



## **RELAZIONE ANNUALE**

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

(Periodo: dal 1.10.2016 al 30.09.2017)

## Centro di Referenza Nazionale (C.D.R.) Paratubercolosi Relazione sulla attività svolta dal 01.10.2016 al 30.09.2017

### Attività Diagnostica

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

Al fine di giungere ad una standardizzazione delle varie metodiche, il C.D.R ha messo a disposizione dei vari Istituti Zooprofilattici (II.ZZ.SS) tutti i metodi di prova, validati ed emessi in qualità, tramite accesso al link indicato all'interno del sito dello stesso C.D.R.:

[http://www.izsler.it/izs\\_home\\_page/servizi/00001309\\_Sedi\\_/prove\\_accreditate.html](http://www.izsler.it/izs_home_page/servizi/00001309_Sedi_/prove_accreditate.html).

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.

Nel corso dell'anno di attività non si è proceduto a stesura o validazione di nuovi metodi di prova.

#### **2) Produzione e distribuzione di reagenti**

IZSLER ha realizzato una biobanca, in cui sono stati stoccati:

- 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).

Sono stati inviati ai vari II.ZZ.SS, Università ed altri Enti di ricerca che ne hanno fatto richiesta i materiali sopra elencati (biobanca IZSLER) o altri materiali/matrici stoccati presso il C.D.R., necessari alla validazione dei metodi di prova, quali:

- 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**

Rispetto all'anno precedente, nel periodo di riferimento si è osservato un significativo aumento dell'attività diagnostica (+24%), indirizzata principalmente alla diagnosi sierologica nella specie bovina, su campioni ricevuti da AUSL e privati.

Sui campioni pervenuti sono stati eseguiti complessivamente **41.718 esami**, di cui:

- 40.120 esami sierologici;
- 330 esami microbiologici;
- 1.268 PCR.

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 inoltre 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 diretta (coltura e/o PCR) su feci di bovino, a cui hanno aderito 22 laboratori appartenenti a 10 II.ZZ.SS.

I campioni sono stati spediti il 27.3.2017, con scadenza prevista per la restituzione dei risultati 27.08.2017.

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

Il C.D.R. 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.

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

##### Valutazione degli esiti della prova PCR

In totale hanno eseguito il test PCR 18 laboratori appartenenti ai 10 diversi II.ZZ.SS, inclusi i risultati del Centro di riferimento.

Le metodiche utilizzate dai laboratori partecipanti sono state:

- RT PCR (17 laboratori);
- nested-PCR (3 laboratori).

Due laboratori hanno utilizzato più di una metodica.

Complessivamente la prova valutativa ha mostrato un risultato omogeneo tra i partecipanti. Fa eccezione un laboratorio che ha fornito esito non conforme all'atteso per 6 campioni (3 falsi negativi e 3 falsi positivi), dimostrando problemi sia di sensibilità che di specificità.

Complessivamente, la PCR ha mostrato ottimi valori di sensibilità e specificità, di poco inferiori a quelli dell'esame colturale.

I risultati complessivi di accuratezza della prova valutativa (0.93) sono lievemente inferiori di quelli ottenuti nelle tre precedenti prove.

##### Valutazione degli esiti coltura

Gli esiti dell'esame colturale sono pervenuti da 13 laboratori appartenenti a 10 diversi II.ZZ.SS, inclusi i risultati del Centro di riferimento.

Le metodiche utilizzate dai laboratori partecipanti sono state di tre tipi:

- mediante centrifugazione (4 laboratori)
- mediante sedimentazione (7 laboratori)
- mediante crescita su terreno liquido (3 laboratori)

Un laboratorio ha utilizzato più di una metodica.

Complessivamente la prova valutativa ha mostrato un risultato omogeneo tra i partecipanti.

Fa eccezione un laboratorio che ha dato un risultato falsamente positivo su almeno un'aliquota di ognuno dei tre campioni negativi.

I risultati complessivi di accuratezza della presente prova valutativa dei laboratori (0.97) sono in linea con quelli ottenuti nelle tre precedenti prove.

## **5) Ring test a cui ha partecipato il personale del C.D.R.**

Il C.D.R. ha partecipato a:

- 1 prova interlaboratorio (aprile 2017), 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 (febbraio 2017), 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 2017), 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**

E' stata realizzata una banca dati sulle caratteristiche genotipiche dei ceppi di campo isolati presso il C.D.R. o ricevuti da altri II.ZZ.SS 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***

Relazione annuale 2016-2017 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)

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 le hanno recepite.

Viene inoltre riportato il riferimento al relativo documento di recepimento.

