



RELAZIONE ANNUALE

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

(Periodo: dal 1.10.2014 al 30.09.2015)

Centro di Referenza Nazionale (CRN) Paratubercolosi Relazione sulla attività svolta dal 01.10.2014 al 30.09.2015

Attività Diagnostica

1) standardizzazione e validazione di metodiche analitiche

Nel corso dell'anno di attività si è proceduto, in accordo con le procedure generali del nostro istituto:

- alla *stesura* dei seguenti metodi di prova:
 - Metodo di prova interno per l'identificazione di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* da isolati batterici mediante F57-PCR real time (MP 09/199);
 - Metodo di prova normato (OIE) per la ricerca di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* da feci – Esame colturale dopo centrifugazione (MP in corso di emissione).
- alla *validazione/rivalidazione* dei seguenti metodi di prova:
 - Metodo di prova interno per la ricerca di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* dal latte mediante esame microbiologico per centrifugazione (MP 01/090);
 - Metodo di prova interno per la determinazione di anticorpi nei confronti di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* da siero e plasma di bufalo e ruminanti selvatici tramite ELISA indiretta – kit ID VET (MP 04/152)
 - Metodo di prova interno per la determinazione di anticorpi nei confronti di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* da sangue e latte bovino tramite ELISA indiretta – kit IDEXX (MP 04/22).

Sono stati inoltre eseguite:

- una valutazione delle performances dei kit sierologici ELISA del commercio su siero e latte di bovini infetti e negativi;
- una valutazione delle performances dei kit sierologici ELISA del commercio su siero e latte di bufalini infetti e negativi;
- una valutazione delle performances dei kit sierologici ELISA del commercio su siero di animali selvatici.

Sono stati implementati i seguenti metodi (inclusa la determinazione del LOD, Limit of Detection), utilizzati a scopo sperimentale:

- 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.

E' in corso una prova di comparazione per la ricerca di MAP da tessuti mediante diverse metodiche colturali. A tale scopo campioni derivati da intestini di bufala positivi per

Relazione annuale 2014-2015 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)

MAP in PCR, a diverso livello di positività, sono stati processati attraverso l'allestimento in parallelo di quattro differenti metodi: due riportati dal Manuale OIE, uno derivato da metodo messo a punto per la ricerca di MAP da carni macinate e la metodica già in uso presso il Laboratorio. La valutazione dei risultati è prevista per fine anno.

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 **35.610 esami**, di cui:

Sierologici	33.437
Microbiologici	906
PCR	1.267

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 IIZZSS 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 diretta (PCR e/o coltura) su feci, a cui hanno aderito 22 laboratori appartenenti a 10 IIZZSS.

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 23.03.2015, con scadenza prevista per l'inserimento dei risultati 24.08.2015.

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 e 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 2014, gennaio 2015, aprile 2015, luglio 2015), organizzate a livello europeo, per esame sierologico mediante ELISA (Ente organizzatore: QA Veterinary Laboratory Agency - UK). I risultati sono stati corretti nel 95% dei casi. In un caso non è stato individuato un siero debolmente positivo.
- 2 prove interlaboratorio (gennaio e agosto 2015), organizzate a livello europeo, per PCR su feci (Ente organizzatore: QA Veterinary Laboratory Agency - UK). I risultati sono stati corretti nel 100% dei casi.
- 1 prova interlaboratorio (maggio 2015), organizzata a livello europeo, per coltura 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.

Il CNR sta valutando la possibilità di inserire queste informazioni nel website del CNR in maniera da renderle fruibili per tutti gli interessati.

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 Veterinario (<https://www.vetinfo.sanita.it/>), al fine della gestione informatica delle attività previste dalle Linee Guida, in particolare per la registrazione di:

- casi clinici nel sistema SIMAN, 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 nella Anagrafe Bovina (BDN).

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

Le "Linee guida per l'adozione di Piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria degli allevamenti nei confronti della paratubercolosi bovina" sono state approvate in Conferenza Stato Regioni il 17 ottobre 2013 e pubblicate in Gazzetta Ufficiale il 19.11.2013

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.

La Direzione Generale della Sanità Animale e dei Farmaci veterinari del Ministero della Salute - rappresentata dal dott. Luigi Ruocco - ha incontrato, in data 28.4.2015 in presenza del Centro di referenza Nazionale, i rappresentanti delle Regioni Lombardia, Veneto, Piemonte ed Emilia-Romagna, dove è concentrata la maggior parte del patrimonio zootecnico bovino nazionale, con l'obiettivo di verificare e valutare:

- il recepimento delle linee guida nazionali nelle diverse Regioni e l'eventuale adozione di piani regionali di monitoraggio e controllo,
- l'adesione al piano in termini numerici, i dati sugli allevamenti controllati nel 2014 e la modalità di assegnazione delle qualifiche sanitarie,
- eventuali criticità relative all'assegnazione delle qualifiche sanitarie, all'adozione di piani volontari di controllo, alla formazione dei veterinari e alla formazione e motivazione degli allevatori,
- proposte operative in vista di una possibile revisione delle linee guida nel 2016.

- La possibilità di estendere all'allevamento ovicaprino le linee guida per l'adozione dei piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria degli allevamenti nei confronti della paratubercolosi. Dai dati nazionali, la prevalenza di allevamenti ovini e caprini infetti da paratubercolosi è pari o superiore rispetto a quella degli allevamenti bovini.

Di seguito viene riportato lo stato di applicazione delle Linee Guida a livello Nazionale, ove risulta che tutte le Regioni, ad eccezione di Basilicata, Marche e Molise, hanno recepito la Linee Guida. Viene inoltre riportato il riferimento al relativo documento di recepimento.

