



## **RELAZIONE ANNUALE**

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

(Periodo: dal 1.10.2013 al 30.09.2014)

## Centro di Referenza Nazionale (CRN) Paratubercolosi Relazione sulla attività svolta dal 01.10.2013 al 30.09.2014

### Attività Diagnostica

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

Nel corso dell'anno di attività si è proceduto:

- alla *validazione* dei seguenti metodi di prova, in accordo con le procedure generali del nostro istituto:
  - Identificazione dei ceppi isolati in coltura mediante F57-qPCR, con cui si prevede di sostituire l'attuale MP interno basato su IS900-PCR, considerato meno specifico rispetto al target F57;
  - Coltura da feci secondo il Metodo di prova normato OIE, per centrifugazione, con cui si prevede di sostituire l'attuale MP interno per sedimentazione (MP09/079).
- alla *revisione* del 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.6 del 6.12.2013).

I seguenti metodi sono in corso di sviluppo o validazione:

- Metodo colturale per la ricerca di MAP da formaggi mediante centrifugazione ed utilizzo di terreni solidi sperimentali (Herrold Egg Yolk con aggiunta di mycobactin, sodio piruvato, Penicillina, PANTA e nisina);
- Metodo per la ricerca di MAP da latte e derivati mediante qPCR, previa immunocattura con peptidi specifici. Sono disponibili dati preliminari per la determinazione del Limite di Rilevabilità (LOD) su latte e derivati (Robiola, Pecorino e Parmigiano Reggiano). Le prove di riproducibilità sono in corso.
- Metodica PCR previa estrazione automatica da tessuti, in corso di valutazione, in parallelo con la metodica attualmente in uso (MP09/078). I risultati hanno mostrato una buona concordanza fra le due metodiche; inoltre, la metodica di estrazione automatizzata sembra diminuire il numero di campioni inibiti rispetto alla metodica in uso.

Nel mese di settembre 2013 è stato inoltre acquisito un sistema semi-automatico di coltura in terreno liquido (sistema VersaTrek), che presenta potenziali vantaggi rispetto alla coltura tradizionale su terreno solido (tempi di lettura più rapidi, maggiore probabilità di successo nell'isolamento di ceppi "di difficile coltivazione", lettura semi-automatizzata). Per valutarne le performances, sono state eseguite prove in parallelo con metodiche già in uso o in corso di validazione, in particolare:

- Ricerca di MAP da feci mediante metodica su VersaTrek, in parallelo alla metodica OIE su terreno solido, utilizzando campioni di feci artificialmente contaminati con ceppo ATCC 19698. I risultati sono stati sovrapponibili, con una sensibilità leggermente superiore per la metodica OIE.

- Ricerca di MAP da latte artificialmente contaminato mediante metodica su VersaTrek, in parallelo con la metodica classica in uso presso il CdR (coltura su terreno solido). L'analisi dei dati rileva che le due metodiche mostrano performances simili.
- Ricerca di MAP da tessuti mediante metodica su VersaTrek (da utilizzare sia in diagnostica che in alimenti), previa centrifugazione (Hokura, 2011). Sono stati prodotti i dati relativi al LOD (limit of detection) per la matrice carne macinata.
- Risulta ancora in corso di sviluppo la metodica colturale su VersaTrek per la ricerca di MAP da formaggi. E' in programma la determinazione del LOD della metodica su Parmigiano Reggiano. Sono incoraggianti i risultati di alcune prove preliminari, utilizzando terreno liquido all'uopo allestito contenente brodo Middlebrook 7H9 supplementato con mycobactin, tuorlo d'uovo, penicillina e Nisina.

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 **38.426 esami**, di cui:

Sierologici	36.637
Microbiologici	404
PCR	1.385

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.).

Il CRN riceve comunque materiale biologico (ceppi, feci, sieri) da vari IZZSS per la conferma diagnostica.

Da segnalare che, con l'adozione delle nuove linee guida sulla paratubercolosi (novembre 2013), il test PCR dalle feci degli animali sospetti clinici è diventato il test di conferma, ai fini della segnalazione dei casi clinici al Servizio Veterinario dell'ASL di competenza.

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

E' stato organizzato dal CRN un circuito interlaboratorio per la diagnosi sierologica (ELISA e/o AGID), su matrici siero di sangue e latte, a cui hanno aderito 39 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 30.09.2014; la scadenza prevista per l'inserimento dei risultati è il 25.10.2014.

Il CRN provvederà 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 del ring test è disponibile presso il CRN e sul sito IZSLER.

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

Il CRN ha partecipato a:

- 2 prove interlaboratorio (ottobre 2013, gennaio 2014), 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 2014), 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;**

A seguito dell'adozione delle Linee guida sulla paratubercolosi, il Ministero ha richiesto l'integrazione delle 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 realizzato, in collaborazione con il Ministero della Salute, le "*Linee guida per l'adozione di Piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria degli allevamenti nei confronti della paratubercolosi bovina*".

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.

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.

Le linee guida sono state pubblicate in Gazzetta Ufficiale il 19.11.2013 e sono state approvate dalle regioni Lombardia, Emilia-Romagna, Piemonte, Lazio, Toscana, Abruzzo, Campania, Sardegna e dalle Province autonome di Trento e Bolzano.

#### ***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.

La situazione in Lombardia, aggiornata a settembre 2014, è illustrata nella tabella seguente.

Asl	Allevamenti (Latte)	Allev. Aderenti al Piano	Allev. con Qualifica PTO Aderenti al Piano	Allev. con Qualifica PTO Non Aderenti al Piano	Allev. con Qualifica PTEX1	Allev. con Qualifica PT1	Allev. con Qualifica a PT2	Allev. con Qualifica a PT3	Allev. con Qualifica a PT4	Allev. con Qualifica a PT5
BERGAMO	774	243	11	545	234	5	0	0	0	0
BRESCIA	1369	965	17	388	953	41	0	0	0	0
COMO	211	37	0	139	60	5	14	0	0	0
CREMONA	825	679	27	144	624	17	35	0	0	0
LECCO	106	65	4	43	62	1	0	0	0	0
LODI	317	192	3	116	191	9	5	3	0	0
MANTOVA	1020	526	8	470	547	1	1	0	0	0
MILANO	2	2	0	0	2	0	0	0	0	0
MILANO 1	150	148	0	11	129	5	8	2	1	3
MILANO 2	138	112	3	30	88	19	6	0	0	0
MONZA E BRIANZA	33	27	0	1	33	0	0	0	0	1
PAVIA	110	106	2	17	104	0	0	0	0	0
SONDRIO	808	2	0	817	2	0	0	0	0	0
VARESE	99	43	1	28	57	5	15	1	0	0
VALLECAMONICA-SEBINO	520	12	0	504	12	0	0	0	0	0
<b>Totale</b>	<b>6482</b>	<b>3159</b>	<b>76</b>	<b>3253</b>	<b>3098</b>	<b>108</b>	<b>84</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>4</b>

Hanno aderito al Piano 3.159 allevamenti su 6.482 registrati in BDN, pari al 48,7%.

