



RELAZIONE ANNUALE

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

(Periodo: dal 1.10.2015 al 30.09.2016)

Centro di Referenza Nazionale (C.D.R.) Paratubercolosi Relazione sulla attività svolta dal 01.10.2015 al 30.09.2016

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 a seguito di validazione/rivalidazione* dei seguenti metodi di prova:
 - Metodo di prova interno per la ricerca di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) dal latte mediante esame microbiologico per centrifugazione (MP 01/090);
 - Metodo di prova normato (OIE) per la ricerca di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) da feci – Esame colturale dopo centrifugazione (MP 01/207).
- alla *validazione* dei seguenti metodi di prova:
 - Metodo di prova interno per la ricerca di MAP da derivati del latte mediante PCR real time;
 - Metodo di prova interno per la ricerca di MAP da derivati del latte mediante esame colturale.

Sono stati inoltre eseguite:

- Una valutazione comparativa delle performances di kit qPCR del commercio, in parallelo alla metodica qPCR in uso presso il C.D.R., su feci di bovini infetti e negativi e DNA sintetico. Le performances delle metodiche sono risultate comparabili.
- Le prove preliminari di confronto tra metodiche diverse per la ricerca di MAP da tessuti mediante coltura (due diversi metodi 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 metodica più sensibile è risultata quella utilizzata per la ricerca di MAP da carni macinate (Okura, 2011), sulla quale si sta procedendo alla validazione.
- Una valutazione comparativa della metodica innovativa *digital PCR* (dPCR), da utilizzare per rilevare e quantificare il numero di MAP presenti in un campione biologico. Per questo scopo, i risultati di due differenti sistemi dPCR (QX200 Bio-Rad e Quant Studio 3D Applied Biosystems) sono stati confrontati con quelli ottenuti con la qPCR già sviluppata e validata ed in uso presso il C.D.R.. I limiti di rilevamento e di quantificazione di tutti gli approcci PCR applicati nello studio sono stati determinati utilizzando DNA genomico e sospensioni batteriche pure. I risultati ottenuti con le tre metodiche sono stati confrontati mediante regressione lineare e Bland & Altman analisi. I risultati suggeriscono come, per MAP, la qPCR rilevi mediamente 0.3 Log₁₀ di batteri in più rispetto ad

entrambi i sistemi dPCRs ($p = 0,006$ e $0,003$). Studi ulteriori sono necessari per confermare questi risultati, soprattutto perché la quantificazione mediante qPCR necessita di standard ben definiti, al momento non disponibili. I risultati dell'indagine sono stati sottmessi per la pubblicazione alla rivista *Frontiers in Microbiology* e sono in corso di valutazione.

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 IIZZSS 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 C.D.R. 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 IIZZSS 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 IIZZSS, 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 **35.470 esami**, di cui:

Sierologici	33.726
Microbiologici	760
PCR	984

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 C.D.R. 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 C.D.R.

E' stato organizzato dal C.D.R. un circuito interlaboratorio per la diagnosi sierologica (ELISA e/o AGID) su siero di sangue e latte di bovino e siero di bufalo, a cui hanno aderito 41 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 saranno spediti il 17.10.2016, con scadenza prevista per l'inserimento dei risultati 18.11.2016.

Il C.D.R. 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 e il report del ring test saranno disponibili presso il C.D.R. e sul sito IZSLER.

5) ring test a cui ha partecipato il personale del C.D.R.

Il C.D.R. ha partecipato a:

- 2 prove interlaboratorio (ottobre 2015, gennaio 2016), organizzate a livello europeo, per esame sierologico su siero di sangue bovino mediante ELISA (Ente organizzatore: QA Veterinary Laboratory Agency - UK). I risultati sono stati corretti nel 100% dei casi.
- 1 prova interlaboratorio (marzo 2016), organizzata a livello europeo, per esame sierologico su siero di sangue e latte bovino mediante ELISA (Ente organizzatore: GD Animal Health – Deventer, NE). I risultati sono stati corretti nel 100% dei casi.
- 1 prova interlaboratorio (gennaio 2016), organizzata a livello europeo, per coltura e PCR su feci (Ente organizzatore: QA Veterinary Laboratory Agency - UK). I risultati sono stati corretti nel 100% dei casi.
- 1 prova interlaboratorio (agosto 2016), organizzata a livello europeo, per coltura e PCR su feci (Ente organizzatore: QA Veterinary Laboratory Agency - UK) (prove in corso).

Epidemiologia

1) creazione banca dati

Relazione annuale 2015-2016 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)

E' stata realizzata una banca dati sulle caratteristiche genotipiche dei ceppi di campo isolati presso il C.D.R. o ricevuti da altri IIZZSS o Enti di ricerca.

Il C.D.R sta valutando la possibilità di inserire queste informazioni nel website dell'IZSLER, 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, è stata implementata all'interno del Sistema Informativo Veterinario (<https://www.vetinfo.sanita.it/>) la funzionalità per la gestione informatica delle attività previste dalle Linee Guida, in particolare per la registrazione di:

- casi clinici, ai fini della certificazione per l'esportazione nei Paesi terzi che richiedono l'assenza di casi clinici;
- 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", approvate in Conferenza Stato Regioni il 17 ottobre 2013 (G.U. 19.11.2013), 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.

Gli allevamenti negativi possono volontariamente aderire al Piano di Certificazione, mentre gli allevamenti infetti possono applicare, sempre volontariamente, un Piano di Controllo, basato sull'adozione di misure di biosicurezza e di opportuni test diagnostici.

Di seguito viene riportato lo stato di applicazione delle Linee Guida a livello Nazionale, ove risulta che tutte le Regioni, ad eccezione del Molise, le hanno recepite.

Viene inoltre riportato il riferimento al relativo documento di recepimento.

Regione	Riferimento
Abruzzo	Determinazione n. DG 21/206 del 21.11.2013
Basilicata	Deliberazione della Giunta Regionale 17 novembre 2015, n. 1476
Calabria	Decreto del Commissario ad Acta n.47 del 21/05/2015
Campania	Deliberazione della Giunta Regionale n. 657 del 30/12/2013
Emilia-Romagna	Deliberazione della Giunta Regionale N. 2100 del 30/12/2013
Friuli Venezia Giulia	Deliberazione della Giunta regionale N. 916 del 15/05/2015
Lazio	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.
Liguria	Deliberazione della Giunta Regionale n. 644 del 30/05/2014
Lombardia	DDGN N°6845 del 18/07/2013 Piano regionale di controllo e certificazione nei confronti della paratubercolosi bovina
Piemonte	Deliberazione della Giunta Regionale n. 15-7093 del 10/02/2014
Marche	Deliberazione della Giunta Regionale n. 116 del 3/10/2016
Molise	Non ancora adottate
Puglia	Deliberazione della Giunta Regionale n. 2567 del 30/12/2013

<i>Sardegna</i>	<i>Deliberazione della Giunta Regionale N. 27/10 del 15.7.2014</i>
<i>Sicilia</i>	<i>Decreto Assessoriale 23/02/2015</i>
<i>Toscana</i>	<i>Deliberazione della Giunta Regionale 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 della Giunta Regionale n. 819 del 7 luglio 2014</i>
<i>Valle d'Aosta</i>	<i>Deliberazione della Giunta Regionale n. 14 del 10/1/2014</i>
<i>Veneto</i>	<i>Deliberazione della Giunta Regionale 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 riferimento nazionale per la paratubercolosi (http://www.izsler.it/izs_bs/s2magazine/index1.jsp?idPagina=441).