<b>Regione</b>	<b>Riferimento</b>
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	Decreto della Giunta regionale n.66 del 5.12.2016
Puglia	Deliberazione della Giunta Regionale n. 2567 del 30/12/2013
Sardegna	Deliberazione della Giunta Regionale N. 27/10 del 15.7.2014
Sicilia	Decreto Assessoriale 23/02/2015
Toscana	Deliberazione della Giunta Regionale n. 1103 del 16/12/2013
Trentino-Alto Adige	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.
Umbria	Deliberazione della Giunta Regionale n. 819 del 7 luglio 2014
Valle d’Aosta	Deliberazione della Giunta Regionale n. 14 del 10/1/2014
Veneto	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.

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.

Tra le criticità della applicazione delle Linee Guida nazionale segnaliamo:

1. La sottonotifica dei casi clinici (vedi punto 4.b), 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 piani 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 I.ZZ.SS, 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. L'APA esegue infatti i 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, raggiungendo il picco di sensibilità 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'AUSL 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 e su specifica richiesta.
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, alcune segnalazioni 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.

Il C.D.R. sta elaborando una proposta di modifica/integrazione delle Linee Guida Nazionali, in collaborazione con Regione Lombardia, dove le stesse Linee guida hanno fatto rilevare la maggior percentuale di adesione.

La proposta di modifica prevede una revisione delle modalità di acquisizione delle qualifiche sanitarie secondo criteri più stringenti (utilizzo del modello S2 per tutte le qualifiche) e la possibilità di un follow-up mediante PCR dalle feci degli animali sieropositivi, nel caso di allevamenti a bassa prevalenza (<3%).

Inoltre, data la sospetta influenza della prova tubercolinica sulla diagnosi sierologica di paratubercolosi, si raccomanderà di lasciare intercorrere almeno 3 mesi tra la prova intradermica per la tubercolosi e il prelievo di sangue per la diagnosi di paratubercolosi.

Relativamente allo stato di applicazione delle qualifiche previste dalle Linee Guida, si riportano di seguito i dati relativi alle qualifiche presenti in BDN al 30.9.2017 per le singole Regioni.

Regione	PTC	PT0	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5
Abruzzo							
Basilicata				3			
Calabria				1			
Campania		524					
Emilia-Romagna	8	5692	33	37	2	1	0
Friuli Venezia Giulia				1			
Lazio			1				
Liguria							
Lombardia	1	4610 (di cui 3245 PTEX1)	577	393	57	24	11
Piemonte	11	9090	123	447	16		
Marche	1	380	1	1			
Molise							
Puglia							
Sardegna	4	4508	75	117			
Sicilia	1	1607		366			
Toscana							
Trentino AA-Bolzano							
Trentino AA-Trento		162	115	1060			
Umbria				1			
Valle d'Aosta				842			
Veneto		924		389			

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) e nella provincia autonoma di Trento.

### **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). 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 rappresenta 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 hanno portato ad una buona adesione al piano.

Ad oggi hanno aderito al Piano 4.157 allevamenti, pari al 73.3% del totale di 5.673 allevamenti registrati in BDN. La percentuale di adesione sale all’80,5% se si considerano i 5.161 allevamenti attivi con consistenza superiore a 20 capi.

Si osserva comunque un trend positivo degli allevamenti aderenti al piano (73.3% rispetto al 65.0% dell’anno precedente).

Di questi, 3.245 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 78.1% (sostanzialmente invariati rispetto al 79.0% dell’anno precedente) degli allevamenti aderenti al Piano e al 57,2% del totale (in aumento rispetto 51.4% dell’anno precedente).

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.

Per quanto riguarda le qualifiche superiori:

- 577 allevamenti (13.9% degli aderenti e 10,2% del totale, in aumento rispetto al 13,2% degli aderenti e all’8.6% dell’anno precedente) hanno raggiunto la qualifica PT1 (allevamenti a basso rischio);
- 393 (9.5% degli aderenti e 6,9% del totale, in aumento rispetto al 7.0% degli aderenti e al 4.6% dell’anno precedente) hanno ottenuto la qualifica PT2 (allevamento negativo);
- 92 hanno avuto la qualifica di allevamento certificato, rispettivamente, 57 allevamenti PT3, 24 allevamenti PT4 e 11 allevamenti PT5 (in aumento rispetto a 34 allevamenti dell’anno precedente).



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 2017 si osserva un trend positivo del numero di aziende che richiede e acquisisce le qualifiche rispetto agli anni precedenti (2014-2016). 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 nazionali* 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 30/09/2017.