Di questi, 3.098 hanno raggiunto la qualifica PTEX (assenza di casi clinici a seguito di una visita clinica in allevamento e assenza di segnalazioni nei precedenti 12 mesi), pari al 98,0% degli allevamenti aderenti al Piano e al 47,8% del totale.

La qualifica PTEX1 è necessaria agli allevamenti conferenti latte per la trasformazione in prodotti destinati all'esportazione in Paesi che richiedono garanzie sanitarie nei confronti della paratubercolosi.

Al momento, 108 allevamenti hanno raggiunto la qualifica PT1 (allevamenti a basso rischio), 6 hanno ottenuto la qualifica PT2 (allevamento negativo) e 11 hanno avuto la qualifica di allevamento certificato (rispettivamente, 6 allevamenti PT3, 1 allevamento PT4 e 4 allevamenti PT5).

Tali allevamenti corrispondono a quelli, appartenenti alle province di Milano e Lodi, già precedentemente certificati in base al piano in atto presso queste province da alcuni anni. Le qualifiche preesistenti sono state fatte confluire nel nuovo piano, secondo uno schema di conversione elaborato dal CRN.

### ***3.c Piano regionale di controllo e assegnazione delle qualifiche sanitarie nei confronti della Paratubercolosi bovina in Regione Emilia Romagna***

La Regione Emilia-Romagna ha recepito le Linee guida approvate in Conferenza Stato-Regioni con la Delibera di Giunta n. 2100/2013, pubblicata sul Bollettino Ufficiale Regione Emilia-Romagna del 16 gennaio 2014.

Successivamente, con Determina del Responsabile del Servizio Veterinario e Igiene degli Alimenti n. 5302 del 16 aprile 2014, sono state date indicazioni operative ai servizi

Relazione annuale 2013-2014 Centro di Referenza Nazionale Paratubercolosi - Documento prodotto in originale informatico e firmato digitalmente ai sensi del "Codice dell'amministrazione digitale" (Decreto legislativo n.82/2005)

sull'applicazione del piano di controllo regionale. In tale atto era previsto che la Regione avrebbe chiesto a BDN l'assegnazione a tutte le aziende bovine con riproduttori della qualifica PT0 (Senza Casi clinici), lasciando ai Servizi Veterinari ASL il compito di aggiornare la qualifica. Nella tabella seguente è riportata la situazione delle qualifiche sanitarie registrate in BDN.

AUSL	Totale allevamenti	PTC Con Casi Clinici	PT0 Senza Casi Clinici	PT1 A Basso Rischio	PT2 Negativo
PIACENZA	751		751		
PARMA	1542		1541	1	
REGGIO EMILIA	1316		1297		19
MODENA	1063		1063		
BOLOGNA	544		543	1	
IMOLA	97		97		
FERRARA	94		94		
ROMAGNA-RAVENNA	167	1	166		
ROMAGNA-FORLI'	202		202		
ROMAGNA-CESENA	191		191		
ROMAGNA-RIMINI	185		185		
<b>Totale</b>	<b>6152</b>	<b>1</b>	<b>6130</b>	<b>2</b>	<b>19</b>

Fonte: BDN aggiornamento al 24/10/2014

### 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 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

Non sono pervenuti al Centro, nè risultano pubblicati, risultati di ulteriori indagini sulla diffusione della malattia nel patrimonio bovino nazionale. I dati riportati nella tabella seguente, raccolti nel corso dell'anno precedente, sono ancora quelli attualmente disponibili.

Regione	Anno	Prevalenza apparente aziende	Prevalenza apparente animali	Metodologia
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.

#### **4 b Dati sui focolai**

Le Linee Guida nazionali hanno stabilito che i casi clinici di Paratubercolosi Bovina debbano essere registrati in SIMAN. I dati relativi agli allevamenti con casi clinici registrati in SIMAN sono i seguenti:

Regione	Anno registrazione	
	2013	2014
Piemonte		3
Sardegna	1	2
Toscana		1
PA Trento		6
<b>Italia</b>	<b>1</b>	<b>12</b>

Fonte: SIMAN: Dati aggiornati al 20/10/2014

#### **4 c Valutazione costo-beneficio dell'intervento**

Continua l'attività del CRN rivolta alla valutazione dei danni economici legati alla presenza di paratubercolosi negli allevamenti bovini.

Nell'anno in corso, grazie alla collaborazione dei Servizi Veterinari Regionali e delle AAUUSLL della Regione Emilia Romagna, sono state valutate le perdite economiche legate alla presenza di paratubercolosi, comparando le performances degli allevamenti positivi (40 allevamenti caso) e negativi (46 allevamenti controllo), abbinati per dimensione e posizione geografica. Per gli allevamenti arruolati, sono stati estratti dalla BDN i dati delle bovine di età superiore a 24 mesi allevate nei 2 anni precedenti il controllo sierologico individuale. Complessivamente sono entrate nello studio 19.215 vacche, per lo più di razza Frisona. Negli allevamenti caso è stata rilevata una vita più breve delle vacche

Relazione annuale 2013-2014 Centro di Referenza Nazionale Paratubercolosi - Documento prodotto in originale informatico e firmato digitalmente ai sensi del "Codice dell'amministrazione digitale" (Decreto legislativo n.82/2005)

riformate (62,3 vs 64.5 mesi,  $p < 0,01$ ), un tasso di riforma più elevato (31.7% vs 27.3%,  $p = 0,02$ ) ed una mortalità più elevata (3,6% vs 2,6%,  $p = 0,07$ ) rispetto ai controlli. Complessivamente negli allevamenti infetti è stata stimata una perdita di oltre 200 €/vacca allevata/anno; il 60% del danno è legato alla minor durata della vita produttiva delle vacche riformate. Questo studio mostra che MAP è associato a perdite economiche significative che consigliano l'adozione di programmi aziendali di controllo finalizzati ad un recupero di redditività delle aziende. I risultati sono stati presentati al 12th International Colloquium on paratuberculosis (vedi pubblicazioni, 13, Tamba et al) e sono stati pubblicati (vedi pubblicazioni, 3, Tamba et al).

Sono inoltre stati pubblicati nell'anno in corso i risultati dell'analisi costo-beneficio dell'applicazione di un piano di controllo, in allevamenti infetti a diverso livello di prevalenza, e di un piano di certificazione in allevamenti negativi, facendo riferimento ai contenuti delle *"Linee Guida per il controllo e la attribuzione della qualifica sanitaria nei confronti della Paratuberculosis"* (Vedi pubblicazioni, 1, Luini et al).