Regione	Riferimento
<i>Abruzzo</i>	<i>Determinazione n. DG21/206 del 21.11.2013</i>
<i>Calabria</i>	<i>Decreto del Commissario ad Acta n.47 del 21/05/2015</i>
<i>Campania</i>	<i>Deliberazione n. 657 del 30/12/2013</i>
<i>Emilia-Romagna</i>	<i>Deliberazione N. 2100 DEL 30/12/2013</i>
<i>Friuli Venezia Giulia</i>	<i>Deliberazione della Giunta regionale N. 916 DEL 15/05/2015</i>
<i>Lazio</i>	<i>Decreto del Commissario ad acta n. U00109 del 28/03/2014 Determinazione N. G02603 del 13/03/2015, Proposta n. 3168 del 05/03/2015 Linee guida Regionali per l'adozione di piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria degli allevamenti bovini e bufalini nei confronti della paratubercolosi.</i>
<i>Liguria</i>	<i>Deliberazione n. 644 del 30/05/2014</i>
<i>Lombardia</i>	<i>DDGN N°6845 del 18/07/2013 Piano regionale di controllo e certificazione nei confronti della paratubercolosi bovina</i>
<i>Piemonte</i>	<i>Deliberazione n. 15-7093 del 10/02/2014</i>
<i>Puglia</i>	<i>Deliberazione della Giunta Regionale n. 2567 del 30/12/2013</i>
<i>Sardegna</i>	<i>Deliberazione N. 27/10 del 15.7.2014</i>
<i>Sicilia</i>	<i>Decreto Assessoriale 23/02/2015</i>
<i>Toscana</i>	<i>Deliberazione n. 1103 DEL 16/12/2013</i>
<i>Trentino-Alto Adige</i>	<i>Provincia di Trento: Deliberazione n. 2702 del 20/12/2013 Provincia di Bolzano: Decreto N. 31.12/514378 DEL 15/12/2014 Piano di controllo nei confronti della paratubercolosi in Provincia di Bolzano.</i>
<i>Umbria</i>	<i>Deliberazione n. 819 DEL 7 luglio 2014</i>
<i>Valle d'Aosta</i>	<i>Deliberazione n. 14 del 10/1/2014</i>
<i>Veneto</i>	<i>Deliberazione n. 2836 del 29/12/2014, ALLEGATO C Piano di miglioramento dello stato sanitario negli allevamenti della Regione Veneto nei confronti della paratubercolosi.</i>

Da rilevare che:

- 2 Regioni hanno recepito le linee guida limitatamente alla segnalazione dei casi clinici (Provincia di Bolzano - con indennizzo - e Veneto).
- Tutte le altre Regioni hanno recepito integralmente le linee guida
- 4 Regioni e la provincia di Trento hanno integrato il recepimento (totale o parziale) con azioni aggiuntive:
 - Lombardia: assegnazione del livello PTEX previa visita clinica;
 - Provincia di Trento: indagine a tappeto e test in compravendita su sangue;
 - Sicilia e Valle d'Aosta: indagine a tappeto su sangue individuale;
 - Veneto: indagine sul latte di massa mediante qPCR.

L'elenco delle deliberazioni delle diverse Regioni, con collegamento ipertestuale ai documenti, sarà pubblicato sul sito del centro di referenza nazionale per la paratubercolosi.

Relazione annuale 2014-2015 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)

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

Sono emerse alcune criticità dalla applicazione dei Piani di controllo/certificazione attivati a livello nazionale, tra cui:

1. Coinvolgimento delle associazioni di allevatori

Attualmente i test diagnostici per paratubercolosi, oltre che dagli IZZSS, sono eseguiti anche da APA/ARA sul latte dei controlli funzionali in diverse Regioni. Questi test non sono validi per l'assegnazione delle qualifiche, ma potrebbero essere utilizzati nell'ambito dei piani di gestione sanitaria a determinate condizioni:

- Il servizio di analisi sia accompagnato da un servizio di assistenza in azienda, per l'interpretazione e l'utilizzo del dato di analisi. Da sottolineare che questi esiti potrebbero contrastare con i dati dell'AUSL, soprattutto a causa della diversa matrice analizzata (APA esegue test sul latte mentre i controlli ufficiali sono effettuati prevalentemente sul siero). La presenza di esiti discordanti può creare confusione e demotivare l'allevatore e necessita quindi di un supporto interpretativo;
- Trasparenza: l'ASL dev'essere a conoscenza dell'utilizzo di questo servizio da parte dell'allevatore e dell'esito positivo dell'analisi con relativa matricola dell'animale. Questo per evitare la commercializzazione di animali infetti e l'attribuzione di qualifiche sulla base di dati incompleti.
- Verificare se i laboratori sono accreditati e se è necessario organizzare un ring test specifico per le ARA che eseguono l'analisi.

2. Utilizzo dei dati in autocontrollo per la richiesta della qualifica sanitaria, anche se precedenti la richiesta di qualifica, se i campioni corredati di matricole sono stati analizzati presso IZZSS.

Nel caso in cui gli allevatori abbiano eseguito delle analisi in autocontrollo presso un IZS su tutti i capi >36 mesi presenti in stalla, sarebbe opportuno che questi fossero tenuti in considerazione per l'assegnazione della qualifica sanitaria, qualora l'allevatore lo richieda. L'interpretazione da parte dei servizi veterinari della AUSL relativamente a questo punto non è univoca.

Di seguito viene riportato lo stato di applicazione e le relative problematiche rilevate nelle quattro regioni a maggiore vocazione zootecnica (Lombardia, Emilia-Romagna, Piemonte, Veneto).

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 Nazionali.

L’assegnazione della qualifica sanitaria base agli allevamenti avviene su richiesta dell’allevatore (richiesta di adesione al piano). Questo permette di individuare gli allevatori motivati ed interessati. Ricevuta la richiesta, i servizi veterinari della ASL effettuano una visita clinica in allevamento con cadenza annuale, in base alla quale viene assegnata la qualifica PTC o PTEX del piano lombardo. La qualifica PTEX corrisponde alla qualifica PT0 delle linee guida nazionali con l’azione aggiuntiva della visita clinica. La visita clinica non solo permette di individuare eventuali casi clinici non ancora notificati, ma è anche un’occasione di formazione e sensibilizzazione dell’allevatore.