AUSL	Totale	PTC	PT0	PT1	PT2	Pt3	PT4	Pt5
	allevamenti	Con Casi Clinici	Senza Casi Clinici	A Basso Rischio	Negativo	Certificato	Certificato	Certificato
PIACENZA	734	0	689	26	18	1	0	0
PARMA	1441	4	1431	3	3	0	0	0
REGGIO EMILIA	1249	1	1241	1	6	0	0	0
MODENA	1014	2	1011	0	1	0	0	0
IMOLA	110	1	109	0	0	0	0	0
BOLOGNA	458	0	449	3	4	1	1	0
FERRARA	85	0	82	0	3	0	0	0
RAVENNA	150	0	149	0	1	0	0	0
FORLI'	191	0	191	0	0	0	0	0
CESENA	182	0	182	0	0	0	0	0
RIMINI	159	0	158	0	1	0	0	0
TOTALE	5773	8	5510	33	37	2	1	0

Ad oggi non è stata organizzata un'attività di promozione regionale del piano, con alcune eccezioni:

Relazione annuale 2016-2017 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)

- 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 le procedure e raggiunto relativa qualifica sanitaria (PT2 o PT1).
- In provincia di Bologna, da parte di alcuni veterinari AUSL, con arruolamento di allevamenti tramite caseifici interessati all'export.

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 indicazioni 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 nazionali* 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.

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. Il piano è stato realizzato fino al 2016, mentre nel 2017 è stato sospeso.

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\\_paratubercolosi.pdf](http://www.izsvenezie.it/images/stories/Pdf/Temi/LG_in_VET2_paratubercolosi.pdf)

### ***3.e Piano regionale di controllo e assegnazione delle qualifiche sanitarie nei confronti della Paratubercolosi 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 (9.800 allevamenti circa) per l'assegnazione delle qualifiche sanitarie base (PT0/PTC).

Sono state realizzate attività formative, in particolare riunioni con allevatori titolari di aziende da latte e convegni ECM per veterinari del servizio pubblico, organizzati in collaborazione con il Centro di Referenza Nazionale. A livello delle singole ASL sono stati svolti corsi interni di formazione.

Le aziende non aderenti al Piano sono state sottoposte a visita clinica per l'attribuzione della qualifica PT0 o PTC.

I controlli per la qualifica e la certificazione hanno riguardato 682 allevamenti aderenti (7,04% di quelli attivi) che, sottoposti a campionamento mediante protocollo previsto in funzione della qualifica sanitaria da attribuire o confermare, hanno ottenuto i seguenti risultati:

- 96 allevamenti (14,08%), hanno dimostrato una sieroprevalenza superiore al 5%, e sono quindi stati classificati come PT0.
- 123 allevamenti sono stati classificati come PT1 (18,03%)
- 447 allevamenti sono risultati negativi (PT2), pari al 65,54%;
- 16 allevamenti hanno acquisito la qualifica PT3 (2,35%).

Su 28.086 capi testati, 551 sono risultati sieropositivi (1,96%).

E' stata confermata una situazione epidemiologica significativamente più favorevole negli allevamenti di piccole dimensioni. E' infatti risultato positivo il 12,4% di aziende di consistenza fino a 50 capi vs. il 41,9% di aziende con più di 50 capi.

Dall'inizio della applicazione del Piano, 42 allevamenti sono stati interessati da segnalazioni di sospetti clinici per un totale di 68 capi, 25 dei quali sono stati confermati.

Al controllo sierologico negli allevamenti con casi clinici, la sieroprevalenza media è risultata del 7,78% (191 capi positivi su 2453 testati).

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 nell'applicazione delle misure di controllo ed al rischio elevato determinato dalla pratica dell'alpeggio.

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

Nell'anno in corso si è continuata l'attività di controllo a tappeto su campioni di sangue di tutti i bovini di età superiore a 36 mesi, prelevati dai Servizi veterinari. Un'attività di controllo è stata inoltre condotta sui bovini di età superiore ai 24 mesi nell'ambito della compravendita.

A partire dall'anno 2017 i controlli su campioni individuali di sangue per la profilassi relativa a brucellosi, leucosi e IBR sono stati sostituiti, ove possibile, dall'analisi del latte di massa, con un significativo risparmio economico. Le Linee guida nazionali per l'adozione di Piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria degli allevamenti nei confronti della paratubercolosi bovina non prevedono l'utilizzo del latte di massa per l'acquisizione e/o per il mantenimento delle qualifiche, ma solo l'analisi di sangue o latte individuale. Per questo motivo risulterà difficile continuare l'applicazione del "Piano di controllo della paratubercolosi (malattia di Johne) negli allevamenti bovini", finora eseguito mediante analisi a tappeto del sangue individuale prelevato dai Servizi Veterinari (deliberazione della Giunta provinciale n. 2359 del 16/12/2016); pertanto, a partire dal 2018, si passerà probabilmente, come anche previsto dalle sopraccitate linee guida, alla volontarietà del Piano.

