



## **RELAZIONE ANNUALE**

**Centro di Referenza nazionale per la Paratubercolosi**  
**IZSLER, Sede territoriale di Piacenza**

(Periodo: dal 01.10.2018 al 30.09.2019)

**Centro di Referenza Nazionale (C.R.N.) Paratubercolosi**  
**Relazione sulla attività svolta dal 01.10.2018 al 30.09.2019**

**Attività Diagnostica**

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

Al fine di giungere ad una standardizzazione delle varie metodiche, il C.R.N. ha messo a disposizione l'elenco dei metodi di prova, validati ed emessi in qualità, all'interno del sito web dello stesso C.R.N.

Nella tabella seguente sono riportati i metodi di prova e le schede relative ai terreni utilizzati nelle prove batteriologiche, inviati nel periodo considerato ad IIZZSS o altri Enti, a seguito di richieste specifiche.

IDENTIFICATIVO	REV	TITOLO	IZS O ALTRI ENTI ESTERNI	DATA INVIO
MP 01/207 A	1	DOCUMENTO CORRELATO AL METODO DI PROVA NORMATO PER LA RICERCA DI Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis DA FECI - ESAME COLTURALE DOPO CENTRIFUGAZIONE -	IZSME	15/03/2019
TER 01/067	3	HEY (TERRENO DI HERROLD AL TUORLO D'UOVO)	IZSME	15/03/2019
TER 01/068	3	HEY-MPANV (TERRENO DI HERROLD AL TUORLO D'UOVO CON MYCOBACTIN, PIRUVATO DI SODIO, ACIDO NALIDIXICO E VANCOMICINA)	IZSME	15/03/2019
TER 01/069	3	HEY-MCAF (TERRENO DI HERROLD AL TUORLO D'UOVO CON MYCOBACTIN E CLORAMFENICOLO)	IZSME	15/03/2019
MP 09/078	4	METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DI Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis TRAMITE REAL TIME PCR IN FECI, LATTE E TESSUTI	UNIVERSITA' MILANO	21/03/2019
MP 01/090	4	METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DI Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis DA LATTE -ESAME COLTURALE DOPO CENTRIFUGAZIONE	IZSLT	07/05/2019
MP 01/207 A	1	DOCUMENTO CORRELATO AL METODO DI PROVA NORMATO PER LA RICERCA DI Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis DA FECI - ESAME COLTURALE DOPO CENTRIFUGAZIONE -	IZSLT	07/05/2019
TER 01/067	3	HEY (TERRENO DI HERROLD AL TUORLO D'UOVO)	IZSLT	07/05/2019
TER 01/068	3	HEY-MPANV (TERRENO DI HERROLD AL TUORLO D'UOVO CON MYCOBACTIN, PIRUVATO DI SODIO, ACIDO NALIDIXICO E VANCOMICINA)	IZSLT	07/05/2019
TER 01/069	3	HEY-MCAF (TERRENO DI HERROLD AL TUORLO D'UOVO CON MYCOBACTIN E CLORAMFENICOLO)	IZSLT	07/05/2019

E' frequente la richiesta di consulenza su problemi specifici riguardanti gli aspetti diagnostici, l'applicazione e l'interpretazione dei metodi di prova.

Nel corso dell'anno di attività si è proceduto alla rivalidazione e/o revisione di nuovi metodi di prova:

IDENTIFICATIVO	REV	TITOLO	Data revisione
MP 09/078	5	METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DI <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> TRAMITE REAL TIME PCR IN FECI, LATTE E TESSUTI	18/09/2019
MP 09/199	2	METODO DI PROVA INTERNO PER L'IDENTIFICAZIONE DI <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> DA ISOLATI BATTERICI MEDIANTE F57-PCR REAL TIME	18/09/2019
MP 01/207	2	DOCUMENTO CORRELATO AL METODO DI PROVA NORMATO PER LA RICERCA DI <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> DA FECI - ESAME COLTURALE DOPO CENTRIFUGAZIONE -	3/09/2019

Il C.R.N. ha inoltre eseguito le prove sui kit sierologici IDVET e IDEXX per la ricerca di anticorpi nei confronti di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, nell'ambito di una gara di appalto nazionale. Sono state valutate: sensibilità diagnostica ed analitica, specificità, robustezza.

Dal punto di vista delle performances:

- entrambi i kit sono risultati idonei per le matrici siero bovino, latte bovino, siero ovino e caprino
- il solo kit IDVET è risultato idoneo per la matrice latte bufalino.

## 2) Produzione e distribuzione di reagenti

All'interno della Biobanca centralizzata IZSLER sono stoccati:

- campioni di siero positivi e negativi (ELISA e/o AGID) liofilizzati;
- campioni di latte positivi e negativi, 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 inoltre a disposizione presso il C.R.N. altri materiali, necessari alla validazione dei metodi di prova, quali:

- campioni di feci di animali infetti e negativi;
- DNA di ceppi batterici;
- standard biomolecolari per qPCR.

Nel periodo considerato non sono stati richiesti materiali da parte di altri IIZZSS, se non nell'ambito di specifici progetti di ricerca.

### 3) Attività analitica

La paratubercolosi non è una malattia per la quale è prevista la conferma da parte del C.R.N. Ugualmente, nel periodo considerato, il C.R.N. ha ricevuto 80 campioni da vari IZZSS, in particolare:

- 11 conferimenti per un totale di 75 campioni di siero di bufalo per analisi sierologica da IZSUM;
- 1 conferimenti di 4 campioni di siero bovino per analisi sierologica da IZSLT.
- 1 conferimento di 1 campione di feci bufaline per PCR da IZSLT.

Considerando l'intera attività analitica, nel periodo di riferimento si è osservata, rispetto all'anno precedente, una diminuzione dell'attività diagnostica (-13%), principalmente costituita dagli esami sierologici, su campioni ricevuti da AUSL e privati.

Sui campioni pervenuti sono stati eseguiti complessivamente 40.377 esami, di cui:

	<b>Non ufficiali</b>	<b>Ufficiali</b>	<b>Totale</b>
<b>PCR</b>	320	295	615
<b>Coltura</b>	102	90	192
<b>Esami sierologici</b>	28586	10984	39570
<b>Totale</b>	<b>29008</b>	<b>11369</b>	<b>40377</b>

I risultati non rivestono importanza epidemiologica, in quanto i campioni sono stati inviati al laboratorio per diverse finalità (campionamenti ufficiali per acquisizione qualifica sanitaria, conferme diagnostiche su animali con sospetta forma clinica, monitoraggi a tappeto in allevamenti di stato sanitario sconosciuto, campionamenti nell'ambito di piani di risanamento).

### 4) Circuiti interlaboratorio organizzati dal C.R.N.

E' stato organizzato dal C.R.N. un circuito interlaboratorio per la diagnosi diretta (PCR e/o coltura) su feci bovine, a cui hanno aderito 22 laboratori appartenenti a 10 II.ZZ.SS.

I campioni sono stati spediti il 18.03.2019, con scadenza prevista per la restituzione dei risultati 18.08.2019.

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.R.N. 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.

I risultati del test PCR risultano molto soddisfacenti (accuratezza: 1.00), ed in miglioramento rispetto ai risultati dei ring test precedenti (variabili da 0.93 a 0,98). Per il

test colturale i risultati dimostrano una ottima accuratezza (0,96), anche se alcuni laboratori hanno mostrato problemi sia di sensibilità che di specificità.

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

Il C.R.N. ha partecipato a:

- 1 prova inter-laboratorio (marzo 2019), 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 inter-laboratorio (febbraio 2019), 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 inter-laboratorio (agosto 2019), organizzata a livello europeo, per coltura e PCR su feci (Ente organizzatore: QA Veterinary Laboratory Agency - UK) (risultati non ancora pervenuti).

## **Epidemiologia**

### **1) Creazione banca dati**

Il C.R.N. ha scelto di non attivare proprie Banche Dati, e di utilizzare il Sistema informativo Veterinario Nazionale (Vetinfo) per la raccolta dei dati relativi al patrimonio delle specie suscettibili, alle qualifiche sanitarie e ai focolai di malattia segnalati dalle ASL. A tale proposito si segnala come apparentemente non vi sia congruenza tra il numero di aziende con qualifica “Allevamento con casi clinici (PTC)” ed il numero di focolai di malattia registrati in SIMAN.

### **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 il recepimento formale da parte di tutte le Regioni. 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. UI00109 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 di questa relazione), in relazione ai dati di prevalenza elevata stimata sul territorio nazionale (vedi punto 4.a di questa relazione). 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. Da rilevare inoltre che la ridotta vita produttiva della vacca da latte contribuisce a mascherare la reale situazione, dato che il picco dei casi clinici si manifesta tra i 4 e i 5 anni di età.

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. 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.
4. Il macello è un osservatorio strategico per l'individuazione di casi clinici o di possibili sospetti, ma non esiste un flusso informativo che raccolga le segnalazioni effettuate dai macelli.

**Per ovviare a queste criticità, il C.R.N. ha elaborato una proposta di modifica/integrazione delle Linee Guida Nazionali, che ha trasmesso al Ministero in data 9.10.2018 con prot. 30699. Il Ministero ha inviato il documento alle Regioni ed ha sollecitato, in data 12.8.2019, una risposta entro il 31.8.2019. Il C.R.N. è in attesa della documentazione dal Ministero.**

Le modifiche proposte e le relative motivazioni sono di seguito riportate.