La richiesta di una qualifica sanitaria volontaria (PT1, PT2, PT3, PT4 e PT5) avviene in seguito ad un’ulteriore istanza (richiesta di qualifica).

Nelle province di Cremona, Brescia e Bergamo, la sensibilizzazione e formazione/informazione con il coinvolgimento di ASL, veterinari liberi professionisti, IZS e industria di trasformazione ha portato ad una buona adesione al piano.

Nelle province di Lodi e Milano, dove era stato adottato un piano già da alcuni anni, alcuni allevamenti hanno raggiunto i livelli di certificazione PT3-4-5.

Nel 2015 hanno aderito al Piano 4.001 allevamenti su un totale di 6.336 registrati in BDN, pari al 63.1%.

Di questi, 3284 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 82,1% degli allevamenti aderenti al Piano e al 51,8% 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, 354 allevamenti (8,8% degli aderenti) hanno raggiunto la qualifica PT1 (allevamenti a basso rischio), 268 (6,7% degli aderenti) hanno ottenuto la qualifica PT2 (allevamento negativo) e 14 hanno avuto la qualifica di allevamento certificato (rispettivamente, 6 allevamenti PT3, 4 allevamenti 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.

Dalle tabelle sotto riportate, si osserva un trend positivo del numero di aziende che richiede e acquisisce le qualifiche nel 2015 rispetto al 2014. Questo risultato è stato ottenuto grazie al ruolo attivo delle ASL, che hanno coinvolto i caseifici maggiormente interessati all’export e organizzato incontri tra rappresentanti dell’industria di trasformazione, allevatori afferenti, veterinari ASL, liberi professionisti e IZS.

Anno	2014									
Asl	Allevamenti (Latte)	Allevamenti aderenti	PT0 Aderenti al Piano	PTC	PTEX1	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5
BERGAMO	772	272	3	0	238	21	10	0	0	0
BRESCIA	1363	1053	10	0	959	63	21	0	0	0
COMO	207	84	1	0	50	9	23	1	0	0
CREMONA	822	711	31	0	618	25	37	0	0	0
LECCO	106	68	4	0	60	1	3	0	0	0
LODI	316	240	8	1	206	15	4	5	1	0
MANTOVA	1016	625	2	0	614	4	5	0	0	0
MILANO	2	2	0	0	2	0	0	0	0	0
MILANO 1	150	156	1	0	119	21	9	2	1	3
MILANO 2	136	117	1	0	92	18	6	0	0	0
MONZA E BRIANZA	33	34	0	0	33	0	0	0	0	1
PAVIA	110	108	2	0	106	0	0	0	0	0
SONDRIO	790	34	5	0	28	1	0	0	0	0
VARESE	100	92	1	0	61	9	19	2	0	0
VALLECAMONICA-SEBINO	522	12	0	0	12	0	0	0	0	0
Totale	6445	3608	69	1	3198	187	137	10	2	4
% sul totale		56,0%	1,9%	0,0%	88,6%	5,2%	3,8%	0,3%	0,1%	0,1%

Anno	2015									
Asl	Allevamenti (Latte)	Allevamenti aderenti	PT0 Aderenti al Piano	PTC	PTEX1	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5
BERGAMO	768	304	14	0	244	25	21	0	0	0
BRESCIA	1348	1151	8	0	994	101	48	0	0	0
COMO	203	96	1	0	47	15	33	0	0	0
CREMONA	816	731	25	0	577	78	51	0	0	0
LECCO	107	67	4	0	59	0	4	0	0	0
LODI	312	269	2	1	221	30	8	4	3	0
MANTOVA	1001	804	14	0	699	41	50	0	0	0
MILANO	2	2	0	0	2	0	0	0	0	0
MILANO 1	147	157	0	0	119	18	16	0	1	3
MILANO 2	135	120	0	0	85	25	9	1	0	0
MONZA E BRIANZA	34	36	0	0	34	0	1	0	0	1
PAVIA	111	114	3	0	109	1	1	0	0	0
SONDRIO	772	35	4	0	30	1	0	0	0	0
VARESE	95	103	5	0	52	19	26	1	0	0
VALLECAMONICA-SEBINO	485	12	0	0	12	0	0	0	0	0
Totale	6336	4001	80	1	3284	354	268	6	4	4
% sul totale		63,1%	2,0%	0,0%	82,1%	8,8%	6,7%	0,1%	0,1%	0,1%

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

La Regione Emilia-Romagna ha recepito integralmente 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 sull'applicazione del piano di controllo regionale. In tale atto era previsto che la Regione avrebbe chiesto a BDN l'assegnazione della qualifica PT0 (senza casi clinici) a tutte le aziende bovine con riproduttori, lasciando ai Servizi Veterinari ASL il compito di aggiornare la qualifica. Nella tabella seguente è riportata la situazione delle qualifiche sanitarie registrate in BDN al 20/10/2015.

AUSL	Totale allevamenti	PTC Con Casi Clinici	PT0 Senza Casi Clinici	PT1 A Basso Rischio	PT2 Negativo
PIACENZA	753		739	9	5
PARMA	1554	2	1551		1
REGGIO EMILIA	1297		1293	2	2
MODENA	1076		1076		
BOLOGNA	654	2	649	1	2
FERRARA	98		98		
RAVENNA	170	1	168	1	
FORLI'-CESENA	393	2	391		
RIMINI	183		183		
Totale	6178	7	6148	13	10

Fonte: BDN aggiornamento al 20/10/2015

Ad oggi non è stata organizzata un'attività di promozione regionale del piano.

Da segnalare comunque alcune iniziative:

- In provincia di Bologna, da parte di alcuni veterinari AUSL, con arruolamento di allevamenti tramite caseifici interessati all'export;
- in provincia di Piacenza, dove sono stati reclutati circa 40 allevamenti attraverso il coinvolgimento attivo da parte del centro di referenza nazionale di 4 caseifici, che hanno approfondito il loro stato sanitario in autocontrollo. Gli allevamenti negativi o a basso rischio stanno avviando le procedure per la richiesta di qualifica sanitaria.