### **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/izs\\_bs/allegati/443/Allegato%201%20A\\_MANUALE\\_latte\\_Rev\\_1.pdf](http://www.izsler.it/izs_bs/allegati/443/Allegato%201%20A_MANUALE_latte_Rev_1.pdf)) e uno a quelli di vacche da carne ([http://www.izsler.it/izs\\_bs/allegati/443/Allegato%201\\_B\\_MANUALE\\_carne\\_Rev\\_1.pdf](http://www.izsler.it/izs_bs/allegati/443/Allegato%201_B_MANUALE_carne_Rev_1.pdf)).

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**

I dati riportati nella tabella seguente, raccolti nel corso degli anni precedenti, sono quelli attualmente disponibili, relativamente al **patrimonio bovino**.

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.

Non sono pervenuti al Centro, nè risultano pubblicati, risultati di ulteriori indagini sulla diffusione della malattia nel patrimonio bovino nazionale.

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	52.8%	4.6%	
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.	

Relativamente al **patrimonio ovi-caprino**, si riportano di seguito i dati presentati in occasione del 7° Congresso nazionale sulla Paratubercolosi (novembre 2015), raccolti nell'ambito del Progetto PON\_01-1841 EPISUD, in corso di pubblicazione.

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 definito che i casi clinici di Paratubercolosi Bovina debbano essere registrati in SIMAN. I dati relativi ai casi clinici registrati in SIMAN (\*) o deducibili dalle qualifiche sanitarie (PTC) degli allevamenti, sono i seguenti:

Regione	2014	2015	2016	2017
Emilia-Romagna	1	1	1	6
Lombardia				1
Piemonte	7	7	2	11
Marche				1*
Sardegna	2	2	2	2
Sicilia				1
Toscana	1			
Trento	6	4	1	
ITALIA	17	14	6	22

Fonte: SIMAN: Dati aggiornati al 30/09/2017

Relazione annuale 2016-2017 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)

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 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, realizzato in collaborazione con l'Istituto Spallanzani di Roma, ha avuto inizio il 15.12.2014 ed è terminato 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. 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. Per poter utilizzare tale metodica con un sufficiente livello di confidenza, in termini di riproducibilità, occorrerebbe sviluppare software ad hoc; l'approccio manuale utilizzato nel progetto per la determinazione dei picchi a bassa intensità, non rappresenta una soluzione possibile, vista la mole di dati che occorre processare. 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. Infine, i dati ottenuti sono stati utilizzati per un articolo scientifico che è stato pubblicato sulla rivista Journal of Applied Microbiology (vedi pubblicazioni n.4) e per una tesi di scuola di specializzazione in Microbiologia e Virologia (vedi sezione dedicata).
- 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, realizzato in collaborazione con l'Università degli Studi di Bologna, ha avuto inizio il 1.10.2014 e è terminato il 30.9.2017. Il progetto ha avuto i seguenti obiettivi e risultati:

- 1) verificare la correlazione tra infezione paratubercolare e riduzione dei parametri produttivi, allo scopo di raccogliere e comunicare dati economici che contribuiscano a promuovere l'adozione di piani di controllo volontari da parte degli allevatori. La maggior parte degli studi è stata condotta negli Stati Uniti e nei paesi del Nord Europa, caratterizzati da un diverso clima, sistema produttivo e normativo. Le valutazioni sono quindi state eseguite 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 il test ELISA sul siero con cadenza semestrale, e la coltura fecale con cadenza annuale. Per la coorte di animali selezionata abbiamo raccolto e monitorato dati produttivi 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 sono stati estratti dalle banche dati di due macelli. I dati sono stati analizzati utilizzando i software R, Microsoft Excel e Microsoft Access. La popolazione dello studio comprendeva un totale di 120 vacche (45 MAP-positive e 75 MAP-negative) 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 paratubercolosi dovuto a queste differenze nell'allevamento. In media, per ogni animale infetto, abbiamo stimato un mancato guadagno di 3.340 Euro: questa perdita era dovuta alla minor produzione media totale di latte (-3.207 Euro), e al minor valore medio delle carcasse (-133 Euro). Inoltre, ulteriori perdite medie annue state stimate essere
- a. -7.200 Euro/anno, dovuti ai maggiori costi per l'acquisto di rimonta legati alla minor durata media della vita produttiva delle vacche infette;
  - b. -1.162 Euro/anno, dovuti ai costi legati alla mortalità (costi di smaltimento delle carcasse e mancata resa al macello).

Questo studio, il primo sull'impatto economico dell'infezione da MAP nel settore delle bovine da latte nel Sud Europa, conferma che l'impatto economico della paratubercolosi sulla redditività aziendale è notevole ed 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.