Tra le criticità dalla applicazione delle Linee Guida nazionale segnaliamo:

1. La sottonotifica dei casi clinici in relazione ai dati di prevalenza stimata sul territorio nazionale (vedi punto 4.a). Questo potrebbe essere, almeno parzialmente, dovuto al fatto che gli allevatori tendono ad anticipare la macellazione dei capi positivi, in particolare quelli con elevati valore S/P, prevenendo la comparsa dei sintomi clinici.
2. Il basso livello di applicazione delle linee guida dove l'industria lattiero-casearia non supporta l'applicazione di piano di controllo e certificazione. In assenza di supporto e stimolo da parte dell'industria, solo gli allevatori più motivati e con specifici interessi commerciali aderiscono al *Piano volontario per l'assegnazione della qualifica sanitaria degli allevamenti nei confronti della paratubercolosi bovina*.
3. Coinvolgimento delle associazioni di allevatori
Attualmente i test diagnostici (sierologia ELISA) 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

possono essere utilizzati nell'ambito dei piani di gestione sanitaria a determinate condizioni:

- Il servizio di analisi deve essere 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. E' noto che latte e siero sono sovrapponibili come sensibilità, ma potrebbero non essere contemporaneamente positivi, al contrario raggiungono il picco in momenti diversi della lattazione. La presenza di esiti discordanti può creare confusione e demotivare l'allevatore e necessita quindi di un supporto interpretativo;
 - 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.
 - i laboratori devono essere accreditati. Il C.D.R. può organizzare un ring test specifico per le ARA che eseguono l'analisi, in caso di necessità.
4. La presenza di sospette, seppur rare, false positività ai test sierologici ELISA utilizzati per l'assegnazione delle qualifiche sanitarie. La scelta di questa strategia è stata basata sull'economicità e sulla conseguente sostenibilità economica del sistema e sulla dichiarata specificità media del test (98-99%). Tuttavia, la segnalazione di positività in allevamenti precedentemente negativi, in assenza di introduzione di animali e con esito negativo ai test di conferma in PCR su feci, fanno pensare che le false positività siano più frequenti di quanto atteso. Inoltre, in letteratura si segnalano reazioni falsamente positive a causa di sensibilizzazione per avvenuta prova tubercolinica nei 3 mesi precedenti il prelievo.

Alla luce delle criticità rilevate, il C.D.R. elaborerà una proposta di modifica/integrazione delle Linee Guida Nazionali (vedi Programmazione attività, punto 3. Studio, sviluppo e gestione di sistemi di sorveglianza, verifica e controllo, pag 32).

Relativamente allo stato di applicazione delle qualifiche previste dalle Linee Guida, si riportano di seguito i dati relativi alle qualifiche presenti in BDN per le singole Regioni.

<i>Regione</i>	<i>PT0</i>	<i>PT1</i>	<i>PT2</i>	<i>PT3</i>	<i>PT4</i>	<i>PT5</i>
<i>Abruzzo</i>						
<i>Basilicata</i>			3			
<i>Calabria</i>						
<i>Campania</i>	558					
<i>Emilia-Romagna</i>	5492	44	9	1	0	0
<i>Friuli Venezia Giulia</i>			1			
<i>Lazio</i>						

<i>Liguria</i>						
<i>Lombardia</i>	5723 (di cui 3405 PTEX)	567	303	22	5	7
<i>Piemonte</i>	9584	128	141			
<i>Marche</i>						
<i>Molise</i>						
<i>Puglia</i>						
<i>Sardegna</i>	2839	53	123			
<i>Sicilia</i>	1636		398			
<i>Toscana</i>						
<i>Trentino-Alto Adige</i>	203	120	936	87		
<i>Umbria</i>						
<i>Valle d'Aosta</i>			872			
<i>Veneto</i>	696		223			

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.

Ad oggi hanno aderito al Piano 4.309 allevamenti su un totale di 6.627 registrati in BDN, pari al 65.0%.

Di questi, 3.405 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 79.0% degli allevamenti aderenti al Piano e al 51.4% del totale.

Relazione annuale 2015-2016 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)

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, 567 allevamenti (13,2% degli aderenti e 8.6% del totale) hanno raggiunto la qualifica PT1 (allevamenti a basso rischio), 303 (7.0% degli aderenti e 4.6% del totale) hanno ottenuto la qualifica PT2 (allevamento negativo) e 34 hanno avuto la qualifica di allevamento certificato (rispettivamente, 22 allevamenti PT3, 5 allevamenti PT4 e 7 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 C.D.R..

Nel 2016 si osserva un trend positivo del numero di aziende che richiede e acquisisce le qualifiche rispetto agli anni precedenti (2014-2015). Questo risultato è stato ottenuto grazie al ruolo attivo delle ASL e di IZSLER, che hanno coinvolto i caseifici maggiormente interessati all'export e organizzato incontri tra rappresentanti dell'industria di trasformazione, allevatori afferenti, veterinari ASL e liberi professionisti.

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 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.

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

Da segnalare comunque alcune iniziative:

- in provincia di Piacenza, il C.D.R. ha coinvolto attivamente 4 caseifici, gli allevamenti conferenti e i rispettivi veterinari aziendali. Gli allevamenti hanno approfondito il loro stato sanitario in autocontrollo, quindi gli allevamenti negativi o a basso rischio hanno avviato e per la maggior parte raggiunto le procedure per la richiesta di qualifica sanitaria.
- In provincia di Bologna, da parte di alcuni veterinari AUSL, con arruolamento di allevamenti tramite caseifici interessati all'export.

Nella tabella seguente è riportata la situazione delle qualifiche sanitarie registrate in BDN al 25/10/2016.

AUSL	Totale allevamenti	PTC Con Casi Clinici	PT0 Senza Casi Clinici	PT1 A Basso Rischio	PT2 Negativo	Pt3 Libero
PIACENZA	702	0	637	33	4	0
PARMA	1460	0	1426	2	2	0
REGGIO EMILIA	1270	0	1240	4	1	0
MODENA	1013	0	993	0	0	0
IMOLA	95	1	77	0	0	0
BOLOGNA	449	2	405	4	2	1
FERRARA	93	0	86	0	0	0
RAVENNA	152	0	139	1	0	0
FORLI'	196	1	179	0	0	0
CESENA	179	0	170	0	0	0
RIMINI	156	0	140	0	0	0
Totale	5765	4	5492	44	9	1

Fonte: BDN aggiornamento al 25/10/2016

A differenza di altre regioni, 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, purchè l'invio al laboratorio IZS sia 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 10⁴/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 circa 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.

L'IZSVE fornisce consulenza alle aziende infette che vogliano 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.izsvnezie.it/images/stories/Pdf/Temi/LG_in_VET2_paratubercolosi.pdf

Il parere del C.D.R. sul Piano della Regione Veneto, anche sulla base di precedenti esperienze in Regione Emilia Romagna, è che la PCR dal latte di massa sia uno strumento poco sensibile (elevato limite di sensibilità) e poco robusto (incostanza di risultati su campioni ripetuti), scarsamente correlato alla prevalenza di infezione in azienda. Il campionamento sporadico è pertanto poco rappresentativo del livello di rischio aziendale.

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, con la D.G.R N. 15-7093 del 10/02/2014 che ha recepito le linee guida ministeriali e le successive istruzioni operative trasmesse alle ASL in data 17/04/2014;

In particolare sono stati disposti:

- il prelievo su sospetti clinici riscontrati al macello.

- la visita clinica su tutti gli allevamenti da riproduzione (10.000 allevamenti circa) 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.