A differenza della Regione Piemonte, dove per l'assegnazione della qualifica sanitaria il prelievo deve essere eseguito da veterinari AUSL, in Emilia-Romagna, seguendo le linee guida regionali, il prelievo può essere eseguito anche da veterinari liberi professionisti, se analizzato presso l'IZS e se l'invio è accompagnato dall'elenco delle marche auricolari.

3.d Piano regionale di controllo e assegnazione delle qualifiche sanitarie nei confronti della Paratubercolosi bovina in Regione Veneto

La Regione Veneto ha recepito le Linee Guida limitatamente alla segnalazione dei casi clinici.

In Regione veneto dal 2004 al 2009 sono state portate avanti iniziative su base volontaria con scarsa partecipazione.

Nel 2010-2012 sono state realizzate iniziative di formazione per i veterinari aziendali.

Nel 2013, con la DGR 1564 è stato approvato e realizzato un Piano Regionale di controllo della paratubercolosi bovina, in cui era previsto un monitoraggio mediante qPCR su latte di massa su tutti gli allevamenti da latte con almeno 30 animali in lattazione. Sulla base del risultato le aziende venivano classificate in 2 classi di rischio (positive, negative).

Nel 2015 è stato approvato un ulteriore PIANO DI CONTROLLO REGIONALE, con l'obiettivo di elevare lo standard sanitario del latte prodotto negli allevamenti veneti nei confronti della paratubercolosi, riducendo la concentrazione di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) nel latte. Tale monitoraggio si basa sul presupposto che il processo di pastorizzazione abbatte il potenziale di rischio di trasmissione di microrganismi vitali all'uomo se la concentrazione di MAP non supera 10^4 /lt latte.

Il Piano è articolato come segue:

- *1° fase: Controllo sul latte di massa e categorizzazione delle aziende*

Controllo semestrale sul latte di massa in tutte le aziende con più di 20 capi in lattazione (2200 allevamenti nel 2015).

Esame dei campioni mediante qPCR (limite di rilevabilità della metodica 10^4 /lt) e classificazione delle aziende in 3 classi di rischio:

- Classe Rischio 0 = negative alla qPCR: Il latte non contiene MAP in quantità rilevabile con lo strumento adottato
 - Classe Rischio 1 = positive alla qPCR, ma a valori di concentrazione di MAP $< 10^4$ /lt: bollitura, pastorizzazione, lunga stagionatura eliminano microrganismi vitali.
 - Classe Rischio 2 = positive alla qPCR a valori di concentrazione di MAP $\geq 10^4$ /lt latte: Non c'è garanzia che trattamenti termici e stagionatura eliminino completamente i microrganismi vitali.
- *2° fase: Miglioramento dello stato sanitario delle aziende attraverso corrette pratiche gestionali dell'allevamento*

Aziende positive:

- Classe di rischio 1: controllo del latte a cadenza trimestrale, indagine da parte dei veterinari ASL/IZS, definizione azioni correttive e relativa tempistica, formazione/motivazione dell'allevatore.
- Classe di rischio 2: controllo del latte a cadenza mensile, raccolta campioni di feci ambientali ed eventualmente individuali da parte dei veterinari ASL/IZS, definizione azioni correttive e relativa tempistica, formazione/motivazione dell'allevatore.

Nel corso del 2014 sono state esaminate 1677 aziende, di cui 55 sono risultate positive:

- 27 aziende con concentrazione di MAP 10^4/lt
- 28 aziende con concentrazione di MAP >math>10^4</math>/lt

L'IZSVE fornisce consulenza alle aziende infette che vogliono intraprendere piani aziendali volontari di controllo ed ha predisposto delle Linee Guida per ridurre il rischio di contaminazione del latte nelle aziende infette, disponibili sul sito:

http://www.izsvenezie.it/images/stories/Pdf/Temi/LG_in_VET2_paratuberculosis.pdf

3.e Piano regionale di controllo e assegnazione delle qualifiche sanitarie nei confronti della Paratuberculosis bovina in Piemonte

Già nel 2008 era stato avviato un Programma regionale con l'obiettivo di individuare criteri e protocolli di controllo, ai fini dell'emanazione di un piano regionale ad adesione volontaria per il controllo dell'infezione.

Sono state definite azioni aggiuntive rispetto a quanto previsto dalle Linee Guida Nazionali, in particolare sono stati disposti:

- il prelievo su sospetti clinici al macello. E' tuttavia da rilevare che nessuno dei casi clinici segnalati è stato individuato al macello.
- la visita clinica su tutti gli allevamenti (10.300 allevamenti) da riproduzione per l'assegnazione delle qualifiche sanitarie base (PT0/PTC).

Sono state realizzate attività formative, in particolare 6 riunioni con allevatori e caseifici, e convegni ECM per veterinari del servizio pubblico, organizzati in collaborazione con il Centro di Referenza Nazionale

La richiesta di adesione al piano di certificazione è avvenuta da parte di 101 allevamenti (1%).

In seguito a campionamento S1, 49 allevamenti sono risultati negativi (PT2), 29 sono stati classificati come PT1 e 23 PT0. Su 4.655 capi testati, si è registrato il 2.7% di capi positivi.

12 allevamenti hanno avuto segnalazioni di sospetti clinici (16 capi); 10 sospetti sono stati confermati (relativi a 7 allevamenti, un allevamento ha avuto 3 casi).

Al controllo sierologico (1.112 capi) negli allevamenti con casi clinici, la siero-prevalenza media è risultata del 9,2%.

I casi clinici hanno riguardato sia allevamenti da latte che della linea vacca-vitello. Nelle aziende da carne è stata riscontrata una situazione più grave, in relazione alle maggiori difficoltà di controllo ed alla pratica dell'alpeggio.