- Art.1.d. E' stata eliminata la possibilità di utilizzo dei campioni di latte per l'attribuzione della qualifica sanitaria, data la minore robustezza del dato riscontrato sul latte rispetto al dato riscontrato sul sangue. Il test sierologico sul latte infatti risulta maggiormente influenzato dallo stadio di lattazione, risultando meno sensibile e ripetibile rispetto al dato sul sangue. Si conferma peraltro la possibilità di utilizzo del latte per l'applicazione di piani di autocontrollo aziendali.
- Art. 3. Data la sottonotifica evidente dei casi clinici, si è introdotta la raccomandazione di effettuare visite cliniche periodiche negli allevamenti per la rilevazione dei segni tipici della malattia. Allo stesso scopo si chiede alle Regioni una verifica sull'attuazione della sorveglianza al macello nelle strutture che macellano più di 1000 capi all'anno (art. 6).
- Allegato 2. Sono state introdotte alcune modifiche sostanziali ai criteri di attribuzione delle qualifiche sanitarie. In particolare:
  - per l'attribuzione della qualifica si è ritenuto di sostituire il prelievo campionario (S1) con il prelievo di tutti i capi di età superiore a 36 mesi (S2).

L'approccio secondo il protocollo S1 era stato introdotto inizialmente per limitare gli oneri a carico degli aderenti, ma si ritiene che l'applicazione del protocollo S2, già peraltro applicato volontariamente dalla maggior parte degli allevamenti, essendo più sensibile, eviti la comparsa di positività inattese in fasi successive, che potrebbero demotivare l'allevatore, causando la perdita della qualifica e l'uscita dal piano. Per il mantenimento della qualifica è stato mantenuto il protocollo S1.

- Per tutte le qualifiche (invece che per i soli livelli PT3-PT5 come previsto da versione originale delle Linee guida) è stata prevista la possibilità per l'allevatore di richiedere una conferma diagnostica dei capi sieropositivi mediante PCR dalle feci, purché la sieroprevalenza risulti inferiore al 3%. Questo ha lo scopo di chiarire e approfondire i casi di sospette false positività dei test sierologici (comparsa di sieropositività in allevamenti ripetutamente negativi o a bassissima prevalenza). La comparsa di positività in allevamenti precedentemente ripetutamente negativi ha infatti costituito una causa di abbandono del piano da parte di alcuni allevamenti. La conferma mediante PCR di almeno un campione comporta la conferma della presenza di infezione in allevamento; in questo caso tutti i capi sieropositivi sono considerati infetti anche se negativi alla PCR.
- La conferma mediante PCR è prevista solo in caso di applicazione del protocollo S2, sia per acquisizione che per mantenimento qualifica.
- Si è introdotta la raccomandazione di non eseguire i prelievi per le analisi sierologiche nei tre mesi successivi all'esecuzione della prova intradermica per la profilassi della tubercolosi, che potrebbe essere causa di reazioni falsamente positive.

Relativamente allo stato di applicazione delle qualifiche previste dalle Linee Guida, si riportano di seguito i dati relativi alle qualifiche degli **allevamenti bovini** presenti in BDN al 30.09.2019 per le singole Regioni (numero di allevamenti e relativa qualifica).

Regione	PTC	PT0	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5	Totale aziende bovine con qualifica
ABRUZZO				1				1
BASILICATA		29		4				33
CALABRIA								-
CAMPANIA		479						479
EMILIA ROMAGNA	12	5811	39	48	5	7	1	5.923
FRIULI VENEZIA GIULIA				2				2
LAZIO		1	7	2	2			12
LIGURIA		165						165
LOMBARDIA		4504	777	538	134	53	62	6.068
MARCHE	1	660	12	17	1			691
MOLISE								-
PIEMONTE	49	9052	241	520	181	44	11	10.098
PUGLIA		36						36
SARDEGNA		7664	48	13				7.725
SICILIA	1	2780		334				3.115
TOSCANA		4		2				6
TRENTINO - ALTO ADIGE (BZ)		7862						7.862
TRENTINO - ALTO ADIGE (TN)		180	151	858	152	31		1.372
UMBRIA				2				2
VALLE D'AOSTA		1		872				873
VENETO	1	932		404				1.337
<b>Totale</b>	<b>64</b>	<b>40160</b>	<b>1275</b>	<b>3617</b>	<b>475</b>	<b>135</b>	<b>74</b>	<b>45.800</b>

Di seguito si riportano i dati relativi alle qualifiche degli **allevamenti bufalini** presenti in BDN al 30.09.2019 per le singole Regioni (numero di allevamenti e relativa qualifica).

Regione	PT0	PT2	Totale aziende bufaline con qualifica
ABRUZZO			-
BASILICATA			-
CALABRIA		1	1
CAMPANIA	21		21
EMILIA ROMAGNA	2	1	3
FRIULI VENEZIA GIULIA			-
LAZIO			-
LIGURIA			-
LOMBARDIA	8		8
MARCHE	3		3
MOLISE			-
PIEMONTE			-
PUGLIA			-

SARDEGNA	3		3
SICILIA	1		1
TOSCANA			-
TRENTINO - ALTO ADIGE (BZ)			-
TRENTINO - ALTO ADIGE (TN)			-
UMBRIA			-
VALLE D'AOSTA			-
VENETO	1		1
<b>Totale</b>	<b>39</b>	<b>2</b>	<b>41</b>

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 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 4.252 allevamenti, pari al 77.0% del totale di 5.516 allevamenti registrati in BDN.

Si osserva un trend stabile degli allevamenti aderenti al piano (77.0%), stabile rispetto all'anno precedente (77,8%) e in crescita rispetto agli anni precedenti (73.3% e 65.0%).

Di questi, 2.769 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 65.1% degli allevamenti aderenti al Piano e al 50,2% del totale.

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

Per quanto riguarda le qualifiche superiori:

- 777 allevamenti (18,3% degli aderenti e 14,1% del totale, in aumento rispetto al 15.8% degli aderenti e 12,3% del totale dell'anno scorso, al 13,9% degli aderenti e al 10.2% del totale di due anni precedenti) hanno raggiunto la qualifica PT1 (allevamenti a basso rischio);
- 538 (12,7% degli aderenti e 9,8% del totale, stabili rispetto al 12,8% degli aderenti e 10,0% del totale dell'anno scorso, in aumento rispetto al 9.5% degli aderenti e al 6.9% del totale di due anni precedenti) hanno ottenuto la qualifica PT2 (allevamento negativo);
- 249 hanno ottenuto la qualifica di allevamento certificato (in aumento rispetto a 159 dell'anno precedente e 92 allevamenti di due anni precedenti), rispettivamente 134 allevamenti PT3, 53 allevamenti hanno ottenuto la qualifica PT4 e 62 allevamenti la qualifica PT5.

Nel 2019 si osserva un trend positivo del numero di aziende che richiede e acquisisce le qualifiche rispetto agli anni precedenti (2014-2018). 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.

Ad oggi non è stata organizzata un'attività di promozione regionale del piano, con l'eccezione della provincia di Piacenza dove il C.R.N. ha coinvolto attivamente alcuni caseifici, gli allevamenti conferenti e i rispettivi veterinari aziendali.

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 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 al link:

[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***

In Piemonte già nel 2008 era stata data attuazione ad un Programma Regionale con l'obiettivo di individuare criteri e protocolli di controllo della paratubercolosi, propedeutici all'emanazione di un piano regionale ad adesione volontaria per il controllo dell'infezione.

Con la D.G.R. n. 15-7093 del 10.02.2014, la Regione Piemonte ha recepito le linee guida del Ministero della Salute, e, in data 17.4.2014, ha trasmesso alle ASL istruzioni operative.

Rispetto a quanto previsto dalle Linee Guida Nazionali sono state previste alcune azioni aggiuntive:

- il prelievo su sospetto clinico riscontrato al macello;
- la visita clinica su tutti gli allevamenti da riproduzione non aderenti al piano volontario per l'assegnazione delle qualifiche sanitarie base (PT0/PTC).

Nel periodo ottobre 2018 – settembre 2019 i controlli per la qualifica e la certificazione hanno riguardato 1.068 allevamenti aderenti (con un aumento di circa 200 allevamenti rispetto all'anno precedente), corrispondenti al 12,1% degli allevamenti attivi (in aumento rispetto al 9,65% dell'anno precedente).

Negli allevamenti aderenti risulta presente il 23% del patrimonio bovino degli allevamenti da riproduzione.

Per incentivare le adesioni, il prelievo viene eseguito dai Servizi Veterinari a titolo gratuito nelle aziende aderenti al piano regionale IBR e in possesso di qualifica IBR indenne o negativa.

Le aziende aderenti appartengono per circa il 75% alla tipologia produttiva linea vacca-vitello, e il 25% pratica l'alpeggio.