Sono state sottoposte a visita clinica 9584 aziende per la verifica dell'assenza di casi clinici (PT0).

La richiesta di adesione al piano di certificazione è avvenuta da parte di 337 aziende (3,5%) che, sottoposte a campionamento mediante protocollo S1, hanno ottenuto le seguenti qualifiche:

- 141 allevamenti sono risultati negativi (42%) (PT2);
- 128 allevamenti sono stati classificati come PT1 (38,6%);
- 68 (19,4%) allevamenti, dimostrando una sieroprevalenza superiore al 5%, sono rimaste al livello PT0.

Su 17.018 capi testati, si è registrato il 2.67% di capi positivi.

E' stata riscontrata una situazione epidemiologica significativamente più favorevole negli allevamenti di piccole dimensioni (< 50 capi presenti).

40 allevamenti hanno avuto segnalazioni di sospetti clinici (56 capi); 29 sospetti sono stati confermati (relativi a 25 allevamenti, due allevamenti hanno avuto più casi clinici).

Al controllo sierologico (2.595 capi) negli allevamenti con casi clinici, la siero-prevalenza media è risultata del 7,63%.

I casi clinici hanno riguardato prevalentemente allevamenti 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 (40% dei casi clinici appartengono ad allevamenti che praticano l'alpeggio).

3.f Piano regionale di controllo e assegnazione delle qualifiche sanitarie nei confronti della Paratubercolosi bovina nella Provincia Autonoma di Trento

In data 12/07/2016 il dott. Vittorio Dorigoni (Servizio Politiche sanitarie e per la non autosufficienza della Provincia Autonoma di Trento) ha convocato una riunione a cui ha partecipato il C.D.R per la paratubercolosi (N.Arrigoni), l'Azienda provinciale per i servizi sanitari (APSS) e l'IZSVE, per valutare le possibili modalità di attuazione del Piano provinciale della paratubercolosi nell'anno 2017.

A partire dall'anno 2017 infatti non si effettueranno più le profilassi individuali su sangue per brucellosi, leucosi e, ove possibile, per IBR e si utilizzerà il latte di massa con un significativo risparmio economico.

Conseguentemente risulta difficile continuare il "Piano di controllo della paratubercolosi (malattia di Johne) negli allevamenti bovini" che viene eseguito (deliberazione della Giunta provinciale n. 2509 del 30/12/2005) mediante test ELISA su sangue individuale, come previsto dalle linee guida nazionali.

Le linee guida non prevedono l'utilizzo del latte di massa per l'acquisizione o il mantenimento delle qualifiche, ma solo del latte individuale. Si vuole, pertanto, trovare una soluzione alternativa per evitare di perdere le qualifiche acquisite dagli allevamenti, vanificando il lavoro fatto finora.

Al fine di salvaguardare l'applicazione delle linee guida per la paratubercolosi senza un aggravio dei costi previsti si è concordato:

- di utilizzare il sangue nelle stalle dove è già previsto il prelievo di sangue per il controllo dell'IBR (allevamenti con capi positivi IBR o vaccinati IBR);
- di utilizzare il latte dei controlli funzionali nelle rimanenti stalle (il 98% degli allevamenti aderisce ai controlli funzionali);
- che l'utilizzo dei suddetti campioni di latte è subordinato alla stipula di un protocollo tra Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari e Federazione Provinciale Allevatori che individui precisamente le modalità di identificazione, di raccolta e invio dei campioni di latte all'IZSVe;
- di monitorare il latte di massa per la validazione del sistema (evitare alterazione dei campioni) e a scopo sperimentale (sviluppo nuovi metodi di concentrazione anticorpi).

Si è ribadita l'importanza del piano di gestione sanitaria ai fini di una riduzione del rischio, in particolare nelle aziende positive. Il piano di gestione sanitaria è stato realizzato in circa 60 aziende ad opera del personale IZSVe e APSS. Nelle stalle dove è stato già formalizzato verrà verificata l'applicazione delle misure prescritte per limitare il rischio di introduzione e diffusione dell'infezione. Il mancato rispetto delle misure potrebbe essere valutato negativamente ai fini della condizionalità.

Il Piano di gestione sanitaria verrà predisposto o verificato (ove già presente) dai veterinari dell'APSS in tutti gli allevamenti positivi (circa 120). Si è auspicato un maggiore coinvolgimento dei veterinari convenzionati, in particolare per l'applicazione del piano di gestione sanitaria.

3.g Manuali per il Controllo della Paratubercolosi

Sono a disposizione sul sito del C.D.R. 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

Relazione annuale 2015-2016 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)

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, relativamente al **patrimonio bovino**.

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.

Relativamente al **patrimonio ovi-caprino**, si riportano di seguito i dati presentati in occasione del 7° Congresso nazionale sulla Paratubercolosi, raccolti nell'ambito del Progetto PON_01-1841 EPISUD.

Regione	Anno	Prevalenza apparente aziende	Prevalenza apparente animali	Metodologia
Puglia	2013-14	Ovi-caprine 60.5%	Ovini 3% (n:272408) Caprini 14.5%(n:51582)	ELISA individuale
Sicilia	2013-14	Ovini 64.2% (n:293) Caprini 56.9% (n:144)	Ovini 4,4% (n:35.385) Caprini 3,6% (n:12.101)	

Si rileva una elevata prevalenza di aziende infette, in particolare nel patrimonio caprino, che risulta essere particolarmente sensibile all'infezione, come segnalato dalla letteratura.

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	2016
Piemonte				7	7	2
Emilia-Romagna				1	1	1
Sardegna	4	1	1	2	2	2
Toscana				1		
Trento				6	4	2
ITALIA	4	1	1	17	14	7

Fonte: SIMAN: Dati aggiornati al 30/09/2016

Da sottolineare una scarsa segnalazione di casi clinici rispetto alla diffusione della malattia sul territorio nazionale, problema già analizzato ai punti precedenti.

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 2012/001: "Creazione di un sistema informativo integrato per la paratubercolosi" (Responsabile scientifico: N.Arrigoni). Il progetto ha avuto inizio il 1.10.2013 ed è terminato il 30.03.2016 (prorogato). Il progetto è nato dalla necessità di una adeguata formazione e sensibilizzazione sia dei veterinari liberi professionisti che pubblici, ai fini dell'applicazione puntuale della sorveglianza prevista dalle Linee guida e ai fini della redazione corretta di piani di biosicurezza aziendali. Infatti, per promuovere l'adozione volontaria e a lungo termine di piani di controllo, veterinari e allevatori devono essere formati relativamente alla valutazione del rischio e alle conseguenti misure gestionali atte ad evitare l'introduzione e la diffusione dell'infezione in allevamento. Per semplificare e quindi favorire l'esecuzione dell'analisi del rischio e la raccolta dati, si è quindi ritenuto opportuno realizzare strumenti informatici innovativi, da utilizzare direttamente in azienda.

Gli obiettivi principali del Progetto di Ricerca erano i seguenti:

- creazione di un applicativo informatico per dispositivi mobili (tablet) per la valutazione del rischio negli allevamenti italiani, in accordo con i Manuali per il controllo della paratubercolosi riportati dalle Linee guida nazionali;
- realizzazione di materiale didattico/divulgativo, sia cartaceo che informatico, allo scopo di sensibilizzare e fornire le nozioni di base agli allevatori;
- formazione dei veterinari del Servizio Sanitario nazionale e liberi professionisti attraverso corsi di formazione a distanza (FAD) e corsi frontali.