3.f Manuali per il Controllo della Paratuberculosis

Sono a disposizione sul sito del CRN due *Manuali per il Controllo per la Paratuberculosis*, uno destinato agli allevamenti di vacche da latte (http://www.izsler.it/pls/izs_bs/v3_s2ew_CONSULTAZIONE.mostra_pagina?id_pagina=5

07) 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	2011	2012	2013	2014	2015
Piemonte				7	2
Emilia-Romagna				1	1

Sardegna	4	1	1	2	1
Toscana				1	
Trento				6	4
ITALIA	4	1	1	17	9

Fonte: SIMAN: Dati aggiornati al 20/10/2015

Da sottolineare una scarsa segnalazione di casi clinici rispetto alla diffusione della malattia sul territorio nazionale.

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 ed è terminato il 28.02.2015. E' stato realizzato il piano di campionamento (intestini, feci e campioni di siero di ruminanti selvatici) sul territorio di competenza IZSLER. Sono stati analizzati 1411 campioni per la diagnosi diretta (698 campioni di tessuto intestinale o linfonodi e 713 campioni di feci) e 2611 campioni di siero. I tessuti e le feci, esaminate mediante IS900 qPCR, hanno dimostrato una positività rispettivamente del 13,6% e dell'1,1%. I campioni risultati positivi alla qPCR sono stati esaminati in coltura, sia in terreno solido (HEYM) che liquido (Versa Trek). Sono stati isolati 16 ceppi identificati come MAP mediante F57-qPCR, tutti da cervo; per 11 ceppi, ove è stato possibile ottenere subcolture, è stata eseguita la tipizzazione molecolare, mediante PCR DMC, e quindi la sub-tipizzazione, utilizzando uno schema di loci minisatelliti (Thibault et al., 2008). La tipizzazione molecolare ha mostrato che tutti i ceppi appartenevano al Tipo II (tipo Bovino). I risultati complessivi della sub-tipizzazione molecolare hanno mostrato il medesimo profilo allelico, definito come INMV1, in accordo con lo schema proposto dal database INMV (<http://mac-inmv.tours.inra.fr>). Si è quindi proceduto a confrontare il profilo ottenuto con quelli presenti nell'archivio del CRN Paratubercolosi, relativi alla tipizzazione di ceppi isolati, per lo più da specie bovina, da cui è emerso che il genotipo INMV1 è tra i più diffusi nei bovini del Nord Italia. Inoltre, sulla base delle informazioni fornite dal database INMV, questo profilo è risultato essere uno dei più diffusi globalmente (28% dei ceppi analizzati), sia nelle popolazioni domestiche che in quelle selvatiche (uccelli, lagomorfi, roditori, carnivori e ruminanti). Tale profilo è presente anche nella regione della Styria, Austria, vicina all'area di campionamento, dove però il profilo più diffuso è risultato INMV17.

Il nostro studio sottolinea l'importanza della sub-tipizzazione molecolare, al fine di una migliore comprensione dell'epidemiologia di MAP.

Nell'area del parco dello Stelvio, dove la popolazione di cervi è particolarmente densa, si è riscontrata una prevalenza di infezione da MAP, rilevata mediante PCR, particolarmente elevata. I livelli di positività sierologica risultano invece molto limitati ($\leq 1\%$), con le metodiche utilizzate (ELISA ed AGID). Su 1402 campioni di siero sono state eseguite in parallelo due metodiche sierologiche (ELISA e AGID); la concordanza tra i due test, valutata mediante Kappa di Cohen, è risultata pari a 0,481 (IC 95% 0,283-0,679, concordanza moderata). 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). Sono stati testati 6 kit ELISA in parallelo su un numero limitato (n=31) di campioni con stato di infezione accertato (PCR e/o coltura positive). Quattro dei kit hanno mostrato la stessa sensibilità (5 positivi/31 testati), un kit ha rilevato solo due campioni positivi ed uno dubbio, mentre l'ultimo kit ha rilevato solo 4 campioni positivi. Tutti i sieri positivi provenivano da cervo, la maggior parte dei quali (3/5) presentava infezione conclamata e lesioni anatomo-patologiche rilevabili macroscopicamente (deperimento, dimagrimento ed aumento di volume dei linfonodi meseraici), cosa che suggerisce una scarsa sensibilità dei kit sugli animali con infezione subclinica.

La prova di confronto delle performances dei kit ha dimostrato una sensibilità diagnostica molto limitata e in particolare:

- 16,1% per il Kit IDVET (con coniugato standard, con coniugato multispecie fornito dalla ditta, con coniugato *in house* fornito da IZLSER) e kit LSI;
- 6,4% per kit IDEXX;
- 12,9% kit Prionics.

Sono state condotte analisi su campioni provenienti da ruminanti domestici della zona endemica (36 campioni di feci prelevati da altrettanti animali tra 201 risultati positivi al test ELISA ad uno screening sierologico su 1903 campioni di siero di bovino, capra e pecora), che hanno sempre fornito esito negativo. Sono stati inoltre prelevati campioni ambientali (feci e acqua di fonte e pozze di abbeverata) che però sono risultati sempre negativi. I risultati del progetto sono stati presentati al 12th International Colloquium on paratuberculosis (Parma, 2014), alla Conferenza della European Wildlife Disease Association (Edimburgo, 2014) e al XVI Congresso S.I.Di. L.V. (Monte Silvano, PE, 2015). Inoltre, il progetto ha contribuito all'incremento della iconografia del sito web del CNR, con particolare riferimento alle lesioni da Paratubercolosi nella fauna selvatica. Infine è stata redatta una scheda riassuntiva che tratta della patologia nei selvatici e delle corrette modalità diagnostiche.

- 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 30.03.2016 (prorogato). 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. Nell'ambito di tale progetto è stata sviluppata e sperimentata in campo una applicazione su tablet per la valutazione del rischio in allevamento. Tramite tale applicazione sarà possibile effettuare in allevamento la raccolta dati (casi clinici, sieroprevalenza aziendale, valutazione del rischio); tali dati, attraverso un sistema informativo integrato, verranno memorizzati ed elaborati per la stesura di piani di gestione sanitaria nell'ambito dei piani di controllo. 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 nazionale per la paratubercolosi (http://www.izsler.it/izs_bs/allegati/450/brochure17_12_13B.pdfallegato). Nell'ambito del progetto è stato inoltre realizzata la versione italiana di un film divulgativo per allevatori che verrà reso disponibile e liberamente accessibile online, nell'ambito degli strumenti di divulgazione IZSLER. Nel corso degli ultimi mesi verrà completato lo sviluppo di un programma di formazione a distanza interattivo per gli allevatori.