Il campionamento, effettuato secondo il protocollo previsto in funzione della qualifica sanitaria da attribuire o confermare, ha dato il seguente esito:

- 124 allevamenti PT0 (11,6 % degli aderenti) (sieroprevalenza >5%);
- 245 allevamenti PT1 (23,0% degli aderenti) (sieroprevalenza ≤5%);
- 473 allevamenti PT2 (44,3% degli aderenti) (sieronegativi);
- 172 allevamenti PT3 (16,1% degli aderenti);
- 43 allevamenti PT4 (4,0% degli aderenti);
- 11 allevamenti PT5 (1,0% degli aderenti).

Nel complesso gli allevamenti negativi (qualifiche da PT2 a PT5) rappresentano il 65% degli aderenti, percentuale sovrapponibile a quella riscontrata nell'anno precedente.

Su 43.957 capi testati (+20% rispetto al periodo precedente), 726 sono risultati sieropositivi e 55 dubbi (in totale 1,78% dei controllati).

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

Si conferma una situazione epidemiologica significativamente più favorevole negli allevamenti di piccole dimensioni; è infatti risultato negativo all'accertamento diagnostico circa l'85 % delle aziende controllate di consistenza fino a 50 capi, mentre, in quelle con un numero di capi superiore a 50, la percentuale di aziende negative corrisponde a poco più del 50 %. 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***

A partire dal 2018, con l'adozione della Delibera della Giunta Provinciale n.33 del 18.1.2018, si è passati da una attività di monitoraggio ufficiale su tutti gli allevamenti, alla adozione di un piano volontario, basato sul controllo di tutti i bovini di età superiore a 36 mesi (protocollo S2) mediante test ELISA su sangue.

Sono previsti inoltre:

- il controllo in compravendita su capi di età superiore a 24 mesi destinati ad allevamenti aderenti al piano, mediante test sierologico su sangue.
- limitazioni per lo spostamento in alpeggio dei capi positivi ai test diagnostici, a meno che non siano separati efficacemente dai capi di altri allevamenti.

Queste modifiche hanno coinciso con il passaggio dal controllo individuale sul sangue per la profilassi relativa a brucellosi, leucosi e IBR all'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” non prevedono l’utilizzo del latte di massa per l’acquisizione e/o per il mantenimento delle qualifiche, ma solo l’analisi sierologica individuale; il latte di massa infatti, sia da risultati ottenuti dal C.R.N. che da dati raccolti dall’IZSVE, non consente la rilevazione di allevamenti a bassa prevalenza.

### 3.g Manuali per il Controllo della Paratubercolosi

Sono a disposizione sul sito del C.R.N. 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 indagini eseguite mediante test ELISA su sangue individuale mostrano una prevalenza di allevamenti infetti superiore rispetto a quelle che hanno utilizzato il test ELISA su latte di massa, perché la sensibilità della prima metodica di rilevazione adottata è decisamente superiore rispetto alla seconda, che consente la rilevazione solo degli allevamenti a prevalenza intra-aziendale medio-alta.

La tabella è stata aggiornata con il dato della Lombardia (monitoraggio 2017), pubblicato nel 2018 (Arrigoni et al).

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

Regione	Anno	Prevalenza apparente aziende	Prevalenza apparente animali	Metodologia	Riferimento bibliografico
Veneto	2002	64.6%	3.5%	ELISA individuale siero	Pozzato N et al, 2011
Lombardia	2003-2005	43.7%	2.6%		Lillini et al., 2005
Lazio	2002	42.0%	2.5%		Papa et al., 2011
Umbria e Marche	2008	52.8%	4.6%		Comunicazione personale
Trento	2012	17.7%	2.5%		Comunicazione personale
Piemonte	2007-2008	9.47%	N.D.	ELISA	Comunicazione personale
Emilia-	2011-2012	14.5%	N.D.	latte massa	PRC2005/003

Romagna		(41.7% dei negativi erano positivi al test ELISA su 30 capi)			
Lombardia	2017	56,0%	1,9%	ELISA individuale siero	Arrigoni et al, 2018

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, successivamente pubblicati (Scaltrito 2015, citato da Sardaro 2017).

Regione	Anno	Prevalenza apparente aziende	Prevalenza apparente animali	Metodologia	Riferimento bibliografico
Puglia	2013-14	Ovi-caprine 60.6%	Ovini 3% Caprini 14.5%	ELISA individuale	Scaltrito et al 2015
Sicilia	2013-14	Ovini 64.2% Caprini 56.9%	Ovini 4.4% Caprini 3.6%		Fiasconaro, 7° Congresso nazionale sulla Paratubercolosi

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

Relativamente al **patrimonio bufalino**, si riportano di seguito i dati che verranno presentati in occasione del 51° Congresso Nazionale della Società italiana di Buiatria (Parma, 7-8 novembre 2019), in corso di pubblicazione.

Regione	Anno	Prevalenza apparente aziende	Prevalenza apparente animali	Metodologia	Riferimento bibliografico
Campania	2016-2018	54,9%	1,7%	ELISA individuale	De Carlo E et al, 2019

#### **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	2018	2019
Emilia-Romagna	1	1	1	6	10	1
Lombardia				1	1	
Piemonte	7	7	2	11	7	39
Marche				1	1	
Sardegna	2	2	2	2		
Sicilia				1	1	1
Toscana	1					
Trento	6	4	1			
Veneto					3	
ITALIA	17	14	6	22	22	41

Fonte: SIMAN e BDN: Dati aggiornati al 30/09/2019

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

Tutte le segnalazioni riguardano allevamenti bovini, mentre non si sono registrate segnalazioni per l'allevamento bufalino.

### **Ricerca e sperimentazione**

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

#### ***Ricerca Corrente come Capofila***

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 ed è terminato il 31.03.2019 (prorogato). Il progetto ha avuto origine 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, come la "Mozzarella di Bufala Campana" (DOP). Il test ELISA è al momento il più utilizzato per il controllo della paratubercolosi ed è 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. Lo scopo finale del progetto è stato quello di determinare le performances, in termini

di Sensibilità (Se) e Specificità (Sp) diagnostica, dei test sierologici ELISA in commercio.

A tale scopo sono stati raccolti di campioni di siero e feci di bufale classificate in positive e negative, sulla base dell'esito del test PCR da feci, considerato come riferimento per l'attribuzione dello stato di infezione dell'animale.

Sono stati analizzati 2279 sieri con il kit ELISA ID-Vet, 2176 sieri con il Kit ELISA IDEXX, modificato con anticorpo secondario disegnato sulla specie bufalina, e 2259 feci mediante IS900-qPCR. I campioni provenivano da 11 diversi allevamenti appartenenti a due regioni diverse, il Lazio (province di Frosinone, Latina e Roma) e la Campania (province di Caserta e Salerno), dove è massima la diffusione dell'allevamento bufalino.

Il *gold standard* raccomandato dal "Manuale dei test diagnostici e dei vaccini relativi agli Animali Terrestri dell'OIE" per la diagnosi in vivo della paratubercolosi è la coltura. Tuttavia, sebbene la specificità diagnostica, accoppiata alle prove identificative, sia prossima al 100%, la sensibilità di questo test è bassa. Inoltre, a causa dei lunghi tempi di incubazione, questo tipo di test è considerato poco adatto ad essere utilizzato come standard di riferimento nella convalida dei test indiretti. Per queste ragioni, alcuni autori hanno proposto i test PCR come standard, dato che questi si sono rivelati essere sufficientemente sensibili e soprattutto molto rapidi, se paragonati all'esame colturale. Su questa base, si è deciso di confrontare la PCR e i test ELISA commerciali, utilizzando un approccio Bayesiano a classi latenti.

I valori di Se e Sp stimati variavano sulla base del cut-off scelto per ciascuno dei tre test (2 test ELISA e 1 test qPCR), valutando diversi cut-off per ciascun test e provando le diverse combinazioni. I dati sono nella tabella seguente:

Scenario	Cutoff	Se			Sp			Bayesian P-value
		IDVET	IDEXX	PCR	IDVET	IDEXX	PCR	
1	PCR 36, IDVET 70, IDEXX 55	72.3	72.3	52.6	99.2	97.8	99.2	0,316
2	PCR 38, IDVET 70, IDEXX 55	63.1	59.2	58.2	99.4	97.7	98.6	<b><u>0,572</u></b>
3	PCR 36, IDVET 60, IDEXX 45	71.0	74.7	52.0	99.3	96.7	99.3	0,164
4	PCR 38, IDVET 60, IDEXX 45	60.3	61.1	57.0	99.4	96.6	98.8	0,565

Il modello migliore (Bayesian p-value più elevato: 0,572) è risultato il secondo.

Si rileva che il grado di concordanza tra i due test, misurato con la K di Cohen, è stato di 0.384, risultando dunque scarso. Questo valore di concordanza tra i due test

è legato principalmente al diverso target cui sono dirette le due metodiche (anticorpi nel sangue per la metodica ELISA, DNA nelle feci per la PCR).

I dati di performances diagnostiche nei confronti di questa malattia nella specie bufalina risultano in linea con quelle della specie bovina e pertanto consentono, anche nel bufalo l'utilizzo dei test previsti per la specie bovina nell'applicazione delle *Linee Guida per l'adozione di piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria nei confronti della paratubercolosi*.