Per raggiungere i suddetti obiettivi, sono stati elaborati gli strumenti e il materiale didattico/divulgativo qui di seguito elencati:

- Software “iRAMP” (italian Risk Assessment and Management Planning) per tablet (Android, iOS, Windows), una applicazione web che permette la raccolta standardizzata dei dati aziendali e semplifica l’esecuzione della valutazione del rischio in campo attraverso l’utilizzo di una check list guidata. L’applicazione prevede inoltre uno strumento di programmazione gestionale che aiuta il veterinario nella stesura del piano di gestione sanitaria aziendale, elaborando automaticamente raccomandazioni e fornendo allo stesso tempo informazioni e nozioni chiave sulla paratubercolosi. Il software, corredato di istruzioni per l’uso, è liberamente accessibile all’interno del sito del centro di riferimento;
- E’ stato prodotto un video divulgativo sulla paratubercolosi per gli allevatori, allo scopo di sensibilizzarli al problema della paratubercolosi, fornendo le nozioni di base sull’impatto dell’infezione nell’allevamento di bovine da latte e sulle principali misure di biosicurezza necessarie per il controllo dell’infezione. Il video è disponibile gratuitamente su Youtube come “*tutorial paratubercolosi*”;
- Sito internet didattico/divulgativo per gli allevatori. E’ stato realizzato un sito internet interattivo per la sensibilizzazione e la formazione degli allevatori, utilizzando come riferimento l’esperienza dell’Università del Wisconsin (USA);
- Corso di formazione a distanza (FAD) sulla paratubercolosi. È stato realizzato un corso FAD sulla paratubercolosi per i veterinari del Servizio Sanitario Nazionale, i veterinari liberi professionisti, i biologi e il personale tecnico IZSLER. Al corso, relativo sia agli aspetti generali della malattia, che al contenuto delle Linee Guida Nazionali, hanno partecipato oltre 1200 discenti.
- Tutti gli strumenti sono stati presentati a diversi eventi formativi (VI Congresso nazionale sulla paratubercolosi a Brescia, 28/11/2013; 4th ParatbForum presso EFSA, Parma 21/6/2014; 12th International Colloquium on paratuberculosis, Parma, 22-26/6/2014; VII Congresso nazionale sulla paratubercolosi, Piacenza, 20/11/2015).

Gli strumenti messi a punto nell’ambito del progetto di ricerca mirano a formare e ad informare i portatori di interesse sulle problematiche inerenti la malattia e il controllo in allevamento, stimolandoli all’applicazione di piani di controllo efficaci. L’utilizzo dell’applicativo iRAMP permetterà ai veterinari aziendali di elaborare con maggiore facilità piani di gestione sanitaria standardizzati, in accordo con l’allevatore e sotto la supervisione dei Servizi Veterinari. Sarà possibile inoltre monitorare la prevalenza e l’incidenza annua di animali infetti e malati, integrando i risultati dell’analisi del rischio con dati quantitativi. Il sistema informativo, se alimentato con i dati forniti dai veterinari liberi professionisti e pubblici, potrà permettere la raccolta dei dati relativi alla distribuzione degli allevamenti in base alla classe di rischio, consultabili attraverso una dashboard dedicata. L’applicativo potrà inoltre essere utilizzato da parte dei Servizi Veterinari per validare i piani di

gestione sanitaria ed attingere ad informazioni utili a certificare l'assenza di casi clinici e/o il livello di rischio associato ad ogni allevamento, sulla base della classificazione prevista dalle Linee Guida.

- 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 stato quello di 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 35 ceppi di MAP provenienti da diverse specie e fonti di isolamento, oltre a ceppi di riferimento ATCC. Sono stati inoltre analizzati ceppi appartenenti al gruppo *Mycobacterium avium* complex, come *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *silvaticum* e *M. intracellulare*. L’approccio metodologico con MALDI-TOF, soprattutto se accoppiato con Principal Component Analysis (un’analisi che permette di considerare solo le differenze principali), si è rivelato in grado di differenziare i ceppi analizzati, sia a livello di specie (*M. intracellulare*), sia a livello di sub-specie (MAP, *M. avium* subsp. *avium* e *M. avium* subsp. *silvaticum*). Un altro aspetto indagato è stato quello relativo ad un possibile utilizzo della MALDI-TOF come metodica di sub-tipizzazione dei ceppi di MAP. I dati non sembrano promettenti. In questo senso, una possibile soluzione potrebbe essere utilizzare un approccio manuale per la determinazione dei picchi a bassa intensità, che potrebbero fornire informazioni utili ad una sub-tipizzazione. I risultati parziali del progetto sono stati presentati al Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. (Montesilvano, PE, 2015). I risultati completi del progetto sono stati presentati al 13th International Colloquium on Paratuberculosis (vedi pubblicazioni n.5). Infine, i dati ottenuti sono stati utilizzati per un articolo scientifico che è stato sottoposto alla rivista Journal of Applied Microbiology (in corso di valutazione).
- Progetto di ricerca corrente IZS LE 2013/016: “Paratubercolosi bovina: valutazione dell’impatto economico e dei parametri di benessere in allevamenti infetti” (Responsabile scientifico: N. Arrigoni). Il progetto, in collaborazione con l’Università degli Studi di Bologna, ha avuto inizio il 1.10.2014 e terminerà il 30.9.2017. Il progetto ha i seguenti obiettivi e risultati parziali:
 - 1) verificare la possibile correlazione tra infezione paratubercolare e riduzione dei parametri produttivi. La paratubercolosi provoca ingenti perdite economiche nel settore delle bovine da latte, inoltre, la preoccupazione riguardo il possibile ruolo zoonotico di MAP come agente patogeno di origine alimentare, data la contaminazione di alimenti di origine animale (in particolare dei prodotti lattiero-caseari), ha portato alcuni paesi extra-UE a richiedere specifiche garanzie per la paratubercolosi bovina (bPTB) negli scambi commerciali. La