- Progetto di ricerca corrente IZS LE 2013/17: "Esplorare l'uso della tecnologia MALDI-TOF per la sub-tipizzazione di ceppi di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*" (Responsabile scientifico: M. Ricchi). Il progetto, in collaborazione con l'Istituto Spallanzani di Roma, ha avuto inizio il 15.12.2014 e terminerà il 15.12.2016. L'obiettivo del progetto è valutare l'uso della tecnologia MALDI-TOF per l'identificazione di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) e un suo eventuale impiego nella sub-tipizzazione dei ceppi. Al momento sono stati processati 10 ceppi di MAP provenienti da diverse specie e fonti di isolamento. I risultati preliminari indicano come tale metodica sia in grado di identificare correttamente MAP rispetto ad altri micobatteri, tuttavia un suo possibile approccio come metodica di subtipizzazione non ha fornito finora risultati favorevoli. Per il futuro si prevede di aumentare il numero di ceppi di MAP analizzati ed il numero di ceppi di riferimento non MAP al fine di incrementare la specificità della metodica. I risultati parziali del progetto sono stati presentati al Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. (Montesilvano, PE, 2015) (vedi pubblicazioni, n.6).

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 VE 2010 102 “Fibrogenesi ed infiammazione nella paratubercolosi bovina: interazioni ospite-patogeno” (Responsabile scientifico: N.Pozzato). Il progetto è terminato 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 è terminato il 31.8.2015. Nell’ambito di tale progetto è stata fornita consulenza per la preparazione dei terreni microbiologici solidi e liquidi, per l’allestimento delle sospensioni dei ceppi di MAP necessari per le prove di challenge e per le metodiche di isolamento di MAP da formaggi.
- Progetto di ricerca corrente IZS UM 2013/110: “Valutazione della sensibilità e della specificità di test immunologici per la diagnosi precoce di paratubercolosi negli ovi-caprini” (Responsabile scientifico: P. Papa). Il progetto è iniziato il 15.9.2014 e terminerà il 14.09.2016.

Ricerca Finalizzata

Il CRN ha partecipato 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 ed è terminato il 1.12.2014.

Nel corso del progetto:

- Sono state messe a punto le metodiche PCR 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 789 aziende (prevalenza apparente 26,9%). Tuttavia, solo per 90 di queste è stato possibile quantificare il livello di MAP presente nel latte. Il livello di contaminazione mediano è risultato pari a 32,4 cellule di MAP per ml di latte (valore massimo pari a 1424 cellule di MAP per ml). Lo studio ha evidenziato come solo una piccola proporzione (3,1%) dei campioni di latte analizzati contenesse una quantità di MAP superiore alle 15,1 cellule di MAP per ml di latte (LOD_{95%} della metodica),

indicando una bassa esposizione potenziale per i consumatori se il latte è sottoposto a pastorizzazione o a trasformazione in prodotti lattiero caseari;

- E' stato realizzato un campionamento di latte pastorizzato in commercio prodotto da quattro aziende (80 campioni per ogni azienda per un totale di 320 campioni) per la ricerca di MAP attraverso esame colturale. I risultati non hanno evidenziato alcun campione positivo, malgrado siano stati analizzati 500 ml di latte per ogni singolo campione, allo scopo di aumentare la sensibilità della metodica.
- E' stata realizzata una prova di challenge su formaggio Grana Padano/Parmigiano Reggiano. Prioritariamente sono stati raccolti i dati di processo su un campione rappresentativo di caseifici produttori di Parmigiano Reggiano/Grana Padano. Sono quindi state eseguite, nelle condizioni più favorevoli tra quelle previste dai vari processi, le prove di challenge su tre diverse caldaie, una contaminata con 1 ceppo di MAP ATCC, una con ceppi di campo, ed una non contaminata di controllo. 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 ha permesso di calcolare il valore di D (tempo di riduzione logaritmica), che è risultato essere di 6 giorni per i ceppi di campo e di 15 giorni per i ceppi ATCC.
- 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 da diversi lotti, ognuno del peso di 12 q.li, provenienti 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.

Sono stati presentati due progetti di ricerca finalizzata con il CRN come capofila, che NON sono stati finanziati:

- "Paratuberculosis in sheep and goats in southern Italy, and risk related to the consumption of dairy products contaminated by Mycobacterium avium subsp.paratuberculosis" (Principal Investigator: N.Arrigoni), in collaborazione con Istituto Superiore di Sanità e Istituto Zooprofilattico del Mezzogiorno;
- "Comparative approaches to the molecular immunopathogenesis of Paratuberculosis" (Principal Investigator: M.Ricchi), in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico del mezzogiorno e l'Università degli Studi di Milano.

Il CNR (M.Ricchi) ha partecipato inoltre ad una call per progetto ANIHWA dal titolo "Towards improved diagnosis and control of paratuberculosis", in collaborazione con University of Belfast (UK), St George's University of London (UK), Institute of agricultural

and Fisheries Research (Belgium), National Veterinary Institute (SVA) (Sweden), University of Copenhagen (Denmark). La proposta non ha passato la pre-selezione a causa della rinuncia da parte del governo Regno Unito a finanziare progetti relativi alla Paratubercolosi:

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

Nessuna segnalazione

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

Continua la collaborazione con il Parco Tecnologico Padano, con uno studio sulle caratteristiche genomiche di MAP, attraverso lo studio dell'intero genoma utilizzando metodiche Next generation Sequencing (NGS). Sono stati genotipizzati circa 50 ceppi forniti dal CNR ma le analisi sono ancora in corso. Tuttavia, alcuni risultati preliminari ottenuti analizzando solo 15 ceppi di MAP isolati da diversi allevamenti localizzati in 6 province del nord Italia hanno identificato meno varianti del previsto. Questi risultati parziali sono stati presentati al 12 International Colloquium on Paratuberculosis (Parma 2014), mentre entro il 2016 dovrebbe essere pronta la stesura di un lavoro scientifico.