## Ricerca e sperimentazione

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

### *Ricerca Corrente*

- 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 28.02.2015. E' stato realizzato il piano di campionamento (intestini di ruminanti selvatici, di feci, e campioni di siero) sul territorio di competenza IZSLER. Sono stati analizzati 760 campioni per la diagnosi diretta (290 tessuti da intestini o linfonodi e 470 feci) e 1.656 campioni di siero. I tessuti e le feci, esaminate mediante IS900 qPCR, hanno dimostrato una positività del 9%. I campioni risultati positivi alla qPCR sono stati esaminati in coltura, sia in terreno solido (HEYM) che liquido (Versa Trek). Sono stati isolati 10 ceppi di MAP, tutti da cervo, che sono stati successivamente tipizzati mediante mini- e micro-satelliti e sono risultati tutti appartenere al ceppo C, con lo stesso pattern biomolecolare. Nell'area del parco dello Stelvio, dove la popolazione di cervi è particolarmente densa, si è riscontrata una prevalenza di infezione particolarmente elevata. I livelli di positività sierologica risultano invece molto limitati (<1%), con entrambe le metodiche utilizzate (ELISA ed AGID). Allo scopo di confrontare e migliorare le tecniche diagnostiche sierologiche, è stata realizzata una sieroteca composta da oltre 200 campioni di siero di varie specie selvatiche (cervo, muflone, capriolo, camoscio). Al momento sono stati testati 5 kit ELISA in parallelo su un numero limitato (n=37) di campioni con stato di infezione accertato (PCR e/o coltura positive). Tutti i kit testati manifestavano la stessa sensibilità (5 positivi/37 testati), risultando positivi in generalmente in caso di infezione conclamata, cosa che suggerisce una scarsa sensibilità dei kit sugli animali con infezione subclinica. E' iniziata l'indagine in ruminanti domestici che condividono l'area di pascolo con animali positivi. Sono stati inoltre prelevati campioni ambientali (feci e acqua di fonte e pozze di abbeverata). I risultati parziali del progetto sono stati presentati al 12th International Colloquium on paratuberculosis (vedi pubblicazioni, 20, Garbarino et al.) e alla Conferenza della European Wildlife Disease Association, Edimburgo, 2014.
- 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 ed è terminato 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 stati raccolti i dati di processo su un campione rappresentativo di caseifici produttori di Parmigiano Reggiano. Sono quindi state eseguite, nelle condizioni più favorevoli tra quelle previste dai vari processi, le prove di challenge con diversi ceppi di MAP (1 ceppo ATCC e 3 ceppi di campo con caratteristiche genetiche diverse). Tali prove

hanno dimostrato come l'affioramento sia in grado di ridurre la concentrazione di MAP di 1 logaritmo circa. La cottura in caldaia non appare efficace nel ridurre la concentrazione di MAP, che invece sembra ridursi a partire dalla immissione in salamoia. L'elaborazione dei dati è in corso di completamento per la pubblicazione.

- Progetto di ricerca corrente IZS LE 2012/001: "Creazione di un sistema informativo integrato per la paratubercolosi" (Responsabile scientifico: N. Arrigoni). Il progetto ha avuto inizio il 1.10.2013 e avrà termine il 30.09.2015. L'obiettivo del progetto è creare un sistema informativo integrato per l'utilizzo nell'ambito dei piani di controllo (registrazione casi clinici e sieropositività all'interno di un database sanitario aziendale) e biosicurezza aziendali (valutazione del rischio di infezione per la realizzazione di piani di gestione sanitari), anche attraverso l'utilizzo di sistemi informatici da utilizzare in azienda. In questo ambito è stata realizzata un'applicazione da utilizzare su tablet, direttamente in azienda, per la valutazione del rischio di introduzione e diffusione dell'infezione paratubercolare negli allevamenti. Tale applicazione, presentata in occasione del 12th International Colloquium on paratuberculosis (vedi pubblicazioni, 11, McDonalds et al), verrà sperimentata in allevamento nel corso del secondo anno del progetto. Il progetto ha inoltre la finalità di verificare l'interesse degli allevatori nei confronti della paratubercolosi ed il livello di applicazione delle misure suggerite, fornendo nel contempo strumenti mirati per la formazione. A tale scopo sono state prodotte brochure informative per veterinari ed allevatori, distribuite in formato cartaceo e rese disponibili in formato informatico sul sito del Centro di riferimento ([http://www.izsler.it/izs\\_bs/allegati/450/brochure17\\_12\\_13B.pdf](http://www.izsler.it/izs_bs/allegati/450/brochure17_12_13B.pdf)allegato). Si sta realizzando inoltre, allo scopo di sensibilizzare e fornire le nozioni di base agli allevatori, un filmato didattico/divulgativo ed un programma di formazione online.

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 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 ed è terminato il 2.9.2014. L'IZSUM ha prodotto la Johnina a partire da ceppi di campo diffusi sul territorio nazionale e tipizzati con metodiche biomolecolari dal CRN. Il 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. I risultati delle prove eseguite sono stati presentati al 12th ICP (vedi pubblicazioni, 14, Mazzone P. et al).
- Progetto di ricerca corrente IZS VE 2010 102 "Fibrogenesi ed infiammazione nella paratubercolosi bovina: interazioni ospite-patogeno" (Responsabile scientifico: N. Pozzato). Il progetto è stato prorogato e terminerà il 28.2.2015.

- Progetto di ricerca corrente IZS UM 2012/103: "Valutazione della sopravvivenza di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) ai processi di trasformazione del latte ovino" (Responsabile scientifico: P. Mazzone). Il progetto è iniziato il 1.9.2013 ed avrà termine il 31.8.2013. E' stata avviata la coltivazione dei ceppi di campo e ATCC per procedere alle prove di challenge. Il CRN ha fornito consulenza ed ha inviato i protocolli sviluppati nell'ambito delle precedenti attività di ricerca.

### **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 ha avuto inizio il 2.12.2011 e terminerà il 1.12.2014.

Vengono di seguito riassunti i risultati più significativi del progetto, che sono stati presentati al 12th International Colloquium on paratuberculosis (vedi pubblicazioni ; 7, De Cicco et al; 24, Savi et al; 25, Cammi et al) o pubblicati su riviste con IF (vedi pubblicazioni, 4, Ricchi et al.) o sono ancora in corso di pubblicazione.