In conclusione, il controllo della paratubercolosi può non solo migliorare la salute e il benessere degli animali, ma anche aumentare la redditività complessiva dell'allevamento. Inoltre, se l'ipotesi del ruolo di MAP come agente zoonotico fosse confermata, sarebbero probabili ulteriori perdite economiche.

- 2) Un ulteriore scopo del progetto era quello di valutare il ruolo predisponente di MAP nei confronti di altre malattie tipiche del peri-parto (mastite, metrite, zoppia, febbre, ecc). A tale scopo sono state messe a confronto le condizioni metaboliche di bovine infette da MAP (positive al test ELISA e/o al test colturale dalle feci) con quelle di bovine sane (ripetutamente negative ai test e asintomatiche), allevate nelle stesse condizioni. Sono stati prelevati campioni di sangue da 30 vacche positive e 30 negative in quattro momenti, al giorno -30, +3, +10, +30, rispetto al parto. Il profilo metabolico veniva valutato in ogni campione, includendo gli indicatori positivi e negativi di risposta di fase acuta (APP, aptoglobina, bilirubina, ceruloplasmina, albumina). Alcuni valori di APP sono stati utilizzati per calcolare l'indice LFI (Liver Functionality Index = Indice di Funzionalità Epatica), e l'indice PIRI (Post-calving Inflammatory Response Index = Indice di Risposta Infiammatoria Post-parto), che caratterizzano rispettivamente la risposta infiammatoria nel primo mese e nella prima settimana di lattazione. Non è stato possibile calcolare l'indice LFI di 9 casi su 32, in quanto questi sono stati macellati prima del trentesimo giorno post-partum. Differenze significative sono state rilevate nel livello di Calcio e albumina (inferiori nel gruppo positivo) e nei metaboliti dell'Ossigeno reattivi (più elevati nel gruppo positivo). E' interessante notare che, selezionando solo gli animali positivi ad entrambi i test (ELISA e coltura fecale), anche le differenze nel livello di ceruloplasmina diventavano significative (più alta nelle positive). L'indice PIRI relativo al prelievo eseguito 3 giorni dopo il parto mostrava differenze significative tra i due gruppi di 32 animali casi-controlli, per lo scenario di positività sierologica. Non sono state evidenziate differenze tra i due gruppi per LFI, BCS ed hygienic score. I valori inferiori dell'indice PIRI negli animali infetti evidenzia la presenza di una situazione di profilo metabolico alterato. E' necessario tenere in considerazione che probabilmente le differenze nel pattern metabolico si riducevano nel corso del primo mese di lattazione perché gli animali MAP-negativi venivano trattati per varie patologie (metriti, mastiti e malattie podali), mentre le positive venivano riformate non appena mostravano sintomi sospetti o calo di produzione latte. Si ritiene che, per corroborare l'ipotesi iniziale, sia necessario aumentare il numero di osservazioni.

I risultati dello studio saranno oggetto di una pubblicazione e comunicati al prossimo congresso nazionale per promuovere l'attuazione di programmi di controllo volontario in Italia.



Progetto di ricerca corrente IZS LE 2014/013: “Epidemiologia ed ecosistema dei Micobatteri presenti in Italia: *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Mycobacterium 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 è 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) sono stati 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 che sia 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, è stato estratto il DNA da 49 ceppi per essere sottoposto ad analisi WGS. L’analisi WGS ha dimostrato un elevato grado di omogeneità genomica fra i ceppi sequenziati. Questo dato è stato confermato anche dall’analisi dei mini- e micro-satelliti, in cui si è dimostrato come tutti i ceppi mostrassero un identico profilo. Malgrado questa elevata omogeneità, è stato possibile osservare la presenza di almeno 7 SNPs (pos7, pos33, pos68, pos43, pos53, pos37 e pos19) informativi che darebbero una struttura evolutiva coerente della popolazione di ceppi. Si sta inoltre valutando la presenza di indels (inserzioni e/o delezioni) all’interno della popolazione osservata e eventualmente se è possibile identificare una porzione del genoma variabile, tale da consentire un’eventuale stima del tasso di mutazione del batterio in vivo. I dati parziali ottenuti nell’ambito del progetto saranno presentati al prossimo congresso Internazionale sulla Paratubercolosi che si svolgerà in Messico in giugno 2018.