Aggiornamento e formazione professionale

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

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

Tale corso, gratuito ed aperto a veterinari e biologi, è disponibile sul sito www.formazioneveterinaria.it.

Il corso è mirato principalmente alla formazione dei veterinari aziendali e pubblici sul problema paratubercolosi, 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, utilizzando docenti tutti appartenenti all'IZSLER, sono stati illustrati gli aspetti relativi alla paratubercolosi, 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. 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 Paratubercolosi, 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 della provincia di Nuoro, a Nuoro, il 1.10.2014.
- Il CRN (N.Arrigoni) ha partecipato come docente al Corso ECM sulla paratubercolosi organizzato dall'ASL di Piacenza, a Piacenza presso l'IZSLER, il 10.10.2014.
- Il CRN (N.Arrigoni) ha partecipato come docente al Seminario di aggiornamento SATA, organizzato dall'Associazione regionale Allevatori Lombardia, a Padenghe sul Garda, il 26.11.2014.
- Il CRN (N.Arrigoni) ha partecipato come docente al Master di II livello in Sicurezza alimentare e Certificazione dei Prodotti di Origine Animale organizzato dall'Università di Sassari (Dipartimento di Medicina Veterinaria), in collaborazione con ACCREDIA (Ente Italiano di Accreditamento) e AICQ (Associazione Italiana Cultura Qualità), presso l'Università di Sassari, in data 28.11.2014, con una relazione dal titolo "La Paratubercolosi, una patologia ad elevato impatto sulla catena alimentare".
- Il CRN (C.Garbarino) ha partecipato al Corso di aggiornamento "Paratubercolosi: linee guida per l'adozione di piani di controllo e assegnazione della qualifica sanitaria degli allevamenti e piano di gestione sanitaria", per allevatori e veterinari, organizzato dall'Università degli Studi di Bologna, in collaborazione con il Consorzio del Parmigiano Reggiano, presso la Facoltà di Medicina Veterinaria, il 12.12.2014, a Bologna.
- Il CRN (N.Arrigoni) ha partecipato come relatore al Corso ECM sulla paratubercolosi organizzato dall'IZS della Sicilia, a Ragusa, il 16 e il 17.12.2014.

- Il CRN (N.Arrigoni) ha partecipato come relatore al Corso ECM sulla paratubercolosi organizzato dall'ASL di Trento, a Trento, il 12.2.2015.
- Il CRN (N.Arrigoni) ha partecipato come relatore al Seminario di aggiornamento sulla paratubercolosi, organizzato dall'Associazione regionale Allevatori Piemonte, a Fossano (CN), il 9.4.2015.
- Il CRN (N.Arrigoni) ha partecipato come relatore al convegno "Linee guida nazionali e piano di controllo e di certificazione per la paratubercolosi bovina in Piemonte", organizzato a Pinerolo (TO), dall'ASL TO3, il 13.5.2015.
- Il CRN (N.Arrigoni) ha partecipato come relatore al convegno "Paratubercolosi: epidemiologia e piano di controllo regionale" organizzato dall'ASL di Mantova, a Mantova il 21.5.2015.
- Il CRN (N.Arrigoni) ha partecipato come relatore all'incontro tecnico per veterinari e allevatori "Paratubercolosi bovina: che fare? Facciamoci consigliare dagli esperti", a Castelnuovo ne' monti, il 28.9.2015.

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

- Il CRN (N.Arrigoni) ha partecipato come relatore alla Giornata delle ricerche, organizzata da IZSLER, a Brescia, il 3.12.2014 con un intervento dal titolo "Sopravvivenza di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) nel digestato in uscita da un impianto per la produzione di biogas" (PRC IZSUM 02 2010).
- Il CRN (N.Arrigoni) ha partecipato al XLVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Buiatria, svoltosi a Piacenza, l'11 e 12.9.2015, con una presentazione orale di un lavoro dal titolo "iRAMP: uno strumento per la valutazione del rischio e la gestione sanitaria degli allevamenti nei confronti della paratubercolosi" (vedi pubblicazioni, n.4).
- IL CRN (M.Ricchi) ha partecipato al XVI° Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. organizzato a Montesilvano (PE) il 30.9.2015, con una presentazione orale dal titolo "Sub-tipizzazione di ceppi di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolati da cervi (*Cervus elaphus*) selvatici" e un poster dal titolo " La tecnologia MALDI-TOF nella identificazione rapida di di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP): risultati preliminari" (vedi pubblicazioni, n.5 e 6).

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

Relazione annuale 2014-2015 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)

Gruppo di lavoro inter-regionale sulla Paratubercolosi, che si è riunito a Bologna in data 28.04.2015, presso la sede della Regione Emilia-Romagna, in una riunione, sollecitata dal Ministero della Salute (Dott. L.Ruocco) per la verifica dello stato di applicazione delle Linee Guida nazionali nelle 4 principali regioni a vocazione zootecnica (Piemonte, Lombardia, Emilia-Romagna, Veneto) (vedi punto 3. Studio, sviluppo e gestione di sistemi di sorveglianza, verifica e controllo).

Consulenze, attività di docenza, collaborazioni nazionali

1) Consulenze richieste ad esterni

Nulla da segnalare.

