tutor M.Ricchi).

Al CRN sono afferite numerose richieste telefoniche o via posta elettronica, da parte di altri IZZSS, 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 CRN ha organizzato o a cui ha partecipato, Convegni/congressi che il CRN 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". In data 23-24 maggio 2013 il CRN (C.Garbarino e M.Ricchi) hanno partecipato all'incontro EMIDA a Verona "Mycobactodiagnosis".  
In particolare il CRN, in associazione con il Centro di referenza per la tubercolosi ha avuto il compito di definire i criteri per la raccolta di campioni di siero provenienti da animali infetti e indenni da paratubercolosi e di partecipare alla raccolta dei medesimi, fornendo i relativi dati di anamnesi (stato sanitario dell'allevamento di origine nei confronti di tubercolosi e paratubercolosi, specie dell'animale, età, segni clinici, test sierologico utilizzato, esito al test sierologico, lesioni, esito isolamento e/o PCR da feci). Al momento sono stati raccolti 210 sieri, di cui 64 positivi (63 bovino uno capra) e 146 negativi, da utilizzare nella validazione di metodiche diagnostiche innovative.
- E' stato stipulato un accordo di collaborazione scientifica con il Veterinary Research Institute di Brno (Czech Republic), sede del laboratorio di riferimento OIE per la paratubercolosi, per migliorare le conoscenze sulla diagnostica, sviluppando metodiche innovative, e svolgere attività di training reciproco nell'ambito di attività di ricerca.

### **Consulenze e collaborazioni internazionali**

- E' stato approvato un progetto presentato da parte di una veterinaria statunitense, J.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 avrà durata di 4 mesi e verrà attivato in febbraio 2014, con frequenza di J.McDonald presso i laboratori del CRN.

## **Pubblicazioni scientifiche e divulgative**

Vedi All. 3 (copia del frontespizio).

1. Minozzi G, Williams JL, Stella A, Strozzi F, Luini M, Settles ML, Taylor JF, Whitlock RH, Zanella R, Neibergs HL Meta-analysis of two genome-wide association studies of bovine paratuberculosis. . PLoS One. 2012;7(3):e32578. doi: 0.1371/journal.pone.0032578. Epub 2012 Mar 2.
2. Grittini A, Arrigoni N, Moraschina E, Tamba M (2012): Risultati di un progetto innovativo nella ASL Milano 1. Argomenti, 2, anno XV, ottobre 2012, 75-80.
3. De Cicco C, Ricchi M, Garbarino C, Cammi G, Arrigoni N (2012): Ricerca di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vitale mediante cattura peptido-magnetica e trattamento con Propidium monoazide in campioni di latte. XIV Congresso Nazionale SIDiLV : 24 - 26 Ottobre 2012, Sorrento (NA), 75-77.
4. Mazzone P, Corneli S, Ciullo M, Maresca C, Scoccia E, Sensi M, Papa P, Costarelli S, Caporali A, Fumanti P, Curina G, Scotoni R, Marconi R, Arrigoni N (2012): Valutazione della presenza di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in reflui zootecnici utilizzati per la produzione di biogas: dati preliminari. XIV Congresso Nazionale Societa' Italiana Diagnostica di Laboratorio Veterinaria (SIDiLV) : 24 - 26 Ottobre 2012, Sorrento (NA), 385-387.
5. Arrigoni N, Ricchi M, Panella G, Cammi G, De Cicco C, Garbarino C, Savi R, Mazzone P (2013): Sopravvivenza di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) nel digestato in uscita da un impianto per la produzione di biogas. Journal of the Italian Association for Buiatrics. 8, n.2, 5-12.
6. Mazzone P, Corneli S, Maresca C, Scoccia E, Biagetti M, Ciullo M, Papa P, Sensi M, Pezzotti G, Ricchi M, Arrigoni N (2013): *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* survival in biogas plants: preliminary results, Proc. 16th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (WAVLD), Berlino, June 5-8, 2013, p.283.
7. De Cicco C, Arrigoni N, Cerutti G, Garbarino C, Cammi G, Ricchi M (2013): Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk samples by magnetic-peptide separation followed by quantitative PCR after PMA treatment. Proc. 16th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (WAVLD), Berlino, June 5-8, 2013, p.328-329.
8. Marchetti G., Ricchi M, Serraino A, Giacometti F, Bonfante E, Arrigoni N (2013): Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and dairy cattle in southern Italy: preliminary results, Italian Journal of food safety, 2:e35, 124-127.
9. Fiasconaro M, Garbarino C, Ricchi M, Cammi G, Spuria L, Di Marco V, Arrigoni N.(2013): Paratubercolosi ovi-caprina: approccio alla diagnosi e al controllo, Atti XX Congresso Nazionale SIPAOC, Siracusa, 26-29 settembre 2013.

Sono inoltre stati inviati a riviste scientifiche per la eventuale pubblicazione i seguenti lavori:

- “Piano di controllo e certificazione per la Paratubercolosi bovina: criteri e analisi costo-beneficio” (Autori: Luini M, Foglia E, Andreoli G, Tamba M, Arrigoni N), in collaborazione con l’Università Carlo Cattaneo-LIUC (Castellanza), inviato alla rivista Large Animal Review. Il lavoro è stato accettato e verrà pubblicato nell’ultimo numero del 2013.
- “Identification of immunoreactive proteins of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*” (Autori: Piras C, Soggiu A, Bonizzi L, Greco V, Ricchi M, Arrigoni N, Bassols A, Urbani A, Roncada P), in collaborazione con Università degli studi di Milano, Fondazione Santa Lucia (IRCCS, Roma), Dipartimento di Medicina Sperimentale e Chirurgia, Università degli Studi di Roma “Tor Vergata”, Universitat Autònoma de Barcelona (Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Spain) e Istituto Sperimentale Italiano L. Spallanzani (Milano, Italy). Il lavoro è stato inviato alla rivista Journal of Proteome Research ed è attualmente in corso di valutazione.
- “Evaluation of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk using peptide-mediated separation and Propidium Monoazide” (Autori: De Cicco C, Arrigoni N, Kralik P, Babak V, Boniotti MB, Savi R, Cerutti G, Cammi G, Garbarino C and Ricchi M), in collaborazione con Veterinary Research Institute (Brno, Czech Republic). Il lavoro è stato inviato alla rivista International Journal of Food Microbiology ed è attualmente in corso di valutazione.

## **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, di cui si sta realizzando un aggiornamento con le nuove linee guida nazionali.

Nell'anno in corso è stata inoltre implementata la piattaforma interattiva con cui vengono gestiti i ring test (proficiency test) organizzati dal CRN, ai fini dell'utilizzo, nell'anno in corso, nella gestione del ring test per la diagnosi diretta di paratubercolosi mediante coltura e/o PCR.