- Progetto di ricerca corrente IZS LE 2015/002: “Valutazione delle performances dei test sierologici per la diagnosi di Paratubercolosi nella specie bufalina” (Responsabile scientifico: N.Arrigoni). Il progetto ha avuto inizio il 1.10.2016 e terminerà il 30.09.2018. Il progetto parte dall’interesse della filiera lattiero-casearia bufalina, nei confronti di questa problematica, dopo la richiesta di garanzie sanitarie da parte di alcuni paesi terzi (Cina, Russia ed India) nei confronti della paratubercolosi, per l’esportazione di prodotti lattiero-caseari derivati dal latte di questa specie, in primis la “Mozzarella di Bufala Campana” (DOP). Il test ELISA è al momento il più utilizzato per il controllo della paratubercolosi ed è il test previsto dalle Linee Guida Nazionali per l’attribuzione delle qualifiche sanitarie agli allevamenti bovini e bufalini. I kit ELISA attualmente disponibili per la diagnosi di paratubercolosi non sono però adeguatamente supportati da dati robusti di validazione relativi alle performances dei test nella specie bufalina. Il progetto prevede la raccolta di campioni di siero di bufale positive e negative, sulla

base dell'esito del test PCR da feci, considerato come riferimento per l'attribuzione dello stato di infezione dell'animale.

I laboratori del C.D.R hanno in prima analisi messo a punto una metodica semi-automatica di estrazione del DNA dalle feci, in modo da aumentare la produttività e velocizzare l'analisi PCR. Il limite di rilevazione della nuova metodica è analogo a quello della metodica manuale in uso presso il C.D.R, basata su un sistema di purificazione a colonnina.

Sino ad ora, presso i laboratori del C.D.R, sono stati analizzati sia le feci, mediante qPCR, che il sangue, mediante test ELISA Id Vet, di 708 animali.

Sulla base di questi risultati, è stata esaminata la concordanza tra i due test mediante calcolo della K di Cohen, che ha mostrato valori compresi tra 0,405 e 0,437, sulla base dell'inclusione dei campioni dubbi nella categoria dei positivi o dei negativi. L'indice di concordanza è risultato dunque discreto.

Questo valore di concordanza tra i due test è probabilmente legato a più fattori:

- a) il diverso target cui sono dirette le due metodiche (anticorpi nel sangue per la metodica ELISA, DNA nelle feci per la PCR);
- b) la capacità del bufalo di contenere l'infezione grazie all'immunità cellulo-mediata, che impedisce la progressione verso una risposta mediata dai linfociti T Helper, fattore stimolante l'innescamento di una risposta di tipo anticorpale. Questa ipotesi è suggerita dall'osservazione che il numero di positivi in ELISA è risultato decisamente inferiore rispetto al numero di positivi ottenuto con la PCR.

Nel corso del progetto, si prevede di poter ampliare la casistica (sono previsti circa 2000 animali), includendo campioni provenienti dalle altre unità operative coinvolte e operanti nelle zone afferenti al Lazio e alla Campania, ove l'allevamento bufalino è intenso. L'aumento del numero di campioni permetterà di utilizzare modelli bayesiani, mirati alla stima delle performances in assenza di gold standard. L'analisi sarà svolta considerando diversi cut-off per i test ELISA e PCR. La raccolta di dati di validazione robusti del test ELISA nella specie bufalina permetterà di elaborare dati di sensibilità e specificità, individuando valori di cut-off ottimali per la specie bufalina, massimizzando la predittività diagnostica nei confronti della paratubercolosi in questa specie. I dati di performances diagnostiche nei confronti di questa malattia nella specie bufalina permetteranno una migliore applicazione delle *Linee Guida per l'adozione di piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria nei confronti della paratubercolosi* negli allevamenti bufalini.

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

- Progetto di ricerca corrente IZS UM 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 ed è terminato 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.
- Progetto di ricerca corrente IZS VE 2015/103: "Applicazione di metodi spettroscopici e spettrometrici ad elevata capacità per l'identificazione di biomarcatori sierici associati all'infezione paratubercolare nei bovini da latte" (Responsabile scientifico: Responsabile scientifico: N. Pozzato). Il progetto ha avuto inizio il 1.9.2016 e terminerà il 30.9.2018.
- Progetto di ricerca corrente IZS PLV 2015/104: "Paratubercolosi caprina: strategie per la gestione sanitaria degli allevamenti e salubrità della Robiola di Roccaverano" (Responsabile scientifico: M.S. Gennero). Il progetto ha avuto inizio il 1.11.2016 e terminerà il 31.10.2019.

### **Ricerca Finalizzata**

Nulla da segnalare.

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

Il C.D.R. 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 era 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), 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. Era inoltre previsto lo sviluppo di nuovi strumenti diagnostici e di selezione genetica attraverso la conoscenza della diversità genomica dei patogeni e dell'ospite, l'analisi dell'interazione del patogeno con l'ospite, con il suo microbiota e con l'ambiente, utilizzando tecnologie -omic e l'approccio con sistemi biologici.

Gli obiettivi specifici del progetto erano:

- 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 sarebbe stato 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 sarebbe stato 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 avrebbero fornito informazioni sulle strategie di prevenzione e controllo delle malattie oggetto di studio.