Sono state messe a punto le metodiche PCR semi-quantitative per la valutazione della contaminazione del latte di massa da parte di MAP, da utilizzare per valutare l'esposizione dell'uomo attraverso il consumo di latte. Le metodiche sono state utilizzate per un survey sul latte di massa di 3.052 aziende da latte della regione Emilia Romagna (90% delle aziende registrate). Sono risultate positive 167 aziende pari al 5,5%. Di queste, solo 12 campioni sono risultati quantificabili, con una stima della contaminazione variabile da 145 a 2.168 cellule di MAP/ml latte. Sulla base di questo dato, e di precedenti studi pubblicati, è stato costruito un modello matematico che ha stimato la concentrazione media di MAP nel latte prodotto in regione pari a 0.089 cellule MAP /ml.

E' stato realizzato un campionamento da uno stabilimento di produzione di carne macinata, in un periodo di tempo di 4 mesi circa, per un totale di circa 140 campioni, prelevati ognuno da un lotto di carne macinata, ognuno del peso di 12 q.li, proveniente dalla macellazione di 50-80 capi. Tali campioni sono stati analizzati mediante qPCR e coltura liquida in sistema Versa Trek. I risultati dimostrano la presenza di MAP in coltura in 2 campioni prelevati da due diversi lotti.

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.

- **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", sviluppato dal Dipartimento di Scienze mediche Veterinarie dell'Università degli Studi di Bologna, in collaborazione con il CRN, su commissione di Filiera di Alta Qualità, nell'ambito dei progetti di Contratto di Filiera.

Gli obiettivi primari della ricerca erano:

- valutare la prevalenza di infezione in un campione di aziende del sud Italia, afferenti a 4 industrie di produzione di latte alimentare. I risultati, sovrapponibili a precedenti indagini condotte in altre regioni italiane, sono stati pubblicati in un volumetto tematico (vedi pubblicazioni: 29, Serraino et al; 30, Marchetti et al).
- valutare l'efficacia di un piano di campionamento innovativo per l'individuazione delle aziende infette, da utilizzare eventualmente per un monitoraggio/sorveglianza su vasta scala. Tale schema era basato su 2 test qPCR sui filtri di mungitura e 2 test ELISA sul latte di massa di 569 allevamenti bovini appartenenti a 3 diverse regioni italiane, in parallelo alla sierologia individuale sul latte di tutte le bovine in mungitura. La sensibilità del programma diagnostico preposto è risultata correlata con la prevalenza aziendale di animali infetti ed è stata in grado di rilevare dal 56,25% degli allevamenti a bassa prevalenza ( $\leq 2\%$ ) fino al 100% degli allevamenti con una prevalenza aziendale  $\geq 8\%$ . Nel complesso il programma è stato in grado di rilevare l'85,57% di allevamenti con almeno un campione di latte individuale positivo. A fronte di un costo molto contenuto, il programma si è dimostrato quindi utile per identificare gli allevamenti con un rischio elevato di infezione e contaminazione del latte, anche se non può essere utilizzato per la certificazione di assenza di infezione. I dati sono stati presentati al 12th International Colloquium on paratuberculosis (vedi pubblicazioni: 19, Arrigoni et al) e pubblicati su riviste con IF (vedi pubblicazioni: 2, Serraino et al).
- stimare, sulla base dei dati raccolti, la contaminazione quantitativa del latte crudo da sottoporre a pastorizzazione e, sulla base dei dati bibliografici di abbattimento termico, effettuare una valutazione quantitativa del rischio di sopravvivenza di MAP, stimando la probabilità che nel latte in commercio siano presenti MAP vitali (vedi pubblicazioni: 6, Serraino et al; 28, Bonilauri et al).

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

Relazione annuale 2013-2014 Centro di Referenza Nazionale Paratubercolosi - Documento prodotto in originale informatico e firmato digitalmente ai sensi del "Codice dell'amministrazione digitale" (Decreto legislativo n.82/2005)

- Continua la collaborazione con il Parco Tecnologico Padano, con uno studio sulle caratteristiche genomiche di MAP, attraverso studi di NGS (Next generation Sequencing). Sono stati genotipizzati 15 ceppi di MAP isolati da diversi allevamenti localizzati in 6 province del nord Italia. I risultati preliminari hanno identificato meno varianti del previsto. I risultati sono stati presentati al 12 International Colloquium on Paratuberculosis (vedi pubblicazioni: 16, Della Noce et al).

## **Aggiornamento e formazione professionale**

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

- Il CRN (N.Arrigoni) ha realizzato (resp.scientifico: N.Arrigoni), in collaborazione con il Centro di Referenza nazionale per la Formazione (IZSLER), il Corso FAD “La paratuberculosis”.

Tale corso, gratuito ed aperto a veterinari e biologi, è stato reso disponibile ad agosto 2013 sul sito [www.formazioneveterinaria.it](http://www.formazioneveterinaria.it).

Il corso è mirato principalmente alla formazione dei veterinari aziendali e pubblici sul problema paratuberculosis, affinché gli stessi possano svolgere al meglio il ruolo previsto nell’ambito delle Linee Guida nazionali per la paratuberculosis, che vengono anch’esse illustrate all’interno del FAD.

Nell’ambito di tale corso, utilizzando docenti tutti appartenenti all’IZSLER, sono stati illustrati gli aspetti relativi alla paratuberculosis, 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);
- Paratuberculosis nei piccoli ruminanti e nelle specie selvatiche (C.Garbarino);
- Paratuberculosis 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.

Il corso è stato chiuso alla fine di novembre 2013 per aggiornamenti.

Nel periodo dicembre 2013-febbraio 2014 il corso FAD è stato aggiornato relativamente ai seguenti contenuti:

- è stata aggiornata la relazione del dr.Tamba, con la nuova versione delle linee guida nazionali pubblicate in G.U. il 19.11.2013;
- è stata inserita la traduzione (realizzata e registrata dalla Dr.Arrigoni) della presentazione del prof. M.Collins, Wisconsin University, tenuta in occasione del 6° Convegno nazionale sulla Paratuberculosis, organizzato dal CRN presso l’IZSLER, Brescia, il 28 novembre 2013.

Il corso è stato riaperto in Aprile 2014 ed è tuttora attivo.