quantificazione dell'impatto economico dell'infezione da MAP è essenziale per promuovere l'adozione di piani di controllo volontari da parte degli allevatori (Tamba et al., 2014b). La maggior parte degli studi è stata condotta negli Stati Uniti e nei paesi del Nord Europa: questi paesi sono caratterizzati da un diverso clima, sistema produttivo e normativo nei confronti della bPTB. Lo scopo del progetto è la valutazione delle perdite economiche dovute alla presenza di paratubercolosi in un allevamento di bovine da latte in Emilia-Romagna. Da novembre 2014 a maggio 2016, gli animali di età superiore a 36 mesi sono stati testati per MAP utilizzando un test ELISA sul siero con cadenza semestrale, e un test microbiologico (coltura fecale) su campioni di feci prelevati con cadenza annuale. I risultati di due indagini sierologiche (ELISA su siero individuale) condotte nel 2012 e nel 2013 sono stati integrati per definire animali MAP-positivi e MAP-negativi. Per la coorte di animali selezionata abbiamo raccolto e monitorato dati su un periodo di 10 anni (2006-2016). I dati anamnestici (marca auricolare, sesso, razza, movimentazioni, data di nascita, di morte o di macellazione) sono stati ricavati dalla Banca Dati Nazionale (BDN). I dati sulla produzione di latte effettiva, la composizione del latte, i dati sanitari (diagnosi di mastite, parametri di fertilità) e la causa di morte o macellazione, sono stati ottenuti dal database dell'azienda (AFIFARM). Il peso e il valore delle carcasse stati estratti dalle banche dati di due macelli. I dati sono stati analizzati utilizzando R, Microsoft Excel e Microsoft Access. La popolazione dello studio comprendeva un totale di 120 vacche (45 MAP-positivo e 75 MAP-negativo) per lo più di razza Frisona. La produzione media totale di latte ($19.758,37 \pm 9.467,61$ contro $26.800,47 \pm 15.752,88$ Kg), l'età media di abbattimento (4,4 contro 6,1 anni), e il peso medio della carcassa (273,56 contro 316,57 kg) erano significativamente inferiori ($p < 0.005$) nelle vacche infette rispetto agli animali negativi. Inoltre, gli animali MAP-positivi avevano un rischio di morire in stalla otto volte maggiore rispetto agli animali negativi (RR= 8,33; IC95% 1,01-69,08; $p < 0.05$). Abbiamo usato un foglio di calcolo per quantificare l'impatto economico della bPTB dovuto a queste differenze nell'allevamento. In media, per ogni animale infetto, abbiamo stimato un mancato guadagno di 3340,06 Euro: questa perdita era dovuta alla minor produzione media totale di latte (-3207,16 Euro), e al minor valore medio delle carcasse (-132,90 Euro). Inoltre, ulteriori perdite medie annue state stimate essere (i) 7.200 Euro/anno, dovuti ai maggiori costi per l'acquisto di rimonta legati alla minor durata media della vita produttiva delle vacche infette e (ii) 1162,14 Euro/anno, a causa dei costi legati alla mortalità (costi di smaltimento delle carcasse e mancata resa al macello). Questo è il primo studio sull'impatto economico dell'infezione da MAP nel settore delle bovine da latte nel Sud Europa, e conferma che l'impatto economico della bPTB sulla redditività aziendale è principalmente dovuto alla minor produzione latte, alla riduzione del valore delle carcasse, alla mortalità e ad una maggiore quota di rimonta dovuta alla minore durata della vita produttiva degli animali infetti,

come riportato in letteratura. I nostri risultati indicano che l'infezione da MAP può causare notevoli perdite economiche nel settore delle bovine da latte. Inoltre, se l'ipotesi del ruolo di MAP come agente zoonotico fosse confermata, sarebbero probabili ulteriori perdite economiche. Il controllo della bPTB può non solo migliorare la salute e il benessere degli animali, ma anche aumentare la redditività complessiva dell'allevamento. Queste valutazioni economiche dovrebbero essere ulteriormente approfondite e comunicate per promuovere l'attuazione di programmi di controllo volontario in Italia.

- 2) verificare la possibile correlazione tra infezione paratubercolare ed alterazione dei parametri immunologici e metabolici, che possono costituire una condizione predisponente ad altre malattie, attraverso la raccolta di dati clinici ed analitici (come ad esempio gli indicatori di stress) negli animali negativi e infetti. L'ipotesi di verificare il ruolo predisponente dell'infezione da MAP nei confronti di altre malattie tipiche del peri-parto (mastite, metrite, zoppia, febbre, ecc), è stata fino a questo momento parzialmente soddisfatta. Il numero limitato di casi e controlli esaminati (13 su 30 previsti) non ha permesso di raggiungere una significatività statistica, anche se il valore di LFI (Liver Functionality Index), maggiormente negativo nelle bovine infette da MAP rispetto ai controlli, tenderebbe a confermare l'assunto iniziale. La riforma dei soggetti "caso" è ovviamente influenzata dalle scelte dell'allevatore, che, se non costretto da patologie concomitanti, tende ad utilizzare l'animale per tutto il picco della lattazione, prima di venderlo come animale da macello. Gli animali MAP positivi, risultando in generale meno produttivi, vengono preferibilmente riformati anticipatamente dall'allevatore in caso di malattie concomitanti, quali mastiti, zoppie e altro, piuttosto che essere sottoposti a terapie. Diversamente, i soggetti MAP negativi, vengono trattati per le varie patologie del peri-parto, con l'obiettivo di raggiungerne la guarigione clinica e consentirne il mantenimento nel ciclo produttivo; questo comporta un maggior consumo di farmaco in tali animali. Considerando il periodo di studio (primi 100 giorni di lattazione), sui 13 casi di bovine infette, ben 6 hanno avuto una patologia concomitante che ne ha decretato la riforma, rispetto a 3 bovine riformate nel gruppo dei controlli. Dei restanti 10 controlli che hanno terminato la lattazione, 7 sono stati trattati per patologie concomitanti, giustificando l'elevato consumo di farmaco nel gruppo di controllo. Dai dati fin qui raccolti, emerge che lo stato di benessere nell'azienda campionata non è ottimale per entrambi i gruppi oggetto di studio, ma per i soggetti MAP positivi la situazione risulta peggiore, con aumento della percentuale di riforma e relativa perdita di produzione latte. Si attende il raggiungimento del numero prefissato dei soggetti caso e controllo, per completare l'elaborazione dei dati.

Progetto di ricerca corrente IZS LE 2014/013: “Epidemiologia ed ecosistema dei Micobatteri presenti in Italia: *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. microti*” (Responsabile scientifico: M.L. Pacciarini). Il progetto ha avuto inizio il 1.11.2015 e terminerà il 31.10.2018. MAP è un organismo caratterizzato da una lenta crescita e da scarsa variabilità genetica. Uno degli obiettivi del progetto sarà quello di valutare gli eventuali cambiamenti che si verificano nel genoma di MAP in un’azienda naturalmente infetta. A tal fine, ceppi isolati da vacche provenienti dalla stessa azienda e in diversi anni (2012 - 2016) saranno sottoposti ad analisi Whole Genome Sequencing (WGS). La prima parte del progetto è stata impiegata per la messa a punto di una metodica di estrazione in grado di garantire il recupero di un’elevata quantità di DNA di MAP (nell’ordine dei 100 µg) di elevata qualità (ratio 260/280 >1,8). Una volta messo a punto il sistema di estrazione, abbiamo estratto il DNA da circa 40 ceppi e l’analisi WGS è tuttora in corso. Seguirà l’analisi dei dati con idonei strumenti informatici, allo scopo di cogliere differenze e analogie fra i genomi dei ceppi, in modo da evidenziare come e se il genoma di MAP in caso di infezione naturale possa evolvere.

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

- Progetto di ricerca corrente IZS UM 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 15.05.2017 (prorogato).
- Progetto di ricerca corrente IZS PLV 2014/109: “Dalla genetica all’epigenomica: studio delle interazioni DNA-proteina e modificazioni della cromatina in modelli di malattie infettive animali” (Responsabile scientifico: S. Peletto). Il progetto è iniziato il 1.10.2015 e terminerà il 30.09.2018.

Ricerca Finalizzata

Nulla da segnalare.

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

Il CNR (Resp. U.O. N. Arrigoni) ha partecipato ad una call per un progetto Horizon 2020 (type of action RIA, Topic SFS-14-2016, Proposal acronym ENDEMYC, Title: “Interactions between pathogen, host, microbiome and ENvironment, to prevent and control enDEmic diseases caused by MYCobacterium avium spp. paratuberculosis and MYCoplasma bovis in cattle”).