I dati preliminari ottenuti nell'ambito del progetto sono stati presentati al XVIII Congresso SIDILV (Perugia, 7 novembre 2018) e saranno presentati al 51° Congresso Nazionale di Buiatria (Parma, 7-8 novembre 2019) e al prossimo Congresso Internazionale sulla Paratubercolosi (Dublino, 14-18 giugno 2020).

### ***Ricerca Corrente come Unità Operativa***

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

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 ed è terminato il 31.10.2019 (prorogato). MAP è un organismo caratterizzato da una lenta crescita e da scarsa variabilità genetica. Uno degli obiettivi del progetto è stato quello di seguire la naturale evoluzione di questo microorganismo in condizioni naturali. 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). Il DNA da 43 ceppi è stato isolato e sottoposto ad analisi WGS. Il primo step eseguito su questi isolati di campo è stato quello di analizzare 13 loci mini- e micro-satelliti, in cui si è dimostrato come tutti i ceppi mostrassero un identico profilo. L'analisi WGS ha dimostrato un elevato grado di omogeneità genomica fra i ceppi sequenziati, infatti non sono stati ritrovate nè delezioni, nè inserzioni all'interno del genoma di questi isolati di campo. Tuttavia, è stato possibile riconoscere almeno 7 SNPs (pos7, pos33, pos68, pos43, pos53, pos37 e pos19) informativi, presenti cioè in almeno due isolati. L'analisi filo-dinamica utilizzando un approccio di tipo bayesiano (eseguita utilizzando la suite Beast2) ha mostrato una struttura evolutiva coerente della popolazione di ceppi, suggerendo l'ipotesi che un singolo evento infettivo (unico clone) abbia originato l'infezione nella mandria. Attraverso questa analisi è stato anche possibile indicare una possibile data di infezione, tuttavia, ancorché tale data sia stata confermata da informazioni anamnestiche, gli intervalli di confidenza sono troppi ampi per garantirne un margine di credibilità sufficiente. Inoltre, l'analisi filo-dinamica ha mostrato come i ceppi di MAP si siano evoluti in maniera

indipendente rispetto al loro ospite. Infatti dallo stesso ospite sono stati isolati ceppi appartenenti a differenti clusters, ma d'altra parte ceppi del medesimo cluster sono stati trovati in più ospiti. Ulteriori analisi, eseguite utilizzando specifici software di clusterizzazione, hanno permesso di chiarire come l'ipotesi più probabile sia quella di una coinfezione e non di un processo evolutivo.

I dati parziali ottenuti nell'ambito del progetto sono stati presentati come comunicazione orale al XVIII congresso SIDILV (Perugia, 7 novembre 2018) e saranno prossimamente pubblicati.

- 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 31.03.2020 (progetto prorogato).
- 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 è iniziato il 1.9.2016 ed è terminato il 31.8.2019 (progetto prorogato).
- 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 è iniziato il 1.11.2016 e terminerà il 31.10.2020 (progetto prorogato).
- Progetto di ricerca corrente IZS SA 2017/108: "Automazione e validazione di un test fagico per la rilevazione di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) in campioni clinici di bovini". (Responsabile scientifico: A. Ruiu). Il progetto è iniziato il 01.12.2017 e terminerà il 30.11.2020 (progetto prorogato).
- Progetto di ricerca corrente IZS PLV 2018/05 RC: "Valutazione del profilo immunitario delle cellule T nella diagnosi precoce della malattia di Johne's" (Responsabile scientifico: M.S. Gennero). Il progetto è iniziato il 20.12.2018 e terminerà il 19.12.2020.
- Progetto di ricerca corrente IZS PLV 2018/06 RC: "Titolo del progetto: L'interpretazione dei dati di sequenziamento dell'intero genoma nello studio delle dinamiche d'infezione di *M. bovis* e *M. paratuberculosis*: quanto si adatta l'approccio matrice SNPs?" (Responsabile scientifico: M. Goria). Il progetto è iniziato il 20.12.2018 e terminerà il 19.12.2020.

### **Ricerca Finalizzata**

Nulla da segnalare.

- **Progetti di ricerca finanziati da altri Enti (titolo, stato dell'arte dei lavori, ecc.)**
  - Si è concluso (data scadenza accordo di collaborazione scientifica: 31.1.2019) un accordo di collaborazione con la **ditta Nestec Ltd**, per la validazione di metodologie finalizzate alla ricerca di MAP nel latte crudo, trattato termicamente e nel latte in

polvere. Le metodologie comprendono il test microbiologico, la PCR e la metodica "phage assay". Lo scopo del progetto è stato quello di valutare la sensibilità analitica, i valori di esattezza (somma delle accordanze diviso la somma delle accordanze e delle discordanze tra il valore atteso e il valore ottenuto) e il LOD dei tre metodi nelle tre diverse matrici, in accordo con la ISO16140.

I campioni sono stati allestiti presso i laboratori Nestec, contaminando artificialmente latte crudo, latte trattato termicamente e latte in polvere ricostituito.

I campioni sono stati poi distribuiti ai laboratori che li hanno analizzati entro tre settimane dal loro arrivo in laboratorio. Il C.R.N. ha analizzato 360 campioni in totale per le prove di sensibilità, eseguite come definito dalla ISO 16140:2016 rev 2, in particolare 40 campioni per i tre tipi di prodotti diversi, da analizzare con tre metodiche differenti. A questa prima fase ha fatto seguito l'analisi di 450 campioni per le prove di definizione del LOD (limit of detection) (50 campioni per ogni tipo dei tre prodotti, da analizzare con le tre metodiche), secondo quanto riportato nella medesima ISO. Un analogo numero di campioni è stato analizzato da un altro laboratorio di riferimento (Neiker, Bilbao, Spagna). Dai risultati è emerso come le metodiche PCR e colturali possiedano buone performances in termini di sensibilità ed esattezza, atte a consentirne l'utilizzo anche per la rilevazione di MAP negli alimenti. Questo non si è rivelato vero per il phage assay che, nelle condizioni in cui è stato condotto lo studio, non ha dimostrato di essere né sensibile, né affidabile. Inoltre, lo studio ha evidenziato come sia la sensibilità che il limite di rilevabilità cambino sulla base sia della matrice e sia della metodica considerata. I risultati finali sono stati pubblicati su rivista internazionale (vedi elenco pubblicazioni) e saranno presentati al XVIII Congresso SIDILV (Matera, 23-25 ottobre 2019).

- Accordo di collaborazione con IZS Mezzogiorno (Capofila: dott.Esterina De Carlo, responsabile Centro di referenza Nazionale sull'igiene e le tecnologie dell'allevamento e delle produzioni bufaline, Sezione Diagnostica di Salerno) per l'esecuzione di un Piano di monitoraggio sulla prevalenza della paratubercolosi nella popolazione bufalina della regione Campania e per la valutazione dell'applicabilità del Piano Nazionale alla specie bufalina. Nel periodo 2016-2018 sono stati analizzati, mediante kit ID-Vet (Montpellier, France), 200.617 sieri di animali di età > 24 mesi, provenienti da 995 aziende delle province di Salerno (286) e Caserta (709), rappresentativi di circa il 90% della popolazione regionale. La Sieroprevalenza apparente (SAP) inter-aziendale è risultata pari al 54,87% (IC95% 51,72-57,99%), con 137 allevamenti positivi a Salerno (47,90%, IC95% 41,98-53,86%) e 409 a Caserta (57,68%, IC95% 53,95-61,35%). A livello di singolo capo, la SAP è risultata pari all'1,73% (3.478 capi positivi su 200.167, IC95% 1,67-1,79%). I dati di SAP intra- ed inter-aziendale risultano sovrapponibili a quelli osservati nella specie bovina e le performances dei test sierologici adeguate alla specie. Suddividendo le aziende in base alla SAP intra-aziendale in 3 classi (negativi; prevalenza ≤5%; prevalenza >5%), si rileva come il 90,2% degli allevamenti potrebbero accedere alle qualifiche di PT2 (allevamento negativo, 45,3% delle aziende) o a basso rischio (PT1,

44,9% delle aziende). In conclusione, in regione Campania la malattia è diffusa negli allevamenti bufalini, con valori di SAP sovrapponibili a quelli rilevati negli allevamenti bovini in Italia. Le performances dimostrate dal test ELISA ne hanno confermato la validità per il suo utilizzo nell'ambito dei piani di controllo. Inoltre, le Linee guida sono risultate applicabili, oltre alla specie bovina, anche a quella bufalina, utilizzando gli stessi test diagnostici e gli stessi strumenti di valutazione del rischio.