- Il CRN (N.Arrigoni) ha partecipato come docente al corso di aggiornamento ECM sulla paratubercolosi, organizzato dall'ordine dei Medici Veterinari di Cuneo, a Cuneo, in data 18.10.2013;
- Il CRN (N.Arrigoni) ha svolto attività di docenza il 13.2.2014, nell'ambito di un seminario tematico dal titolo "Epidemiologia della paratubercolosi in Italia", presso la Scuola di specializzazione in Sanità animale, allevamento e produzioni zootecniche, della Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Pisa;
- CRN (N.Arrigoni) ha partecipato come docente a 3 giornate formative per allevatori e veterinari aziendali, organizzate in collaborazione con la ditta Parmalat e le AASSLL della Regione Lombardia, a:
  - Collecchio (PR), 18.3.2014
  - Zanica (BG), 27.3.2014
  - Como (CO), 27.3.2014
- Il CRN (N.Arrigoni) ha partecipato come docente al corso ECM "Aggiornamento sulla paratubercolosi, approfondimento piano nazionale", organizzato dall'Ordine dei Veterinari di Mantova, svoltosi a Mantova, il 11.4.2014;
- Il CRN (N.Arrigoni) ha partecipato come docente al corso ECM "Aggiornamento sulla paratubercolosi", organizzato dall'ASL di Como, a Como, il 18.4.2014;
- Il CRN (N.Arrigoni) ha partecipato come docente al corso di aggiornamento ECM "Paratubercolosi: aspetti sanitari, epidemiologici, diagnostici e normativi" organizzato dall'IZS della Sardegna, ad Oristano il 11 luglio 2014;
- Il CNR (M.Ricchi) ha svolto attività di docenza nell'ambito dell'evento formativo ECM "Caratterizzazione molecolare di batteri di interesse veterinario: varie esperienze in IZSLER", organizzato dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, a Modena, il 15 aprile 2014, con una relazione dal titolo: "Sub-typing dei ceppi di Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) isolati in Italia mediante analisi dei mini e micro-satelliti".

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

- Il CRN ha organizzato il **6° Congresso nazionale sulla Paratubercolosi** (Convegno ECM), a Brescia, il 28.11.2013 (Responsabile scientifico: N.Arrigoni, CRN).

### Programma:

8.30-9.00: Benvenuto (Ministero della Salute e Direzione IZSLER)  
 9.00-10.30: Overview sulla Paratuberculosis - M. Collins (Wisconsin University, USA)

Relazione annuale 2013-2014 Centro di Referenza Nazionale Paratuberculosis - Documento prodotto in originale informatico e firmato digitalmente ai sensi del "Codice dell'amministrazione digitale" (Decreto legislativo n.82/2005)

10:30-11:00:	Motivazioni per l'intervento e linee guida per il controllo e la certificazione – M.Tamba (IZSLER- CEREV BD)
11:00-11:30:	Valutazione costo-beneficio di un piano di intervento e certificazione -M.Luini (IZSLER LD)
11:30-12:00:	Risultati del monitoraggio sul latte di massa in Nord-Italia – M.Ricchi (IZSLER PC)
12:00-12:30:	Risultati del monitoraggio sul latte di massa in Centro e Sud Italia - A.Serraino (UNIBD)
12:30-13:30:	TAVOLA ROTONDA - Il punto di vista degli stakeholders (AIA, Coldiretti, Unione Agricoltori, Assolatte, FNOVI, SIB, SIVAR) - Interventi programmati (Moderatore: G.Penocchio)
14:30-15:00:	Attività e ricerche del Centro di referenza nazionale - N. Arrigoni (IZSLER CRN)
15:00-17:00:	Tavola rotonda: Attività e ricerche degli Istituti Zooprofilattici - Coordina N. Arrigoni (IZSLER CRN)
17:00-17:30:	Conclusioni e prospettive - L. Ruocco (Ministero Salute)

Il convegno ha fatto il punto della situazione, sia nel campo della sanità animale che in quello della sicurezza alimentare, fornendo ai veterinari pubblici e aziendali gli ultimi aggiornamenti per operare nell'ambito dei piani di intervento. A tale scopo sono stati illustrati gli strumenti messi a disposizione dal CRN per il controllo dell'infezione e per la certificazione delle aziende negative. Infine, durante la tavola rotonda, sono state presentate le opinioni dei portatori di interesse coinvolti nella problematica. Nel pomeriggio sono state presentate le attività del CRN e quindi i risultati dei progetti di ricerca degli Istituti Zooprofilattici su vari aspetti della problematica.



- Il CRN (M.Ricchi) ha partecipato come relatore alla giornata per la presentazione dei risultati delle ricerche correnti alla “Giornata delle ricerche IZSLER”, svoltasi a Brescia il 5.12.2013, con due relazioni dal titolo “Tipizzazione molecolare dei ceppi di MAP e sue applicazioni in epidemiologia molecolare” (PCR 2009/019) e “Formaggi a base di latte sottoposto a trattamento termico: valutazione della fosfatasi alcalina e delle sopravvivenza di MAP”(PRC 2011/016);
- Il CRN (N.Arrigoni) ha partecipato come docente al Convegno Internazionale (ECM), “Paratubercolosi: dalla normativa all’azienda. Il ruolo del veterinario”, organizzato da SIVAR, a Cremona, in data 9.5.2014;
- Il CRN (N.Arrigoni) ha organizzato, in collaborazione con EFSA e FIL-IDF il congresso internazionale “4th ParaTB Forum”, svoltosi a Parma, presso EFSA, il 21 giugno 2014. Il convegno, a cui ha partecipato il Ministero della Salute (Dr.L.Ruocco) ha preceduto l'apertura del 12° International Colloquium on

Paratuberculosis. Ricercatori provenienti da tutto il mondo hanno presentato i diversi approcci ed esperienze nell'ambito dei piani di controllo e certificazione attuati nei confronti di questa malattia, avviando un confronto utile per migliorare l'attività di sorveglianza e per facilitare gli scambi e le esportazioni di latte e formaggi. In questa occasione, il CRN (N.Arrigoni) ha presentato la situazione italiana (vedi pubblicazioni: 31, Arrigoni et al., "Bovine Paratuberculosis in Italy: national guidelines for the control of bovine paratuberculosis and for assessing the health ranking of the herds").

Gli strumenti di certificazione di cui si è ampiamente dibattuto assumono un ruolo centrale proprio in vista di Expo 2015, di fronte all'esigenza di supportare l'export di prodotti caseari, in particolare rivolti ai mercati asiatici.

Gli atti sono pubblicati sul sito della International Association for Paratuberculosis (<http://www.paratuberculosis.info/index.php?view=article&id=731>) e sono stati pubblicati dalla FIL-IDF su un numero speciale dedicato all'evento (Bulletin of the International Dairy Federation 475/2014).