Di seguito la lista dei partecipanti al progetto:

- |   |                 |
|---|-----------------|
| • Università Cattolica del Sacro Cuore                      | (Italy)         |
| • National Veterinary Institute, Technical University of DK | (Denmark)       |
| • University of Edinburgh                                   | (UK)            |
| • Bern University   | (Switzerland)   |
| • Institut National de la Recherche Agronomique             | (France)        |
| • University of Copenhagen                                  | (Denmark)       |
| • Istituto Zooprofilattico Sperimentale LER                 | (Italy)         |
| • Cardiff University  | (UK)            |
| • Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne                  | (Switzerland)   |
| • Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho    | (Brazil)        |
| • Université Grenoble Alpes                                 | (France)        |
| • University of Adelaide                                    | (Australia)     |
| • SMART solutions srl                                       | (Italy)         |
| • Parco Tecnologico Padano srl                              | (Italy)         |
| • European Federation of Animal Science                     | (International) |

La proposta ha passato la pre-selezione, ma non ha superato il secondo step di valutazione, a cui è stata sottomessa in settembre 2016.

- **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).

## Aggiornamento e formazione professionale

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

- Il C.D.R. (N.Arrigoni) ha partecipato come docente al corso ECM "Il ruolo del veterinario aziendale nel risanamento degli allevamenti dalle malattie infettive e parassitarie", con una relazione dal titolo "Paratubercolosi: introduzione alla

- problematica e gestione dell'infezione in allevamento", organizzato dall'Ordine dei Medici Veterinari di Salerno, ad Eboli, 15.10.2016.
- Il C.D.R. (C.Garbarino) ha partecipato come docente al 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, con una relazione dal titolo: "Paratubercolosi: linee guida per l'adozione di piani di controllo e assegnazione della qualifica sanitaria agli allevamenti e piano di gestione sanitaria", a Milano, il 24/11/2016.
  - Il C.D.R. (C.Garbarino) ha partecipato come docente alla Giornata delle Ricerche, organizzata da IZSLER, per la presentazione dei dati della Ricerca corrente 012/2011 dal titolo "Paratubercolosi nella fauna selvatica: approfondimenti diagnostici ed epidemiologici", a Brescia, il 6.12.2016.
  - Il C.D.R. (N.Arrigoni) ha partecipato come docente al corso: "Ovini e caprini: aspetti sanitarie e riproduttivi", con una relazione dal titolo: "Paratubercolosi: come riconoscerla e come affrontarla per limitarne i danni", organizzato dalla Federazione Provinciale Allevatori di Trento, a Trento il 19.6.2017.
  - Il C.D.R. (N.Arrigoni) ha partecipato come relatore al corso FAD "Le zoonosi a trasmissione alimentare: aggiornamento sulle fonti, agenti zoonotici e focolai di tossinfezione alimentare", con una relazione dal titolo "Paratubercolosi: possibili aspetti zoonotici", organizzato dall'IZSLER, aperto dal 6.7.2017 al 30.11.2017.

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

- Il C.D.R. (C.Garbarino) ha partecipato al XLVIII International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, a Sorrento, 7-10 giugno 2017, presentando due poster:
  - "Quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Listeria monocytogenes* and *Francisella tularensis* by real time PCR and two digital PCR systems: method comparison" (vedi pubblicazioni n.6);
  - "Identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* field isolates by MALDI-TOF MS" (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. (N.Arrigoni) è stato incluso nel comitato scientifico del 14th International Colloquium on Paratuberculosis, che si svolgerà a Cancun (Messico) nel mese di giugno 2018 (Chair: Gilberto Chavez).

## **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 un Material Transfer Agreement con l'Università degli Studi di Pisa, Dipartimento di Scienze Veterinarie, per una collaborazione relativa alla tipizzazione da parte del C.D.R. di ceppi di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mediante analisi loci mini- e microsatelliti ed eventuale Whole Genome Sequencing.
- E' attivo un Material Transfer Agreement con l'Istituto Zooprofilattico della Sicilia "A.Mirri", per una collaborazione relativa all'invio da parte del C.D.R. di ceppi di campo di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.
- E' stata realizzata una Tesi di specializzazione (Scuola di specialità in Microbiologia e Virologia, Università la Sapienza Roma, anno accademico 2015/2016), dello specializzando Dott. Alessandro Piscini, dal titolo: "La spettrometria di massa Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight nella discriminazione di specie batteriche affini: il complesso *Mycobacterium avium* (MAC)" (Relatore: Prof. Guido Antonelli, Correlatore: Dott. Matteo Ricchi).
- 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, convegni e congressi che il C.D.R. ha organizzato o a cui ha partecipato).