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

- Accordo di collaborazione scientifica (data avvio 8.3.2016; data scadenza 7.3.2020) con il Parco Tecnologico Padano, per lo studio delle caratteristiche genomiche di MAP, attraverso l'analisi dell'intero genoma, utilizzando metodiche Next generation Sequencing (NGS).
- Material Transfer Agreement con l'Istituto Spallanzani di Roma (data avvio 16.11.2016; data scadenza 15.11.2021). L'obiettivo del progetto è valutare l'uso della tecnologia MALDI-TOF per l'identificazione di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) e un suo eventuale impiego nella sub-tipizzazione dei ceppi.
- Accordo di collaborazione scientifica (data avvio 14.12.2017; data scadenza 13.12.2020) con Università di Milano, Dipartimento di Medicina Veterinaria, Reparto Anatomia Patologica, finalizzato allo studio delle malattie da Micobatteri negli animali. Nell'ambito della collaborazione è un corso la stesura di lavoro scientifico, relativo alla diagnosi di paratubercolosi in orici pervenuti dal Parco delle Cornelle (BG). I risultati dello studio sono stati presentati al Congresso "Veterinary pathology and Veterinary clinical pathology" 25-28 settembre 2019, Arnhem, The Netherlands (vedi pubblicazioni in atti di congressi), saranno presentati al Convegno nazionale AIE (Catania, 23-25 ottobre 2019) e saranno oggetto di prossima pubblicazione.
- Accordo di collaborazione scientifica (data avvio 20.12.2018; data scadenza 19.12.2021) con Università di Milano, Dipartimento di Medicina veterinaria, Centro clinico veterinario e zootecnico sperimentale (Lodi), finalizzato lo studio sulle Micobatteriosi negli animali.
- Material transfer agreement (data avvio 13.11.2018; data di scadenza 12.11.2020) con l'Università degli Studi di Bari "Aldo Moro" per la cessione campioni di sieri e feci di campo, positivi e negativi e ceppi di campo di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.
- Material Transfer Agreement (data avvio 4.11.2016, data scadenza 3.11.2018) con l'Università degli Studi di Pisa, Dipartimento di Scienze Veterinarie, per una

collaborazione relativa alla tipizzazione da parte del C.R.N. di ceppi di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mediante analisi loci mini- e microsatteliti ed eventuale Whole Genome Sequencing.

### Aggiornamento e formazione professionale

#### • Corsi che il C.R.N. ha organizzato o a cui ha partecipato

- Il C.R.N. (Dr. 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 “Paratuberculosis: possibili aspetti zoonotici”, organizzato dall’IZSLER, aperto dal 1.3.2018 al 30.11.2018.
- Il C.R.N. (Dr. C. Garbarino) ha partecipato come relatore all’incontro formativo per allevatori della Provincia di Parma e di Piacenza (aderenti al PRC 2018 005), presso la Sede territoriale di Piacenza, il 07.02.2019, con una relazione dal titolo: “Paratuberculosis dei piccoli ruminanti: come riconoscerla e affrontarla per limitare i danni”.

#### • Convegni/congressi che il C.R.N. ha organizzato o a cui ha partecipato

- Il C.R.N. ha organizzato 1° Congresso Nazionale sulla Paratuberculosis (con ECM), presso la Facoltà di Medicina Veterinaria dell’Università degli Studi di Bologna, il 4.12.2018.

Il **programma** viene di seguito riportato:

08.00 - 08.30	Registrazione partecipanti
08.30 - 09.00	Saluti di benvenuto
09.00 - 10.00	Overview sulla situazione mondiale e aggiornamento delle conoscenze sul possibile ruolo zoonotico (N. Arrigoni)
10.00 - 11.00	Paratuberculosis: cosa dobbiamo sapere per controllarla (D. Kelton)
11.00 - 11.45	Nuovi strumenti diagnostici e loro potenzialità (M. Ricchi)
11.45 - 12.15	Linee guida per il commercio internazionale: la proposta di IAP (International Association for paratuberculosis) (M. Tamba)
12.15 - 12.45	La vaccinazione: pro e contro nei bovini e negli ovicapri (N. Pozzato)
12.45 - 13.15	Paratuberculosis nel bufalo: risultati di uno studio di prevalenza (E. De Carlo)
13.15 - 13.30	Discussione
14.30 - 16.00	Tavola Rotonda: Stato di applicazione delle Linee Guida Nazionali (Moderatori: L. Ruocco, N. Arrigoni)
16.00 - 16.30	Conclusioni e prospettive (L. Ruocco)
16.30 - 17.00	Compilazione questionario apprendimento e soddisfazione

Di seguito viene riportata un breve sunto degli indicatori relativi all’evento organizzato:

Numero iscritti	<b>161</b>	esclusi relatori, docenti, etc.
Rilevanza degli argomenti trattati	<b>4,46</b>	Media (min 1, max 5)

Qualità educativa dell'evento	<b>4,73</b>	Media (min 1, max 5)
Utilità dell'evento	<b>4,59</b>	Media (min 1, max 5)
Influenza dello sponsor	<b>1,24</b>	Media (min 1, max 5)
Capacità espositiva dei docenti	<b>4,23</b>	Media (min 1, max 5)
Soddisfazione aspettative argomenti trattati	<b>3,40</b>	Media (min 1, max 5)
Valutazione materiale di supporto	<b>3,33</b>	Media (min 1, max 5)
Idoneità e funzionalità delle infrastrutture	<b>3,30</b>	Media (min 1, max 5)
Consiglierebbe il corso ad altri colleghi		
Sì	<b>100,00 %</b>	
No	<b>0,00 %</b>	
Non risponde	<b>0,00 %</b>	
Problemi causati da durata o orari		
Sì	<b>14,68 %</b>	
No	<b>85,32 %</b>	
Non risponde	<b>0,00 %</b>	

- Il C.R.N. ha organizzato, a Parma, presso la facoltà di Medicina Veterinaria, il 5.12.2018, in collaborazione con l'Università degli Studi di Parma e con l'Ordine dei Medici veterinari di Parma, una conferenza sul **“Ruolo del Veterinario aziendale nella gestione sanitaria degli allevamenti bovini”**, con particolare riferimento alla paratubercolosi (Relatore prof. David Kelton, University of Guelph, Canada).
- Il C.R.N. (Dr. N.Arrigoni) ha partecipato al **50th National Congress of the Italian Association of Buiatrics**, Bologna, dal 10 al 13.10.2018 con una presentazione orale: Arrigoni N, Boldini M, Galletti G, Ruocco L, Gemma Brenzoni L, Farioli M, Gradassi M, Ventura G, Giovannini S, Paterlini F, Rosignoli C, Martinelli C, Garbarino C, Tamba M (2018). **“Bovine paratuberculosis in Lombardy: results after four years of application of the National Guidelines”** (vedi pubblicazioni su atti di congressi).
- Il C.R.N. (Dr. M.Ricchi) ha partecipato al **XVIII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.** Perugia, 7-9 Novembre 2018, con tre contributi (vedi pubblicazioni su atti di congressi):
  - Scaltriti E., Bolzoni L., Russo S., Pongolini S., Casadei G., Arrigoni N., Ricchi M. **“Studio dell'evoluzione di un clone di Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis all'interno di un singolo allevamento utilizzando whole genome sequencing”** (presentazione orale).
  - Ricchi M., Galletti G., Russo S., Gamberale F., Martucciello A., Pietrella G., De Carlo E., Tamba M., Arrigoni N. **“Valutazione delle performance di kit sierologici per la diagnosi di paratubercolosi nel bufalo (Bubalus bubalis): un approccio a classi latenti. Dati preliminari”** (poster).
  - Mazzone P., Di Paolo A., Curcio L., Corneli S., Ortenzi R., Sebastiani C., Ciullo M., Spaccini G., Biagetti M., Valiani A., Pezzotti G., Cammi G., Arrigoni N. **“Valutazione della sopravvivenza di Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) ai processi di trasformazione del latte ovino”** (poster).

- Il C.R.N. (Dr.N.Arrigoni) ha partecipato come relatore al convegno «Action Johnes conference: building on success», a Worcester (UK), 30.1.2019 con una relazione orale dal titolo “Bovine ParaTB in Italy: results after five years of application of the national guidelines”.
- **Comitati scientifici e gruppi di lavoro a cui ha partecipato il personale del C.R.N.**
  - Il C.R.N. ha organizzato una riunione dei referenti degli Istituti Zooprofilattici per la paratubercolosi, a Bologna, il 3.12.2018, per la discussione dei risultati del ring test sierologico e dello stato di applicazione delle Linee guida nelle varie Regioni, sulla base dei risultati di un questionario inviato da parte del C.R.N. a tutti i Referenti IZZSS.

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

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

Nulla da segnalare

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

- E' stata fornita una attività di **consulenza al Ministero della Salute** a seguito della richiesta pervenuta per le vie brevi il 18.10.2018 dal Dr. Luigi Ruocco (risposta del 19.10.2018, prot. 32215), relativo all'invio di una scheda tecnica sulla paratubercolosi nella specie caprina, con riferimento alla vaccinazione.
- E' stato fornito un **Parere alla provincia autonoma di Trento** (richiesta prot. S/128/2019/136213 del 28.2.2019, risposta del 1.3.2019), relativo all'applicazione di un Piano di monitoraggio negli allevamenti caprini e ovini produttori di latte destinato al consumo umano.

In C.R.N. ha espresso parere favorevole in considerazione del fatto che:

- la paratubercolosi è ampiamente diffusa nell'allevamento ovino e caprino, dove può raggiungere livelli di prevalenza elevata e causare danni economici ingenti agli allevamenti;
- tali specie non sono contemplate nel campo di applicazione delle “Linee guida per l'adozione dei piani di controllo e certificazione nei confronti della paratubercolosi bovina”, che non costituiscono pertanto un vincolo relativamente ai criteri da adottare per eventuali piani di controllo per l'allevamento ovino e caprino;
- il piano di monitoraggio proposto, da attuare sui campioni prelevati nell'ambito del piano di monitoraggio per la Brucellosi, consentono di raggiungere i livelli di sensibilità definiti (rilevazione di almeno l'80% di allevamenti con prevalenza superiore al 10%) ipotizzando una sensibilità del test ELISA del 50% e una specificità superiore al 99%, dati in linea con quanto

riportato in letteratura per l'applicazione del test sierologico ELISA su animali appartenenti a queste specie e di età superiore a 12 mesi;

- il piano di monitoraggio proposto costituirà un elemento di valutazione indispensabile per decidere le azioni conseguenti di controllo sulla popolazione ovina e caprina del territorio.