L’obiettivo generale del progetto è quello di migliorare gli strumenti per prevenire e controllare le malattie endemiche causate da due importanti patogeni del bovino: *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP) e *Mycoplasma bovis* (MYB). Questo

obiettivo sarà raggiunto attraverso la produzione di nuove conoscenze sulle caratteristiche delle interazioni tra ospite-patogeno-ambiente, e l'alimentazione di un modello di previsione con le informazioni raccolte. Verranno inoltre sviluppati nuovi strumenti diagnostici e di selezione genetica attraverso la conoscenza della diversità genomica dei patogeni e dell'ospite. Verrà effettuata l'analisi dell'interazione del patogeno con l'ospite, con il suo microbiota e con l'ambiente, utilizzando lo stato dell'arte delle tecnologie -omic e l'approccio con sistemi biologici. Gli obiettivi specifici del progetto sono:

- identificare i geni di resistenza dell'ospite, i geni di virulenza degli agenti patogeni e studiare la loro interazione, usando una combinazione di approcci in-vivo, ex-vivo e in-vitro per determinare la diversità genetica dell'ospite, del patogeno, il microbiota dell'ospite e la loro importanza in caso di infezione naturale.
- modellare le dinamiche di diffusione della malattia sulla base dei dati ambientali, dei fattori legati all'ospite e della variabilità genomica del patogeno e validare il modello sulla base di dati storici. Il risultato sarà uno strumento di previsione dell'impatto bio-economico della malattia;
- sviluppare nuovi metodi di diagnosi da utilizzare in azienda per l'identificazione dell'agente patogeno e per monitorare lo stato di malattia. Il risultato sarà uno strumento rapido per monitorare lo stato di infezione dell'allevamento e la sua epidemiologia;
- trasferire nuove conoscenze ai soggetti interessati (le associazioni allevatori istituzioni che effettuano la sorveglianza veterinaria, industria, ecc) e definire approcci per lo sfruttamento dei risultati del progetto, in linea con le politiche e le strategie attuali di previsione. I risultati saranno strategie di prevenzione e controllo delle malattie oggetto di studio.

La proposta ha passato la pre-selezione ed è stata sottomessa per il secondo step nella nuova versione in settembre 2016 (in corso di valutazione).

Di seguito la lista dei partecipanti al progetto

Participant No	Participant organization name		Country
1 (coordinator)	Università Cattolica del Sacro Cuore**	UCSC	Italy
2	National Veterinary Institute, Technical University of DK**	DTU	Denmark
3	University of Edinburgh, UK**	UEDIN	UK
4	Bern University**	UNIBE	Switzerland
5	Institut National de la Recherche Agronomique**	INRA	France
6	University of Copenhagen**	UCPH	Denmark

7	Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna**	IZSLER	Italy
8	Cardiff University**	UNICAR	UK
9	Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne**	EPFL	Switzerland
10	Universidade Estadual Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho**	UNESP	Brazil
11	Université Grenoble Alpes**	UGA	France
12	University of Adelaide**	UA	Australia
13	SMART solutions srl*	SMART	Italy
14	Parco Tecnologico Padano srl*	PTP	Italy
15	European Federation of Animal Science	EAAP	International

- **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. E' in corso la stesura di un lavoro scientifico.
- E' stata realizzata una ricerca in collaborazione con l'Università degli Studi di Bologna, Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, relativa alla ricerca di MAP dal latte pastorizzato prodotto da 2 diversi stabilimenti di pastorizzazione industriale, situati in due diverse regioni italiane. Sono stati analizzati 160 campioni (ognuno costituito da una bottiglia da un litro) di latte pastorizzato. Sono state utilizzate colture tradizionali da un volume di 500 ml di latte per campione. Non è stata rilevata la presenza di MAP in nessuno dei campioni analizzati. La qualità microbiologica dei campioni analizzati appariva soddisfacente (carica batterica, Enterobacteriaceae e Listeria monocytogenes). Questi risultati dimostrano che sono plausibili 7 log di riduzione logaritmica per la pastorizzazione commerciale. La combinazione di misure igieniche a livello di allevamento garantisce l'assenza di MAP o la sua presenza a livelli molto bassi, suggerendo che il latte pastorizzato non rappresenti una fonte di rischio rilevante di esposizione umana a MAP. I risultati dell'indagine sono stati oggetto di una pubblicazione su Journal of Dairy Science (vedi pubblicazioni, n.2)

Aggiornamento e formazione professionale

Relazione annuale 2015-2016 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)

1) Corsi che il C.D.R. ha organizzato o a cui ha partecipato

- Il C.D.R. (N.Arrigoni) ha partecipato come docente alla tavola rotonda sulla paratubercolosi, il 14 ottobre 2015, in occasione dell'incontro di chiusura del Progetto PON_01-1841 EPISUD, organizzata presso la facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli studi di Bari;
- Il C.D.R. (N.Arrigoni) ha partecipato come docente al Convegno "La paratubercolosi negli animali da reddito: aspetti epidemiologici, diagnostici, piani di controllo e certificazione aziendale", il 15 ottobre 2015, organizzato presso la facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli studi di Bari;
- Il C.D.R. (C.Garbarino) ha partecipato come docente ad un seminario dal titolo "Paratubercolosi: Linee guida per l'adozione di piani di controllo e assegnazione della qualifica sanitaria agli allevamenti e piano di gestione sanitaria" nell'ambito del Corso di Laurea Magistrale in Scienze delle Tecnologie delle Produzioni Animali, Biosicurezza della filiera zootecnica, presso la Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, il giorno 26.11.2015;
- Il C.D.R. (G.Cammi) ha partecipato come docente alla Giornata delle Ricerche, organizzata da IZSLER, a Brescia, il 3.12.2015 per la presentazione dei dati della Ricerca Finalizzata 2009/202;
- Il C.D.R. (N.Arrigoni) ha partecipato come docente ad un corso ECM sulla paratubercolosi, organizzato dall'ASL di Sondrio, il 9.12.2015;
- Il C.D.R. (N.Arrigoni) ha partecipato come docente al convegno "Sanità animale in Valle d'Aosta: facciamo il punto della situazione", organizzato dalla Associazione Regionale Allevatori Valle d'Aosta e dall'ASL di Aosta, ad Aosta, il 5.2.2016 con una relazione dal titolo "Piano Paratubercolosi: perché è importante aderire, la situazione italiana e le attività nelle altre regioni";
- Il C.D.R. (N.Arrigoni) ha partecipato come docente ad un seminario sulla paratubercolosi presso la Scuola di Specializzazione in Clinica Bovina, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino, il giorno 12.2.2016;
- Il C.D.R. (N.Arrigoni) ha partecipato come docente ad un seminario sulla Paratubercolosi presso la Scuola di Specializzazione in Sanità Animale, organizzata dal Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di l'Università di Pisa, il giorno 3.3.2016.
- Il C.D.R. (N.Arrigoni) ha partecipato docente al Corso ECM "Ruolo del veterinario ufficiale nella rilevazione e gestione di malattie animali di particolare rilevanza zoonosica e zootecnica, organizzato da IZSLER in collaborazione con Regione Lombardia, in 2 edizioni (Milano, 9.3.2016 e Brescia, 23.3.2016);
- Il C.D.R. (C.Garbarino) ha partecipato come docente al "II Workshop ovicaprini", organizzato da MDS, a Padova, il 6.5.2016 con una relazione dal titolo "La paratubercolosi negli ovi-caprini";

- Il C.D.R. (N.Arrigoni) ha partecipato come docente al convegno SIVAR “Patologie e dismetabolie ovi-caprine: dalla diagnosi alle strategie di gestione e controllo”, con una relazione dal titolo “La paratubercolosi dei piccoli ruminanti: strategie di gestione e controllo”, organizzato presso l’IZS di Perugia, a Perugia, il 10.6.2016.