- Il CRN ha organizzato il 12th International Colloquium on Paratuberculosis, svoltosi a Parma dal 22 al 26 giugno 2014 (Responsabile Comitato organizzatore: N.Arrigoni; Responsabile Comitato Scientifico: M.Ricchi). La candidatura di Parma, presentata durante il precedente congresso di Minneapolis (Minnesota, USA) era stata scelta dal Board of directors della International Association for Paratuberculosis, una commissione dei rappresentanti dei vari paesi, in cui la Dr.ssa Arrigoni rappresenta l'Italia. Il congresso si è svolto presso il Centro Congressi di Parma, ed ha visto la partecipazione di 324 studiosi, provenienti da 34 paesi appartenenti a tutti i continenti. Il programma scientifico era articolato in 7 sessioni scientifiche (Pathogenomics and MAP biology, Diagnostic and detection, MAP control programs, Host response and

immunology, Genotyping and MAP diversity, Epidemiology, Public health and MAP in the environment) che hanno affrontato tutte le problematiche inerenti questa patologia, dalla diagnostica, ai piani di controllo, alla salute pubblica. I lavori scientifici presentati dai vari ricercatori di tutto il mondo sono stati oltre 250, e in questo ambito il Centro di Referenza ha avuto un ruolo importante, con 18 contributi e 4 presentazioni orali sui vari aspetti della patologia. Gli atti del convegno sono già disponibili al link:

<http://www.paratuberculosis.info/index.php?view=article&id=731>



- Il CRN (C.Garbarino) ha partecipato alla Conferenza annuale della European Wildlife Diseases Association (EWDA Conference) tenutasi ad Edimburgo dal 25 al 29 agosto 2014, presentando un lavoro, in forma di poster (“Diagnostic tools for paratuberculosis in free ranging wild ruminants in endemic and sporadic areas”);
- Il CRN (C.Garbarino) ha partecipato in qualità di relatore, nell’ambito del XXI Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C. (12/09/2014, Foggia), alla tavola rotonda “Malattie infettive e parassitarie e il paradigma del One Health”, con una relazione dal titolo: “Paratubercolosi: un problema di sanità pubblica?” (vedi pubblicazioni: 5, Garbarino et al) ;
- Il CRN (N.Arrigoni) ha partecipato, in qualità di relatore, al Seminario Internazionale del XXIV Convegno AIVI (Associazione Italiana Veterinari Igienisti), dal titolo “Nuove frontiere della sicurezza alimentare”, organizzato a Bologna nei giorni 10-12 settembre 2014, con una relazione dal titolo “Paratubercolosi: un problema di sicurezza alimentare: Applicazione delle linee guida per l’adozione delle Linee guida per l’adozione dei piani di controllo e per l’assegnazione delle qualifiche sanitarie degli allevamenti nei confronti della paratubercolosi bovina” (vedi pubblicazioni: 27, Arrigoni et al).

### **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 la Conferenza Stato Regione il 10 ottobre 2014 in appoggio al Ministero della Salute, rappresentato dal Dr.L.Ruocco, per la presentazione e la discussione delle Linee Guida per il controllo e la assegnazione delle qualifiche sanitarie nei confronti della paratubercolosi, approvate dalla Conferenza Stato regioni il 19 ottobre 2014.
- 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); in data 29.10.2013 si è svolta una riunione presso l'IZS di Bologna per la presentazione delle linee guida nazionali alle Associazioni di produttori e trasformatori. E' stato inoltre realizzato un incontro in data 19.11.2013 per la presentazione del piano alle ASL. Il CRN (N.Arrigoni, M.Tamba) ha partecipato ad entrambi gli incontri in supporto alla Regione Emilia Romagna.
- Gruppo di lavoro della Regione Lombardia sulla Paratubercolosi, riunitosi a Milano presso la sede della regione Lombardia il 9.7.2014, a cui il CRN ha partecipato (N.Arrigoni, M.Tamba) in supporto ai Servizi Veterinari Regionali (Dr. L.Gemma) per la definizione del ruolo dell'Associazione Regionale Allevatori nell'ambito dei piani di autocontrollo svolti sui campioni di latte prelevati per i controlli funzionali;
- 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. In data 30.10.2013 e 6.12.2013 sono stati realizzati due sopralluoghi presso il caseificio sperimentale della azienda agro-forestale ERSAF, a cui ha partecipato il CRN (G.Cammi, G.Cerutti) per la programmazione della prova sperimentale di challenge. Tali prove sono state realizzate, alla presenza e con il coordinamento tecnico del CRN (G.Cammi, G.Cerutti) nei giorni 14 e 15 gennaio 2014.

## Consulenze, attività di docenza, collaborazioni nazionali

### 1) Consulenze richieste ad esterni

Nulla da segnalare.

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

- In data 23.12.2013 è stato formulato un parere tecnico-scientifico ufficiale su richiesta del Ministero della Salute, relativamente alla possibilità di registrazione in Italia di un vaccino per la paratubercolosi. Il parere è stato realizzato dal responsabile del CRN per la paratubercolosi (N. Arrigoni), in collaborazione con il responsabile del Centro di referenza nazionale per la tubercolosi (M.L. Pacciarini), date le possibili interferenze del vaccino con la diagnosi sia di tubercolosi e paratubercolosi. Data la presenza della tubercolosi, seppur in forma sporadica, in bovini, ovini e caprini del territorio, la situazione epidemiologica sconsiglia l'adozione di vaccini che possano complicare la corretta interpretazione diagnostica dei test (vedi allegato prot.26611 del 23.12.2013).
- In data 24.2.2014 è stato formulato un parere tecnico da parte del responsabile del CRN (N. Arrigoni), relativo al piano di controllo proposto dalla provincia di Trento, che è stato favorevole, seppur con alcune raccomandazioni (vedi allegato Prot.4375 del 25.2.2014).
- In data 28.3.2014 è stato formulato un parere tecnico da parte del responsabile del CRN (N. Arrigoni), relativo al piano di controllo e assegnazione delle qualifiche sanitarie proposto dalla regione Lazio, che è stato favorevole, seppur con alcune raccomandazioni (vedi allegato Prot.7372 del 28.3.2014).
- Presso il CRN è stato svolto un tirocinio nel mese di ottobre 2013 per la studentessa Monica Miravalle (Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma), con svolgimento di una tesi di laurea dal titolo "Indagine sulla contaminazione del latte di massa da parte di Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in allevamenti bovini infetti".

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.

- **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 22-23 maggio 2014 è stato organizzato un meeting a Tours, FR.

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 e 146 negativi, da utilizzare nella validazione di metodiche diagnostiche innovative.

- E' stato stipulato un transfer agreement (accordo di collaborazione scientifica stipulato in luglio 2013, durata 3 anni) 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 per lo sviluppo di attività di ricerca. In questo ambito, la Dr.ssa Barbora Klanicova ha svolto un training presso il laboratorio del CRN nel periodo 7.10.2013-7.11.2013 relativo all'utilizzo del propidium monoazide per la realizzazione di studi di sopravvivenza di MAP all'interno di yogurt. I risultati sono stati presentati al 12th International Colloquium on paratuberculosis (vedi pubblicazioni: 10, Klanicova et al).

### **Consulenze e collaborazioni internazionali**

- E' stata realizzata una collaborazione con una veterinaria statunitense, J.McDonald, da anni attiva nei programmi di formazione per la paratubercolosi negli Stati Uniti, nell'ambito della formazione continua veterinaria. Il progetto (Fulbrigh Project "National Education Program for Veterinary Practitioners, Students, and Producers"), interamente finanziato dagli Stati Uniti, ha riguardato una consulenza sui 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 ha avuto una durata di 4 mesi (febbraio-maggio 2014), con frequenza della Dr. J. McDonald presso i laboratori del CRN.