2) Consulenze e pareri tecnici forniti ad esterni

- In data 9.1.2015 è stata formulata una integrazione al precedente parere tecnico Prot.4375 del 25.2.2014 da parte del responsabile del CRN (N.Arrigoni), inviato per le vie brevi al Dr. Carlo Costanzi, responsabile del Servizio Politiche Sanitarie della Provincia Autonoma di Trento, relativo alle “Direttive all'Azienda provinciale per i servizi sanitari per l'attuazione del Piano di controllo della Paratubercolosi (malattia di Johne) negli allevamenti bovini: anno 2015. Modifiche ed individuazione delle risorse finanziarie”.
- In data 23.2.2015 è stato formulato un parere tecnico da parte del responsabile del CRN (N.Arrigoni), relativo al piano di controllo proposto dalla Regione Sicilia, che è stato favorevole, seppur con alcune raccomandazioni (Prot.3651 del 25.2.2015).
- In data 8.4.2015 è stato formulato un parere tecnico da parte del responsabile del CRN (N.Arrigoni), relativo ad un Piano di formazione proposto dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, che, pur ritenendo strategica la formazione per la realizzazione dei piani di controllo e certificazione, ha evidenziato come necessario il coinvolgimento del Centro di riferimento come coordinatore di un eventuale progetto nazionale (Prot. 7263 del 9.4.2015).
- Nei giorni dal 30.6.2015 al 2.7.2015, il CRN ha ospitato una delegazione dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana, composta dal Dr. Fabrizio Gamberale, dal Dr. Gabriele Petrella, dalla Dott.ssa Antonella Cersini e dalla Sig.ra Paola Scaramella, per un approfondimento delle metodiche diagnostiche per la paratubercolosi.
- Presso il CRN sono state realizzate due tesi:
 - Una tesi di laurea (Università degli Studi di Milano, Facoltà di Scienze e tecnologie, Corso di Laurea in Biologia applicata alle Scienze della nutrizione), del laureando Bagozzi Roberto, dal titolo “Sviluppo e

validazione di una metodica PCR per la ricerca di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* nel latte di massa e monitoraggio nelle regioni Lombardia ed Emilia-Romagna (Correlatore: M.Ricchi).

- Una tesi di laurea di specializzazione (Università degli Studi di Parma, Facoltà di Scienze Medico-Veterinarie, Scuola di Specializzazione in sanità animale, allevamento e produzioni zootecniche) della specializzanda Alessandra Monica Bonacini, dal titolo "Paratubercolosi bovina: piani di controllo in Italia e in Europa (Correlatore: N.Arrigoni)

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, ha partecipato ad un network internazionale relativo al Progetto EMIDA "MYCBACTDIAGNOSIS".

In data 11 e 12 giugno 2015 è stato organizzato il meeting finale a Dublino, a cui ha partecipato il CRN per la paratubercolosi (N.Arrigoni), in associazione con il Centro di referenza per la tubercolosi (M.L. Pacciarini), per la presentazione dei risultati della ricerca. Il CRN 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).

Sono stati raccolti 185 sieri, di cui 70 positivi e 115 negativi, che sono stati utilizzati per la validazione di metodiche diagnostiche innovative (Luminex).

- E' ancora in essere il 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.

Consulenze e collaborazioni internazionali

- E' stata realizzata una collaborazione con il Dr. Steven Roche (Department of Population medicine, Agricultural Communications and Epidemiological Research, Guelph, Canada) per la realizzazione di un filmato divulgativo/didattico per allevatori, relativo alla prevenzione e al controllo della paratubercolosi. La versione inglese del filmato è stata presentata in occasione del 12th International Colloquium on paratuberculosis (Parma, giugno 2014, Roche S et al, "Ontario dairy producers perception and attitudes towards Johne's disease control"). Il CRN (N.Arrigoni) ha tradotto e curato la realizzazione della versione italiana del filmato. Il filmato verrà presentato al 7° Congresso Nazionale per la paratubercolosi (Piacenza, 20.11.2015), successivamente divulgato e promosso in occasione di eventi di formazione e reso liberamente accessibile all'interno del sito del CRN.

Pubblicazioni scientifiche e divulgative

Vedi All. 1 (copia del frontespizio).

Su riviste con Impact factor:

- 1) Piras C, Soggiu A, Bonizzi L, Greco V, Ricchi M, Arrigoni N, Bassols A, Urbani A, Roncada P (2015): Identification of immunoreactive proteins of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Proteomics*. 15(4): 813-23.
- 2) Savi R, Ricchi M, Cammi G, Garbarino C, Leo S, Pongolini S, Arrigoni N (2015): Survey on the presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ground beef from an industrial meat plant. *Vet Microbiol*. 2015 Jun 12;177(3-4):403-8. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.03.013. Epub 2015 Mar 20. PubMed PMID: 25824129.
- 3) Ostanello F, Serraino A, Arrigoni N, Ricchi M, Bonilauri P, Giacometti F (2015): Valutazione della prevalenza di aziende da latte infette da *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* nel sud Italia. *Large Animal Review* 2015; 21: 13-21.

Su atti di congressi o riviste senza Impact Factor:

- 4) Leo S, Paternoster G, Tamba M, Bontempi G, Arrigoni N (2015): iRAMP: uno strumento per la valutazione del rischio e la gestione sanitaria degli allevamenti nei confronti della paratubercolosi, Atti XLDII Congresso SIB, Piacenza, 11 – 12 settembre 2015, disponibili su <http://www.rivistabuiatria.it>.

- 5) Garbarino C, Savi R, Leo S, Cammi G, Bianchi A, Gaffuri A, Giacomelli S, Ricchi M, Bertoletti I, Arrigoni N (2015): Sub-tipizzazione di ceppi di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolati da cervi (*Cervus elaphus*) selvatici. Atti del XVI Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. – Montesilvano (PE), 30 Settembre - 2 Ottobre 2015.
- 6) Ricchi M, Mazzarelli A, Di Caro A, Savi R, Leo S, Russo S, Cammi G, Garbarino C, Arrigoni N (2015): La tecnologia MALDI-TOF nell'identificazione rapida di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP): risultati preliminari. Atti del XVI Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. – Montesilvano (PE), 30 Settembre - 2 Ottobre 2015.

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 regionali.
- 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.pdfallegato).
- 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 diretta di paratubercolosi mediante coltura e/o PCR.
- È stato implementato l'archivio fotografico con immagini provenienti da animali con forma clinica, appartenenti alle varie specie ruminanti (bovini, ovi-caprini, selvatici) e di immagini di interesse diagnostico.