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

- Il C.D.R. ha organizzato il 7° Congresso Nazionale sulla Paratubercolosi, (responsabile scientifico e organizzativo: N.Arrigoni), il 20 novembre 2015, a Piacenza. Di seguito viene riportato il programma del convegno e i relatori invitati:

08.30 - 09.00	Registrazione partecipanti e benvenuto delle Autorità
09.00 – 10.30	Paratubercolosi: novità in campo eziopatogenetico Ad Koets (Central Veterinary Institute, Wageningen, NE)
10.30 – 11.00	Epidemiologia molecolare: a che punto siamo? Matteo Ricchi (IZSLER, C.D.R. paratubercolosi)
11.00 – 11.30	Gamma interferon: una prospettiva reale per la diagnosi della paratubercolosi? Piera Mazzone (IZSUM)
11.30 – 12.00	Approcci diagnostici sperimentali: Luminex, Metabolomica, microRNA Nicola Pozzato (IZSVE)
12.00 – 13.00	Attività del C.D.R.: proficiency test e validazione metodi Norma Arrigoni (IZSLER, C.D.R. paratubercolosi)
14.00 – 16.30	TAVOLA ROTONDA: Stato di applicazione delle Linee guida nazionali e ruolo del Centro di riferimento come promotore nel campo della formazione - Moderatori: Luigi Ruocco, Marco Tamba, Norma Arrigoni (IZSLER, C.D.R. paratubercolosi)
16.30 – 17.00	Conclusioni e prospettive – Luigi Ruocco (Ministero della Salute)
17.00	Compilazione questionario apprendimento e questionario soddisfazione discenti

Sono state invitate le Regioni e gli Istituti Zooprofilattici a portare i risultati e le loro esperienze di applicazione delle Linee Guida nazionali.

Sono stati inoltre invitati tutti gli stakeholders (industria, rappresentanti delle organizzazioni, rappresentanti delle istituzioni) per un dibattito sui punti di forza e di debolezza delle Linee Guida nazionali, dopo due anni dalla loro approvazione.

Il C.D.R. ha colto anche l’occasione per fare il punto sulle conoscenze tecnico-scientifiche e fornire un aggiornamento sulla tematica a tutti i partecipanti.

La mattinata, dedicata all’approfondimento degli aspetti più innovativi della ricerca in campo eziopatogenetico e diagnostico, ha visto la partecipazione del prof. Ad Koets, responsabile del Centro di Riferenza Olandese per i Micobatteri del Central Veterinary Institute di Lelystad, nonché professore di Infection Biology presso l’Università di Utrecht.

Nella sua relazione ha illustrato le applicazioni delle possibili vie alternative di controllo della malattia, come la selezione genetica: se applicata come unico intervento in allevamento infetto, si stima che i tempi necessari ad ottenere una riduzione di prevalenza a valori prossimi a zero siano molto lunghi (superiori a 100 anni). L’insieme dei fattori ambientali che determinano l’esposizione sembra invece

essere responsabile dell'85 - 95% della variabilità, ed è pertanto su questi fattori che deve maggiormente concentrarsi lo sforzo per contenere la malattia. La relazione del prof. Koets ha però sfatato alcuni dogmi del controllo della paratubercolosi, segnalando possibili vie di trasmissione (es. bioaerosol) alternative alle vie classiche di infezione (fecale orale) e ridimensionando il rischio legato alla assunzione di colostro in ambiente infetto e alla via verticale.

Il Dott. Ricchi (IZSLER, C.D.R. Paratubercolosi) e il Dott. Pozzato (IZSVE, sezione di Verona) hanno quindi illustrato rispettivamente le ultime novità nel campo della epidemiologia molecolare (subtipizzazione molecolare e NGS) e le nuove frontiere nel campo della diagnostica (Luminex, metabolomica, microRNA). La Dr.ssa Piera Mazzone (IZSUM, Perugia) ha illustrato quindi le performances del test gamma interferon e le sue potenzialità come test a risposta precoce, ritenendolo utile ai fini della valutazione dell'esposizione della rimonta e quindi della bontà delle misure igieniche messe in atto per il controllo dell'infezione. Il test può essere utilizzato per la identificazione degli animali da riformare in allevamento infetto, essendo la positività al gamma-interferon un indicatore di una risposta immunitaria cellulo-mediata efficace e scarsamente prognostico di una progressione della malattia (escrezione fecale e comparsa di segni clinici).

La Dott. N. Arrigoni (IZSLER, C.D.R. Paratubercolosi) ha quindi illustrato le ricerche eseguite nel campo della sicurezza alimentare, illustrando i risultati delle indagini quantitative, eseguite mediante qPCR sul latte di massa delle aziende della regione Emilia Romagna, e i modelli di valutazione del rischio di sopravvivenza di MAP nel latte pastorizzato, nonché gli studi di challenge su formaggi Parmigiano Reggiano / Grana Padano, che hanno dimostrato tempi di riduzione logaritmica di 6-15 giorni, con scomparsa di MAP dal formaggio in 3 - 4 mesi.

Sono quindi stati presentati gli strumenti messi a punto dal Centro di Referenza per la formazione, come un'applicazione da utilizzare su tablet per la valutazione del rischio in allevamento e un film divulgativo per allevatori, già disponibile in rete. Il pomeriggio è stato dedicato a fare il punto sullo stato di applicazione delle linee guida nazionali, adottate ormai da tutte regioni italiane, ma con livelli di adesione differenti. La Regione Lombardia in particolare è stata invitata a presentare il modello virtuoso di sinergia creatasi tra Servizi Veterinari, Istituti Zooprofilattici e liberi professionisti, che ha portato alla adesione di oltre il 50% delle aziende al piano. Da rilevare tra i punti critici la scarsa segnalazione dei casi clinici, che il Ministero della Salute ha sottolineato a chiusura dell'evento, auspicando un rafforzamento della sorveglianza passiva a garanzia della credibilità del sistema.

- Il C.D.R. (C.Garbarino) ha partecipato come relatore al 5th Paratb Forum (19.6.2016, Nantes), con una relazione dal titolo "Bovine Paratuberculosis in Italy: results after the first two years of application of the national guidelines" (vedi pubblicazioni n.3).

- Il C.D.R. (C.Garbarino) ha partecipato al 13th International Colloquium on Paratuberculosis (Nantes, 20-24 giugno 2016) con un poster dal titolo “Sub-typing of *Mycobacterium avium* subsp.*paratuberculosis* strains isolated from wild red deer (*Cervus elaphus*) in northern Italy (vedi pubblicazioni n.4)
- Il C.D.R. (M.Ricchi) ha partecipato al 13th International Colloquium on Paratuberculosis (Nantes, 20-24 giugno 2016) con un poster dal titolo “The use of MALDI-TOF approach for a rapid identification of *Mycobacterium avium* subsp.*paratuberculosis*: preliminary results” (vedi pubblicazioni n.5).
- Il C.D.R. (S.Leo) ha partecipato al XLVIII Congresso della Società italiana di Buiatria, 8-9 settembre 2016, presentando il lavoro “Applicazione delle linee guida per la paratubercolosi in un caseificio sociale produttore di grana padano” (vedi pubblicazioni n.7).

3) Comitati scientifici e gruppi di lavoro a cui ha partecipato il personale del C.d.R.

- Il C.d.R. ha partecipato all’organizzazione del 13th International Colloquium on Paratuberculosis, che si è svolto a Nantes 20-24 giugno 2016 (FR)(Chair: Christine Fourichon, INRA). In particolare N.Arrigoni è stato inserito nel Comitato Organizzatore e M.Ricchi nel comitato scientifico.