I risultati della collaborazione sono descritti nella sezione relativa ai progetti di ricerca corrente (PRC Progetto di ricerca corrente IZS LE 2012/001: "Creazione di un sistema informativo integrato per la paratubercolosi"), in sinergia con il progetto Fulbright, e sono stati presentati al 12 International Colloquium on paratuberculosis (vedi pubblicazioni: 11, McDonald et al).

## **Pubblicazioni scientifiche e divulgative**

Vedi All. 3 (copia del frontespizio).

### **Su riviste con Impact factor:**

1. Luini M, Foglia E, Andreoli G, Tamba M, Arrigoni N (2013): Piano di controllo e certificazione per la Paratubercolosi bovina: criteri e analisi costo-beneficio" *Large Animal Review*, 19, 257-265
2. Serraino A, Arrigoni N, Ostanello F, Ricchi M, Marchetti G., Bonilauri P., Bonfante E. and Giacometti F. (2014): A screening sampling plan to detect *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis-positive dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 97:1-8
3. Tamba M., Paternoster G., Formigoni A., Garbarino C., Santi A., Galletti G., Fustini M., Caminiti A., Natalini S., Arrigoni N. (2014): Perdite economiche associate alla presenza di paratubercolosi in allevamento. *Large Animal Review* 2014; 20: 147-151
4. Ricchi M, De Ciccio C, Kralik P, Babak V, Boniotti MB, Savi R, Cerutti G, Cammi G, Garbarino C, Arrigoni N (2014): Evaluation of viable *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in milk using peptide-mediated separation and propidium monoazide qPCR. *FEMS Microb Lett* 356, 127-133
5. Garbarino C, Cammi G, Ricchi M, Savi R, Pongolini S, Arrigoni N (2014): "Paratubercolosi: un problema di sicurezza alimentare?" *Large animal review*, Suppl. 1 al n.4 agosto 2014, anno 20, 58-61.
6. Serraino A, Bonilauri P, Arrigoni N, Ostanello F, Ricchi M, Marchetti G, Bonfante E, Albonetti S, Giacometti F (2014): Quantitative risk assessment of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis survival in pasteurized milk in three dairy plants in Italy. *Food Control*. 2014 Nov: 120–126

### **Su atti di congressi o riviste senza Impact Factor:**

7. De Ciccio C, Arrigoni N, Kralik P, Babak V, Boniotti MB, Savi R, Cerutti G, Cammi G, Garbarino C, Ricchi M (2014): Evaluation of viable *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in milk using peptide-mediated separation and propidium monoazide qPCR, *Proceeding 12th International Colloquium on Paratuberculosis*, Parma 22-26 June 2014, 60
8. Giorgi I, Varello K, Meistro S, Romano A, Gorla M, Chiavacci L, Vitale N, Gennero MS, Bergagna S, Modesto, Biolatti C, Arrigoni N, Dondo (2014): Evaluation of agreement between culture, PCR, histopathology for post mortem diagnosis of paratuberculosis from faeces and tissues. *Proceeding 12th International Colloquium on Paratuberculosis*, Parma 22-26 June 2014, 66
9. Vitale N, Possidente R, D'Errico V, Dondo A, Bergagna S, Barbero R, Meistro S, Bozzetta E, Peletto S, Cerutti F, Romano A, Gorla M, Arrigoni N, Chiavacci L (2014): Estimating diagnostic accuracy of paratuberculosis (PTB) diagnostic test with latent class model. *Proceeding 12th International Colloquium on Paratuberculosis*, Parma 22-26 June 2014, 67

10. Klanicova B, Ricchi M, Slana I, Kralik (2014): Detection of *Mycobacterium avium* subsp.*paratuberculosis* viability in fermented milk products using propidium monoazide. Proceeding 12th International Colloquium on Paratuberculosis, Parma 22-26 june 2014, 70
11. McDonald J, Leo S, Paternoster G, Tamba M, Bontempi G, Arrigoni N (2014) iRAMP: an italian risk assessment and management planning tool and just-in-time learning within one practical application, Proceeding 12th International Colloquium on Paratuberculosis, Parma 22-26 june 2014, 97
12. Bergagna S, Barbero R, Dezzuto D, Vitale n, Possidente R, Rossi F, Soncin AR, Richelmi G, Varello K, Colussi S, Maniaci MG, Gorla M, Romano A, Arrigoni N, Gennero MS (2014): Estimate agreement between ELISA and culture results for *Mycobacterim avium* subsp.*paratuberculosis* in sera and fecal samples, Proceeding 12th International Colloquium on Paratuberculosis, Parma 22-26 june 2014, 107
13. Tamba M, Paternoster G, Formigoni A, Garbarino C, Santi A, Galletti G, Fustini M, Caminiti A, Natalini S, Arrigoni N (2014): Estimation of economic losses associated with Johne's disease in dairy herds of northern Italy, Proceeding 12th International Colloquium on Paratuberculosis, Parma 22-26 june 2014, 118
14. Mazzone P, Corneli S, Vitale N, Di Paolo A, Biagetti M, Maresca C, Ricchi M, Mangili P, Papa P, Pezzotti G, Raeber AJ, Arrigoni N, Cagiola M (2014): Use of new Johnin in gamma-IFN test to detect *Mycobacterium avium* subsp.*paratuberculosis* (MAP) infected cattle: preliminary data. Proceeding 12th International Colloquium on Paratuberculosis, Parma 22-26 june 2014, 127
15. Colussi S, Peletto S, Modesto P, Riina MV, Meistro S, Varello S, Giorgi I, Soncin AR, Gennero MS, Dezzutto D, Irico L, Vitale N, Romano A, Gorla M, Arrigoni N, Acutis PL (2014): Identification of single nucleotide polymorphisms in SLC11A1 and CARD15 genes and their association with infection by *Mycobacterium avium* subsp.*paratuberculosis*. Proceeding 12th International Colloquium on Paratuberculosis, Parma 22-26 june 2014, 136
16. Della Noce I, Stevenson K, Parkhill J, Ricchi M, Lazzari B, Del Corvo M, Zanetti E, Messina V, Arrigoni N, Williams JL, Minozzi G (2014): Insight in the genome of *Mycobacterium avium* subsp.*paratuberculosis* by next generation sequencing approaches Proceeding 12th International Colloquium on Paratuberculosis, Parma 22-26 june 2014, 166
17. Gamberale F, Barlozzari G, Scaramella P, Pietrella G, De Santis G, Turriziani G, Ricchi M, Arrigoni N, Macrì G (2014): First isolation and genotyping of *Mycobacterium avium* subsp.*paratuberculosis* in italian mediterranean buffalo (*Bubalus bubalus*) in Italy, Proceeding 12th International Colloquium on Paratuberculosis, Parma 22-26 june 2014, 167
18. Savi M, Ricchi M, Bolzoni L, Pongolini S, De Cicco C, Licata E, Tamba M, Panella G, Cerutti G, Cammi G, Arrigoni N (2014): Quantitative survey on bulk tank milk contamination by *Mycobacterium avium* subsp.*paratuberculosis* (MAP) in Emilia-