- E' stato fornito un **Parere alla provincia autonoma di Trento** (richiesta Prot. S128/2019/114886/22.17.3-2019-13 del 20.2.2019, risposta del 11.3.2019), relativamente alla possibilità di adozione di test di conferma mediante PCR dalle feci in allevamenti con sospette false positività sierologiche.

Il CRN ha espresso parere favorevole alla proposta, limitatamente ad allevamenti in cui l'analisi sierologica sia stata eseguita su tutti i capi di età inferiore a 36 mesi (protocollo S2) e in cui la sieroprevalenza risulti inferiore al 3%, in considerazione del fatto che:

- la specificità del test sierologico risulta mediamente molto elevata (superiore al 99%), ma in alcuni allevamenti si sono comunque riscontrate reazioni falsamente positive;
- le false positività si manifestano generalmente a basso livello di prevalenza.

L'eventuale conferma mediante PCR di almeno un campione di feci comporta la conferma della presenza di infezione in allevamento; in questo caso, ai fini del calcolo della sieroprevalenza e della conseguente attribuzione di qualifica sanitaria, tutti i capi sieropositivi sono da considerare infetti, anche se negativi alla PCR.

Si è raccomandato inoltre di non eseguire i prelievi per le analisi sierologiche nei tre mesi successivi all'esecuzione della prova intradermica per la profilassi della tubercolosi, che potrebbe essere causa di reazioni falsamente positive.

- E' stata fornita una attività di **consulenza al Focal Point Network EFSA** (richiesta pervenuta per mail il 18.1.2019, risposto in data 12.2.2019), **su richiesta del Ministero della Salute della Repubblica Ceca.**

Di seguito viene riportato il contenuto della richiesta e le relative risposte (autori: N.Arrigoni e M.Ricchi, C.R.N. Paratubercolosi)

The following replies are relative to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP).

Q 1) Have the possible human health risks linked to NTM ever been assessed in your country? (what are the outcomes?)

R 1) In Italy, for MAP, no dose-response studies have been carried out. However, there are several studies which highlight a higher probability to recover live MAP, MAP DNA or antibodies against MAP epitopes in patients affected by some chronic diseases (Crohn's Disease: CD, Multiple Sclerosis: MS, Type 1 Diabetes: T1D, Hashimoto's thyroiditis: HT). These studies are reported in details in the further answers.

Q 2) Are you aware of research in your country focused specifically on the relation between the exposure to NTM and the occurrence of chronic inflammatory and autoimmune diseases (namely Crohn's disease)?

R 2) Relatively to CD, a study carried out in Northern Italy [1], reported a higher prevalence of MAP DNA in CD patients compared to controls ( $p < 0.0003$ , OR = 7.7). The same study reported that in the area where the CD patients were recruited, MAP DNA circulated through drinking tap water (prevalence 3.3%). Other studies carried out in Sardinia Island reported a higher presence of MAP DNA in mucosal biopsies from CD [2, 3] and Irritable Bowel Syndrome (IBS) patients compared to healthy controls [3]. Further studies carried out in Sardinia Island

investigated a possible association between MAP DNA and other chronic diseases. In particular, the DNA of MAP has been recovered from the blood of T1D patients (63%) in a higher proportion compared to controls (16%) [4]. The same association has been found for MS in sardinian patients (42% of MS patient were PCR positive vs 12% controls) [6].

Moreover, other studies hypothesized that, based on a phenomenon called “molecular mimicry”, the exposure to MAP can induce the production of antibodies against specific epitopes of MAP which are similar to host epitopes, finally leading to an autoimmune reaction against self antigens of myelin and pancreatic beta-cells [8]. In this regard, a higher proportion of antibodies against MAP was found out in autoimmune T1D patients (47.3%) compared to non diabetic (12.6%) and non-autoimmune T2D patients [9]. Antibodies against Lp5, a specific MAP antigen, were also detected in T1D patients from central Italy (Rome) [10]. MAP has also antigens homologous to insulin and Znt8 (two major autoantigens of T1D), recognized in T1D patients but not in controls [5]. The same mechanism has also been suggested in the pathogenesis of HT, with a higher prevalence of antibodies against MAP in affected patients compared to control [11]. Moreover, anti MAP antibodies were found in serum and in cerebro-spinal fluid of MS patients [7]. On the other hand, in Neuromyelitis optica, antibodies against specific MAP antigens (PtpA and PknG) [12] and bacterial proteins homologous to myelin proteins have been reported [13] and antibodies against MAP have been found also in Parkinson’s disease compared to controls [14]. Another chronic disease, the Rheumatoid Arthritis, has also a high incidence in Sardinia, where a study reported in these patients an association between MAP and factors (interferon regulatory factor 5), involved in autoimmunity [15].

Finally, the pathogenesis of these chronic diseases is considered multifactorial, with a genetic predisposition linked to specific host polymorphisms implicated in the innate immune system. In this regard, some polymorphisms in CARD15 and SLC11A1 genes have been associated with CD [2], T1D [9] and MS Sardinian patients [16, 17].

Q 3) Do you monitor the prevalence of NTM in water and relevant foodstuffs (milk, ice cream, baby food, ...)?

R 3) At the moment no regulations or other enforcement acts require the testing of foodstuff for the presence of MAP. There are several studies addressed at determining the presence and quantifying the amount of MAP in bovine milk (both raw and pasteurized), goat milk, sheep milk and beef, which are considered the most probable sources of exposure for humans to MAP.

More in details, for bovine milk, a study analysed the bulk tank milk (BTM) of almost 90% (2934 samples) of the dairy herds present in the Emilia Romagna region, finding out 26% of PCR positive samples [18]. However, only a small proportion (3%) of these samples contained MAP in excess of the limit of detection (15 cells per ml) and their quantification showed a median value of 32 cell/ml of milk (16 to 1424 MAP cells/ml), indicating low potential exposure for consumers if the milk undergoes pasteurization.

A quantitative exposure assessment was carried out on 569 herds delivering milk to three industrial dairy plants, placed in three different Italian regions [19]. The study estimated the survival probability of MAP in pasteurized milk by modelling MAP concentration in raw milk, dilution effect due to mixing milk in collecting trucks and in plant silos and the effect of pasteurization. Overall, the estimated fraction of litres of pasteurized milk containing at least one live MAP was 0.55% to 0.98%.

A further study carried out on 160 bottles of pasteurised retail milk, coming from the same processors, failed to detect any viable MAP cell [20].

Regarding cheeses, a study carried out in Tuscany region reported the presence of MAP DNA in goat and sheep cheeses (soft, semi-hard and hard) [21]. The prevalence of PCR positive samples was 57% for goat cheese and 56% for sheep cheese. However, only one soft cheese, made by goat raw milk, was positive to cultural test.

A challenge study on hard cheeses made from raw bovine milk (Parmigiano Reggiano and Grana Padano), carried out by spiking milk with high MAP concentrations (>100,000 per ml), showed that no viable MAP cells were detectable after 50-80 days of ripening [22]. Taking into consideration the long ripening period (at least nine months) and the milk contamination levels observed in the area of production [18], the probability of MAP survival in these products seems to be low.

A study carried out on ground beef from an industrial meat plant detected viable MAP cells in 2 out of 140 samples. Each sample was representative of a different batch of meat, each of 12 tons and obtained from 50-80 cows at the end of their productive careers [23].

No surveys have been carried on ice cream and baby food.

Q 4) Have your authorities applied any measures or any legislative measures for reduction of risks associated with NTM?

R 4) At the herd level, the Ministry of Health, in October 2013 has issued the “Guidelines for the control of bovine paratuberculosis and for assessing the health ranking of herds”, available at the website of the Italian National reference Centre for paratuberculosis:

[https://www.izsler.it/izs\\_bs/allegati/443/SR\\_Linee\\_guida.PDF](https://www.izsler.it/izs_bs/allegati/443/SR_Linee_guida.PDF)

These guidelines have been formally adopted by all administrative regions of the Country, but their application, being voluntary, is not uniform throughout the Italian territory. Among the objectives of the guidelines, there is the implementation of voluntary herd control program, which is aimed at reducing the prevalence of the disease and therefore the contamination of animal products.

For this purpose, the National guidelines include two manuals for the control of paratuberculosis in dairy and beef herds, available at the website of the Italian National reference Centre for paratuberculosis:

[https://www.izsler.it/izs\\_bs/allegati/443/Allegato%201%20A\\_MANUALE\\_latte\\_Rev\\_1.pdf](https://www.izsler.it/izs_bs/allegati/443/Allegato%201%20A_MANUALE_latte_Rev_1.pdf)

[https://www.izsler.it/izs\\_bs/allegati/443/Allegato%201\\_B\\_MANUALE\\_carne\\_Rev\\_1.pdf](https://www.izsler.it/izs_bs/allegati/443/Allegato%201_B_MANUALE_carne_Rev_1.pdf)

All these documents are written in Italian.