Consulenze, attività di docenza, collaborazioni nazionali

1) Consulenze richieste ad esterni

Nulla da segnalare.

2) Consulenze e pareri tecnici forniti ad esterni

- E’ stato realizzato nel corso dell’anno un Material Transfer Agreement con l’Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Sezione di Messina, per la fornitura da parte del Centro di Referenza Nazionale di ceppi di campo da utilizzare nell’ambito di un progetto di ricerca corrente (IZS SI 12/14: “Studio comparativo in vitro dei meccanismi di sopravvivenza di *M.bovis* e *M.avium* subsp.*paratuberculosis*: valutazione precoce, ai fini diagnostici, dei profili di espressione proteica di macrofagi infettati sperimentalmente”).
- Sono state realizzate due tesi:
 - Una tesi di specializzazione (Università degli Studi di Milano, Facoltà di Medicina Veterinaria, Scuola di specializzazione in sanità animale, allevamento e produzioni zootecniche, dello specializzando Simone Leo, dal titolo “Applicazione in campo di piani di controllo per la paratubercolosi bovina: efficacia e benefici” (Correlatore: N.Arrigoni).

- Una tesi di specializzazione (Università degli Studi di Milano, Facoltà di Medicina Veterinaria, Scuola di specializzazione in sanità animale, allevamento e produzioni zootecniche,) della specializzanda Giulia Paternoster, dal titolo “Valutazione delle perdite economiche dovute alla presenza di paratubercolosi in un allevamento di bovine da latte, 2012-2016” (Correlatori: M.Tamba e N.Arrigoni)
- Al C.D.R. 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 C.D.R. ha organizzato o a cui ha partecipato, Convegni/congressi che il C.D.R. ha organizzato o a cui ha partecipato).

Consulenze e collaborazioni europee

- E’ in scadenza un accordo di collaborazione scientifica con il Veterinary Research Institute di Brno (Czech Republic), sede del laboratorio di riferimento OIE per la Paratubercolosi, allo scopo di migliorare le conoscenze sulla diagnostica, sviluppando metodiche innovative e svolgere l’attività di training reciproco per lo sviluppo di attività di ricerca.

Consulenze e collaborazioni internazionali

- Nulla da segnalare.

Pubblicazioni scientifiche e divulgative

Vedi All. 1 (copia del frontespizio).

Su riviste con Impact factor:

1. Ricchi M, Savi R, Bolzoni L, Pongolini S, Grant IR, De Cicco C, Cerutti G, Cammi G, Garbarino CA, Arrigoni N. “Estimation of *Mycobacterium avium* subsp.*paratuberculosis* load in raw bulk tank milk in Emilia-Romagna Region (Italy) by qPCR”. Microbiology open. 2016 Mar 17. doi: 10.1002/mbo3.350. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26991108.
2. Serraino A, Bonilauri P, Giacometti F, Ricchi M, Cammi G, Piva S, Zambrini, AV, Canever A, Arrigoni N (2016): "Investigation into *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in pasteurized milk in Italy", J Dairy Sci. 2016 Nov 2. pii: S0022-

0302(16)30747-0. doi: 10.3168/jds.2016-11627. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27816242.

Su atti di congressi o riviste senza Impact Factor:

3. Arrigoni N, Garbarino C, Boldini M, Ruocco L, Gemma Brenzoni L, Gradassi M, Leo S, Paternoster G, Tamba M. (2016): "Bovine Paratuberculosis in Italy: results after the first two years of application of the national guidelines" (2014): Proceedings of the 5th Paratb Forum, 19.6.2016, Nantes (FR).
4. Garbarino C, Ricchi M, Leo S, Bianchi A, Gaffuri A, Giacomelli S, Savi R, Bertoletti I, Cammi G, Pedrotti L, Arrigoni N (2016): Sub-typing of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis strains isolated from wild red deer (*Cervus elaphus*) in northern Italy, Proceeding 13th International Colloquium on Paratuberculosis, Nantes (FR) 20-24 giugno 2016, 68.
5. Ricchi M, Mazzearelli A, Di Caro Antonino, Savi Roberto, Leo Simone, Cammi Giuliana, Garbarino C, Arrigoni N (2016): The use of MALDI-TOF approach for a rapid identification of MAP: preliminary results. Proceeding 13th International Colloquium on Paratuberculosis, Nantes (FR) 20-24 giugno 2016, 102.
6. Leo S, Calamari L, Arrigoni N, Garbarino C, Ricchi M, Amadori M (2016): Effects of paratuberculosis infection on welfare parameters of dairy cows: preliminary results; LXX Convegno SISVET, Palermo, 13-16 giugno 2016.
7. Leo S, Zago C, Garbarino C, Calza L, Cammi M, Perazzi M, Idropici E, Arrigoni N (2016): Applicazione delle linee guida per la paratubercolosi in un caseificio sociale produttore di grana padano XLVIII Congresso della Società italiana di Buiatria, 8-9 settembre 2016, www.rivistabuiatria.it.

Sito Web

Il sito, ove sono disponibili le informazioni relative alla malattia, i manuali per il controllo, le informazioni sulle attività del C.D.R. (formazione, ring test), e l'archivio fotografico, è stato aggiornato con le disposizioni normative relative alle Linee guida, e relativi decreti applicativi regionali.

Sul sito sono inoltre disponibili:

- 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)
- la versione italiana di un filmato divulgativo per allevatori, in cui sono illustrate le modalità di diffusione e di controllo dell'infezione. Il filmato è disponibile al link <https://www.youtube.com/watch?v=PNWmho9XMxQ>, come "tutorial paratubercolosi.

- una App per la valutazione del rischio in allevamento (iRAMP, Italian Risk Assessment and Management Planning). Il CNR ha messo a punto una app per tablet (Android, iOS, Windows) per la valutazione del rischio paratubercolosi e per l'individuazione delle misure gestionali idonee a ridurre la diffusione dell'infezione in allevamento, a disposizione dei veterinari pubblici e liberi professionisti. Lo schema di valutazione è stato ripreso dal "Manuale per il controllo della paratubercolosi negli allevamenti di bovine da latte, rielaborato ed adattato allo strumento informatico, in modo da renderlo facilmente leggibile e compilabile su tablet, direttamente in azienda.

iRAMP è un'applicazione in grado di operare sia online sia offline in grado di:

- semplificare e standardizzare la raccolta dei dati aziendali e l'esecuzione della valutazione del rischio in campo attraverso una checklist guidata;
- aiutare il veterinario nella stesura del piano di gestione sanitaria aziendale, elaborando automaticamente un file (scaricabile in formato Excel) riportante i dati aziendali, la distribuzione del rischio nelle diverse aree dell'allevamento e un elenco di raccomandazioni specifiche con relativa priorità di intervento. I dati possono essere integrati nel tempo per valutare il successo e le criticità del piano implementato;
- fornire nozioni chiave sulla paratubercolosi e sul suo controllo, attraverso appositi HELP e collegamenti disponibili in ogni sezione (istruzioni per la valutazione del rischio, nozioni specifiche di biosicurezza e per la stesura del piano di gestione sanitaria).

La app iRAMP è disponibile al link <http://iramp.izsler.it>. Sono anche disponibili le istruzioni essenziali per l'utilizzo della app iRAMP, direttamente scaricabili dal sito.

- La piattaforma interattiva per la gestione dei ring test (proficiency test) organizzati dal C.D.R.; nell'anno in corso è stato utilizzato per la gestione del ring test per la diagnosi sierologica di paratubercolosi mediante ELISA e/o AGID.