- Romagna region. Proceeding 12th International Colloquium on Paratuberculosis, Parma 22-26 june 2014, 183
19. Arrigoni N, Ostanello F, Ricchi M, Bonilauri P, Bonfante E, Giacometti F, Serraino A (2014): Screening for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in southern italian dairy herds by bulk milk ELISA and in-line milk filters. Proceeding 12th International Colloquium on Paratuberculosis, Parma 22-26 june 2014, 185
  20. Garbarino C, Bianchi A, Gaffuri A, Ricchi M, Savi R, Cammi G, Leo S, Bertoletti I, Arrigoni N (2014): Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in wild ruminants of Italian Central Alps, Proceeding 12th International Colloquium on Paratuberculosis, Parma 22-26 june 2014, 189
  21. Romano A, Vitale N, Chiavacci L, Rossi F, Zoppi S, Bergagna S, Gennero MS, Varello K, Richelmi G, Acutis PL, Boin C, Arrigoni N, Gorla M (2014): Assessing the prevalence of paratuberculosis: a cohort study in two freisian farm in north-western Italy. Proceeding 12th International Colloquium on Paratuberculosis, Parma 22-26 june 2014, 189
  22. Papa P, Arrigoni N, Caporali A, mangili P, Maresca C, Scoccia E, Paniccià M, Corneli S, Di Paolo A, D'Avino N, Mazzone P (2014): Paratuberculosis seroprevalence in dairy cattle in two regions of central italy: Umbria and Marche. Proceeding 12th International Colloquium on Paratuberculosis, Parma 22-26 june 2014, 192
  23. Tamba M, Natalini S, Paternoster G, Santi A, Galletti G, Caminiti A, Licata E, Garbarino C, Arrigoni N (2014): Bulk tank milk ELISA for estimating the prevalence of paratuberculosis in dairy herds of a Northern Italian region. Proceeding 12th International Colloquium on Paratuberculosis, Parma 22-26 june 2014, 200
  24. Savi R, Ricchi M, Pongolini S, Leo S, Cammi G, Garbarino C, Arrigoni N (2014): Survey on the presence of MAP in ground beef from and industrial meat plant. Proceeding 12th International Colloquium on Paratuberculosis, Parma 22-26 june 2014, 208
  25. Cammi G, Ricchi M, Losio MN, Savi R, Cosciani Cunico E, Arrigoni N, Garbarino C, Leo S, Daminelli P (2014): Behavior of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) during manufacturing and aging of italian hard cheeses, Proceeding 12th International Colloquium on Paratuberculosis, Parma 22-26 june 2014, 209
  26. Mazzone P, Corneli S, Di Paolo A, Maresca C, Biagetti M, Sebastiani C, Ciullo M, Pezzotti G, Ricchi M, Savi R, Arrigoni N (2014): Evaluation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) survival in two biogas plants in Italy. Proceeding 12th International Colloquium on Paratuberculosis, Parma 22-26 june 2014, 217
  27. Arrigoni N. (2014) "Paratubercolosi: un problema di sicurezza alimentare: Applicazione delle linee guida per l'adozione delle Linee guida per l'adozione dei piani di controllo e per l'assegnazione delle qualifiche sanitarie degli allevamenti nei confronti della paratubercolosi bovina, Atti XXIV Convegno Nazionale

- dell'Associazione Italiana Veterinari Igienisti "Nuove frontiere della sicurezza alimentare", organizzato da AIVI, a Bologna nei giorni 10-12 settembre 2014, 1-2
28. Bonilauri P, Serraino A, Arrigoni N, Ostanello F, Ricchi M, Giacometti F (2014): Valutazione qualitativa del rischio di sopravvivenza di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* nel latte pastorizzato in tre stabilimenti lattiero-caseari in Italia, Atti XXIV Convegno Nazionale dell'Associazione Italiana Veterinari Igienisti (AIVI) "Nuove frontiere della sicurezza alimentare", Bologna, 10-12 settembre 2014, 14-15
  29. Serraino A, Ostanello F, Giacometti F, Marchetti G, Arrigoni N, Ricchi M, Bonilauri P (2014): Paratubercolosi nel sud Italia: presenza negli allevamenti e valutazione del rischio, Pag.1-138. Volume prodotto nell'ambito del progetto finalizzato con il contributo del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali nell'ambito dell'attivazione dei contratti di Filiera D.M. 1 agosto 2013, ISBN 987-88-909563-3-1, Litografia SAB – Budrio (BP) ([www-litografiasab.it](http://www-litografiasab.it))
  30. Marchetti G, Ricchi M, Serraino M, Giacometti F, Bonfante E, Arrigoni N (2103): Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and dairy cattle in Soutern Italy: preliminary results. Italian Journal of food safety 2013: vol.2:e35
  31. Arrigoni N, Ruocco L, Paternoster G, Tamba M. (2014): "Bovine Paratuberculosis in Italy: national guidelines for the control of bovine paratuberculosis and for assessing the health ranking of the herds"(2014): Bulletin of the International Dairy Federation 475/2014, 45-50.
  32. "Parliamo di paratubercolosi", intervista di Emilio Olzi a Norma Arrigoni, pubblicata su 30giorni, gennaio 2014, 25-28.

### **Sito Web**

- Il sito, ove sono disponibili le informazioni relative alla malattia, i manuali per il controllo e le attività del CRN (formazione, ring test) è stato aggiornato con le disposizioni normative relative alle Linee guida, e relativi decreti applicativi.
- E' stata pubblicata inoltre una brochure informativa/divulgativa dal titolo "Paratubercolosi nell'allevamento della bovina da latte", destinato ad allevatori e veterinari, aggiornata con i criteri delle Linee guida nazionali ([http://www.izsler.it/izs\\_bs/allegati/450/brochure17\\_12\\_13B.pdf](http://www.izsler.it/izs_bs/allegati/450/brochure17_12_13B.pdf)allegato).
- E' attiva inoltre la piattaforma interattiva per la gestione dei ring test (proficiency test) organizzati dal CRN; nell'anno in corso è stato utilizzato per la gestione del ring test per la diagnosi sierologica di paratubercolosi mediante ELISA e/o AGID.