- E' stato realizzato un tirocinio formativo a scopo di Tesi di specializzazione (**Dipartimento di scienze veterinarie, Scuola di Specializzazione in Ispezione degli alimenti, Università degli studi di Pisa**, anno accademico 2018/2019), dal 20.07.2018 al 30.09.2019 della specializzanda Alessia Galiero, dal titolo: "Valutazione della sopravvivenza di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* nel Parmigiano Reggiano e nel Grana Padano" (Relatore: Prof. Filippo Fratini, Correlatore: Dott. Norma Arrigoni).
- E' stato realizzato un **tirocinio formativo dal 17.11.2018 al 30.11.2018 richiesto dall'Università degli Studi di Bari, Facoltà di Medicina Veterinaria**, per la frequenza da parte del Dott. Alessio Sposato ai laboratori del C.R.N., per l'approfondimento dei test diagnostici e della gestione della paratubercolosi in allevamento.
- Il C.R.N. è impegnato, in collaborazione con **l'Università degli studi di Bologna**, per la realizzazione di un piano di controllo e certificazione nei 64 allevamenti conferenti ad un caseificio della Calabria (Assolac). Nei giorni 11-13 dicembre 2018 è stata realizzata una visita da parte del C.R.N. (Dott. N.Arrigoni) presso il caseificio per una attività di formazione/informazione degli allevatori, in cui è stato illustrato il percorso da intraprendere per il controllo e la certificazione degli allevamenti.

### **Attività di docenza**

- Il C.R.N. (Dr. C.Garbarino) ha svolto attività di docenza 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", il 29/11/2018.
- Il C.R.N. (Dr. N.Arrigoni) ha svolto attività di docenza alla "Giornata di studio sulla paratubercolosi", organizzata dall'Università degli studi di Pisa, nell'ambito della Scuola di Specializzazione in Ispezione degli alimenti, il 18.01.2019, con una relazione dal titolo "Paratubercolosi: aggiornamento sulla situazione mondiale e sui possibili aspetti zoonotici"

### Consulenze e collaborazioni europee

E' stato stipulato un accordo di collaborazione scientifica con il Centro di Referenza OIE Veterinary Research Institut di Brno (CZ), referente Dr.Petr Kralik, della durata di 5 anni (data di avvio: 25.6.2019; data di scadenza: 24.6.2024), che prevede lo scambio di materiali e conoscenze tecniche, attraverso reciproci stage formativi, per la realizzazione di ricerche e pubblicazioni congiunte.

### Consulenze e collaborazioni internazionali

- Il Responsabile del C.R.N. è membro del Board of Directors in rappresentanza dell'Italia nell'International Association for paratuberculosis, associazione scientifica mondiale dedicata allo studio della paratubercolosi.
- E' stato stipulato un Material Transfer Agreement con U.S. Department 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 (scadenza novembre 2021).
- Nel corso del 2018 è stato avviato un gruppo di lavoro internazionale, coordinato dal prof. R.Whittington (University of Sydney, Faculty of Science, Sydney School of Veterinary Science, Farm Animal Health) per fare il punto sulla applicazione dei piani di controllo della paratubercolosi a livello mondiale, con l'obiettivo di pubblicare il lavoro su una rivista impattata. A tale scopo è stato realizzato da parte di un gruppo ristretto un questionario che è stato somministrato ai rappresentanti di 48 Paesi. Per l'Italia, il C.R.N. (Dr.ssa N.Arrigoni, Dr.ssa A.Santi) ha provveduto alla compilazione dei dati richiesti, in collaborazione con il Ministero della Salute (Dr.L.Ruocco). E' stato anche realizzato da parte del C.R.N. uno snapshot relativo alla situazione Italiana, da pubblicare nelle informazioni aggiuntive. Il lavoro è stato pubblicato in giugno 2019 (vedi pubblicazioni con IF).

### Pubblicazioni scientifiche e divulgative

(Nota. Gli autori facenti capo al C.R.N. sono identificati con \*)

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

1. Cammi G\*, Ricchi M\*, Galiero A\*, Daminelli P, Cosciani-Cunico E, Dalzini E, Losio MN, Savi R\*, Cerutti G\*, Garbarino C\*, Leo S\*, Arrigoni N\*. "Evaluation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* survival during the manufacturing process of Italian raw milk hard cheeses (Parmigiano Reggiano and Grana Padano). Int J Food Microbiol. 2019 Jun 8;305:108247. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108247. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31202149. **(IF 4,006).**

2. Whittington R, Donat K, Weber MF, Kelton D, Nielsen SS, Eisenberg S, Arrigoni N\*, Juste R, Sáez JL, Dhand N, Santi A, Michel A, Barkema H, Kralik P, Kostoulas P, Citer L, Griffin F, Barwell R, Moreira MAS, Slana I, Koehler H, Singh SV, Yoo HS, Chávez-Gris G, Goodridge A, Ocepek M, Garrido J, Stevenson K, Collins M, Alonso B, Cirone K, Paolicchi F, Gavey L, Rahman MT, de Marchin E, Van Praet W, Bauman C, Fecteau G, McKenna S, Salgado M, Fernández-Silva J, Dziejzinska R, Echeverría G, Seppänen J, Thibault V, Fridriksdottir V, Derakhshandeh A, Haghkhah M, Ruocco L, Kawaji S, Momotani E, Heuer C, Norton S, Cadmus S, Agdestein A, Kampen A, Szteyn J, Frössling J, Schwan E, Caldow G, Strain S, Carter M, Wells S, Munyeme M, Wolf R, Gurung R, Verdugo C, Fourichon C, Yamamoto T, Thapaliya S, Di Labio E, Ekgat M, Gil A, Alesandre AN, Piaggio J, Suanes A, de Waard JH. "Control of paratuberculosis: who, why and how". A review of 48 countries. BMC Vet Res. 2019 Jun 13;15(1):198. doi: 10.1186/s12917-019-1943-4. Review. PubMed PMID: 31196162; PubMed Central PMCID: PMC6567393. **(IF 1,792)**.
3. Butot S, Ricchi M\*, Sevilla IA, Michot L, Molina E, Tello M, Russo S\*, Arrigoni N\*, Garrido JM, Tomas D. "Estimation of performance characteristics of analytical methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection in dairy products. Front Microbiol. 2019 Mar 15;10:509. doi: 10.3389/fmicb.2019.00509. eCollection 2019. PubMed PMID: 30930883; PubMed Central PMCID: PMC6428696. **(IF 4,259)**.
4. Gamberale F, Pietrella G, Sala M, Scaramella P, Puccica S, Antognetti V, Arrigoni N\*, Ricchi M\*, Cersini A "Management of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy farms: selection and evaluation of different DNA extraction methods from bovine and buffaloes milk and colostrum for the establishment of a safe colostrum farm bank". MicrobiologyOpen. 2019;00:e875. DOI: 10.1002/mbo3.875 **(IF 2,738)**.

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

5. Arrigoni N\*, Boldini M, Galletti G, Ruocco L, Gemma Brenzoni L, Farioli M, Gradassi M, Ventura G, Giovannini S, Paterlini F, Rosignoli C, Martinelli C, Garbarino C\*, Tamba M (2018). "Bovine paratuberculosis in Lombardy: results after four years of application of the National Guidelines". Proc. 50th National Congress of the Italian Association of Buiatrics, Bologna, 10-13 October 2018, pag.85.
6. Scaltriti E, Bolzoni L, Russo S, Pongolini S, Casadei G, Arrigoni N\*, Ricchi M\* "Studio dell'evoluzione di un clone di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* all'interno di un singolo allevamento utilizzando whole genome sequencing". Atti XVIII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. Perugia, 7-9 Novembre 2018, pag.64.
7. Ricchi M\*, Galletti G, Russo S\*, Gamberale F, Martucciello A, Pietrella G, De Carlo E, Tamba M, Arrigoni N\*. "Valutazione delle performance di kit sierologici per la diagnosi di paratubercolosi nel bufalo (*Bubalus bubalis*): un approccio a classi latenti.

- Dati preliminari” Atti XVIII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. Perugia, 7-9 Novembre 2018, pag. 194.
8. Mazzone P, Di Paolo A, Curcio L, Corneli S, Ortenzi R, Sebastiani C, Ciullo M, Spaccini G, Biagetti M, Valiani A, Pezzotti G, Cammi G\*, Arrigoni N\* “Valutazione della sopravvivenza di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) ai processi di trasformazione del latte ovino”. Atti XVIII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. Perugia, 7-9 Novembre 2018, pag.92.
  9. Procopio A, Paternoster G, Leo S\*, Mammi L, Fustini M, Galletti G, Santi A, Formigoni A, Tamba M, Arrigoni N\* “Evaluation of economic losses due to paratuberculosis in a bovine dairy herd in Northern Italy, 2012-2016”. Proc. 15th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, 12-16 november 2018, Chiang Mai, Thailand, pag.414.
  10. Pigoli C, Oltolina M, Bonacina E, Sironi G, Garbarino CA\*, Ricchi M\*, Gibelli LR: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). Proc. Internazional Congress Veterinary pathology and veterinary clinical pathology, 25-28 settembre 2019, Arnhem, The Netherlands, pag.126.