## Consulenze e collaborazioni europee

- E' stato siglato un accordo di collaborazione con la ditta Nestec ltd, per la validazione di metodologie finalizzate alla ricerca di MAP nel latte e nel latte in polvere. Le metodologie comprendono il test microbiologico, la PCR e la metodica "phage assay".
- E' stato organizzato presso il C.D.R. un training teorico-pratico sulla metodica "Phage Assay", abbinata a separazione magnetica mediata da peptidi, per la ricerca di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* da latte e derivati. Il corso è stato tenuto nella settimana dal 26/06/2017 al 31/06/2017 dalla Dott.ssa Irene Grant (Senior Lecturer in Microbiology and Food Safety Institute for Global Food Security School of Biological Sciences presso la Queen's University of Belfast, Medical Biology Centre) ed ha visto la partecipazione di:

- Istituto Vasco de Investigación y Desarrollo Tecnológico NEIKER - Tecnalia (Spagna) (Dott. Iker Sevilla e Dott.ssa Maitane Tello);
- ditta Nestec (Dr.ssa Lise Michot);
- IZSLER C.D.R. (Dott.ssa N.Arrigoni, Dott. S.Leo, Dott. M.Ricchi, Dott. S.Russo).

### **Consulenze e collaborazioni internazionali**

- E' stato stipulato un Material Transfer Agreement con U.S. Departmente of Agriculture (Agricultural Research Service, Midwest area, Infectious Bacterial Diseases, Dott. Bannantine), per una collaborazione relativa allo scambio di ceppi di *Mycobacterium avium* subsp. *Hominisuis*, da utilizzare in prove di tipizzazione comparativa con MAP mediante metodiche PCR e MALDI-TOF.

### **Pubblicazioni scientifiche e divulgative**

Vedi All. 1 (copia del frontespizio).

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

1. Ricchi M, Bertasio C, Boniotti MB, Vicari N, Russo S, Tilola M, Bellotti MA, Bertasi B.: "Comparison among the quantification of bacterial pathogens by qPCR, dPCR, and cultural methods". *Front Microbiol.* 2017 Jun 28;8:1174. doi: 10.3389/fmicb.2017.01174. eCollection 2017. PubMed PMID: 28702010; PubMed Central PMCID: PMC5487435.
2. Kralik P, Ricchi M.: "A basic guide to Real Time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything". *Front Microbiol.* 2017 Feb 2;8:108. doi: 10.3389/fmicb.2017.00108. eCollection 2017. Review. PubMed PMID: 28210243; PubMed Central PMCID: PMC5288344.
3. Rossi G, De Leo GA, Pongolini S, Natalini S, Zarenghi L, Ricchi M, Bolzoni L: "The potential role of direct and indirect contacts on infection spread in dairy farm networks". *PLoS Comput Biol.* 2017 Jan 26;13(1):e1005301. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005301. eCollection 2017 Jan. PubMed PMID: 28125610; PubMed Central PMCID: PMC5268397.
4. Ricchi M, Mazzarelli A, Piscini A, Di Caro A, Cannas A, Leo S, Russo S, Arrigoni N: "Exploring MALDI-TOF MS approach for a rapid identification of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* field isolates". *J Appl Microbiol.* 2017 Mar;122(3):568-577. doi: 10.1111/jam.13357. Epub 2017 Jan 30. PubMed PMID: 27868301.
5. Serraino A, Bonilauri P, Giacometti F, Ricchi M, Cammi G, Piva S, Zambrini V, Canever A, Arrigoni N. "Short communication: Investigation into *Mycobacterium*

*avium* ssp. *paratuberculosis* in pasteurized milk in Italy". J Dairy Sci. 2017 Jan;100(1):118-123. doi: 10.3168/jds.2016-11627. Epub 2016 Nov 3. PubMed PMID: 27816242.

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

6. Bertasio C, Ricchi M, Boniotti MB, Vicari N, Russo S, Tilola M, Bellotti M: "Quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Listeria monocytogenes* and *Francisella tularensis* by real time PCR and two digital PCR systems: method comparison"- Proc. XLVIII International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Sorrento, 7-10 giugno 2017, p.295;
7. Ricchi M, Mazzarelli A, Piscini A, Di Caro A, Cannas A, Leo S, Russo S, Arrigoni N: "Identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* field isolates by MALDI-TOF MS"- Proc. XLVIII International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Sorrento, 7-10 giugno 2017, p.310.

#### **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.

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](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), per tablet (Android, iOS, Windows), realizzata dal C.D.R. per la valutazione del rischio di ingresso e diffusione della paratubercolosi nelle aziende bovine e per l'individuazione delle misure gestionali idonee a ridurre i fattori di rischio, 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 diretta di Paratubercolosi mediante coltura e/o PCR.