### **Attività di referaggio:**

Nel periodo considerate sono stati effettuati 7 referaggi per riviste impattate:

- 2 da N.Arrigoni (entrambe per Veterinaria Italiana)
- 5 da M.Ricchi (1 per Journal of Applied Microbiology, 1 per Mycoscience, 1 per Tropical Animal Health and Production, 2 per Letters in Applied Microbiology).

### **Sito Web**

Il sito, ove sono disponibili le informazioni relative alla malattia, i manuali per il controllo, le informazioni sulle attività del C.R.N. (formazione, ring test), e l’archivio fotografico, è stato completamente aggiornato in dicembre 2018, secondo un format IZSLER comune a tutti i centri di referenza.

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.R.N. 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.R.N.; nell'anno in corso è stata utilizzata per la gestione del ring test per la diagnosi diretta di Paratubercolosi mediante PCR e/o coltura.

## **Centro di Referenza Nazionale (C.R.N.) Paratubercolosi** **Programmazione attività per il periodo 1.10.2019 – 30.09.2020**

### **Obiettivi strategici**

Sviluppare maggiormente i rapporti nazionali ed internazionali.

#### **A livello nazionale:**

- Intensificare la collaborazione con i vari IIZZSS e con il Servizio Sanitario nazionale.

##### ***INDICATORI***

- Realizzazione di un ring test per la diagnosi sierologica (ELISA e/o AGID) che coinvolgerà i laboratori di tutti gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali;
- Partecipazione del Centro di Referenza a Progetti di Ricerca Corrente e/o Finalizzata, anche in collaborazione con altri IIZZSS;
- Organizzazione di un congresso nazionale;
- Organizzazione di una riunione con i referenti dei vari IIZZSS;
- Docenze a giornate di formazione per i veterinari del Servizio Sanitario nazionale (ASL e IIZZSS) e per i veterinari aziendali;
- Realizzazione di accordi di collaborazione scientifica e/o Material Transfer Agreement con vari IIZZSS.

- Intensificare la collaborazione con Centri di Ricerca di Medicina Veterinaria (Università, ecc.).

##### ***INDICATORI***

- Realizzazione di accordi di collaborazione scientifica e/o Material Transfer Agreement con altri centri di ricerca;
- Realizzazione di tesi di specializzazione o dottorato.

#### **A livello internazionale:**

- Acquisire maggiore visibilità in campo internazionale.

##### ***INDICATORI***

- Presentazione di risultati di ricerche a congressi internazionali;
- Pubblicazione di lavori scientifici su riviste con impact factor;
- Partecipazione a progetti europei;
- Partecipazione a gruppi di lavoro, comitati scientifici o redazioni editoriali;
- Svolgimento di attività di referaggio per riviste impattate.

### **Attività diagnostica**

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

Invio dei MMPP disponibili agli IIZZSS che ne faranno richiesta.

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

- Produzione e distribuzione di ceppi, sieri, DNA e standard biomolecolari per la diagnostica di MAP;
- Implementazione della “banca” dei materiali di riferimento (sieri, ceppi batterici).

### 3. Attività analitica

La previsione è che l'attività diagnostica routinaria possa subire un aumento, a seguito dell'applicazione delle modifiche previste alle “Linee guida nazionali per l'adozione di piani di controllo e l'assegnazione della qualifica sanitaria degli allevamenti nei confronti della Paratubercolosi bovina”, con introduzione della PCR di conferma sugli animali sieropositivi, in allevamenti a bassa prevalenza.

### 4. Circuiti interlaboratorio organizzati dal C.R.N.

E' in previsione, per i primi mesi del 2020, la realizzazione di un *ring test per la diagnosi sierologica* mediante ELISA e/o AGID su matrici siero e latte bovino, siero bufalino e siero ovicaprino.

Al precedente ring test per la diagnosi diretta avevano aderito 43 laboratori appartenenti a 10 IIZZSS.

### 5. Ring test a cui parteciperà il personale del C.R.N.

E' in previsione:

- la partecipazione al ring test sierologico internazionale mediante metodica ELISA su siero e latte, organizzato da GD Animal Health – Deventer, NE con frequenza annuale.
- la partecipazione ad un ring test annuale per la diagnosi diretta (PCR e coltura), organizzata a livello europeo, per esame colturale e PCR su feci (Ente organizzatore: QA Veterinary Laboratory Agency – UK).

### 6. Altre attività

Nessuna attività in previsione.

## Epidemiologia

### 1. Creazione banca dati

Verrà mantenuto il presidio del sistema Vetinfo relativamente ai casi clinici eventualmente segnalati e alla qualifica sanitaria degli allevamenti, a supporto del sistema di certificazione per l'esportazione. Tali adempimenti sono previsti dalle “Linee guida per l'adozione di Piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria degli allevamenti nei confronti della Paratubercolosi bovina”, per rispondere alle richieste provenienti da paesi terzi in merito alla garanzia che il latte esportato non provenga da allevamenti in cui si siano manifestati casi clinici di Paratubercolosi.

### 2. Sviluppo e gestione di sistemi informativi

Le Linee Guida Nazionali sul controllo della Paratubercolosi lasciano al Ministero della Salute la definizione delle modalità di raccolta dei dati relativi ai controlli (sierologici, microbiologici e di biologia molecolare) svolti nell'ambito dei piani di certificazione e di controllo aziendali. Al momento non si ritiene opportuno attivare un ulteriore sistema informativo autonomo e si ritiene più funzionale aprire al caricamento dei dati relativi ai controlli sierologici il sistema SANAN del Sistema Informativo Veterinario (<https://www.vetinfo.sanita.it/>).

### **3. Studio, sviluppo e gestione di sistemi di sorveglianza, verifica e controllo**

#### ***Linee guida nazionali per l'adozione di piani di controllo e l'assegnazione della qualifica sanitaria degli allevamenti nei confronti della Paratubercolosi bovina***

Il C.R.N. ha elaborato una proposta di modifica/integrazione delle Linee Guida Nazionali, trasmesso al Ministero con prot.30699 del 9.10.2018. Il Ministero, a sua volta, ha trasmesso il documento alle Regioni per la raccolta di pareri ed eventuali osservazioni. Il Ministero, in data 13.11.2019, ha inviato al C.R.N. le osservazioni pervenute; queste verranno valutate dal C.R.N. per giungere ad una versione condivisa delle Linee Guida.

Si segnalano inoltre le seguenti criticità:

- *Gestione dei dati di analisi delle associazioni di allevatori (APA/ARA)*

Attualmente i test diagnostici (sierologia ELISA) per paratubercolosi, oltre che dagli II.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.

Sarebbe opportuno un coinvolgimento attivo del Ministero affinché le AUSL vengano messe a conoscenza degli esiti di tali controlli per evitare la commercializzazione di animali infetti.

- *Incentivi per l'allevatore*

Si condivide l'importanza di un coordinamento tra il Ministero della salute e il Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali per valutare la possibilità di ottenere incentivi per il miglioramento strutturale dell'allevamento, con effetti sulla gestione della Paratubercolosi.

Una proposta potrebbe essere quella di prevedere finanziamenti per supportare gli allevatori nell'ambito del Piano di sviluppo rurale, finalizzati ad adeguamenti strutturali che permettano una miglior gestione igienica dell'allevamento. Questo intervento integrato, basato sulla biosicurezza e sul benessere animale ed effettuato attraverso la consulenza veterinaria con la stesura dei piani di gestione sanitaria, avrebbe effetti positivi nei confronti della Paratubercolosi e di altre patologie (enteriti neonatali, mastiti ambientali, infezioni puerperali).

- *Utilizzo test in autocontrollo per l'assegnazione delle qualifiche sanitarie*

L'analisi in autocontrollo, anche se eseguita in data antecedente la richiesta di qualifica, si ritiene possa essere tenuta valida per l'attribuzione della qualifica stessa, purché i campioni siano stati prelevati dal veterinario aziendale individuato nel piano aziendale, siano indicate le marche auricolari dei capi prelevati e l'analisi sia fatta dall'IZS.

Questo criterio è già applicato in Emilia-Romagna, purché la richiesta di qualifica venga eseguita entro 30 giorni dalla data del prelievo per le analisi.

- *Formazione*

I piani volontari sono spesso interessati da problemi di insufficiente adesione. È opportuno che le Regioni valutino se le ASL debbano avere un ruolo attivo nella formazione e informazione degli allevatori, data la necessità di creare un bacino di allevamenti liberi da malattia che fornisca una rimonta sicura al sistema. È fondamentale attivare un'attività di formazione capillare che raggiunga allevatori, veterinari AUSL, liberi professionisti e industria di trasformazione, individuando i destinatari della formazione.

È necessario ottenere un maggiore coinvolgimento dei veterinari, sia ASL che Liberi Professionisti attraverso l'obbligo di partecipazione a giornate di formazione specifiche (anche tramite FAD) e l'iscrizione in elenchi di veterinari LP abilitati a lavorare per la stesura dei Piani di Gestione Sanitaria.

L'attivazione di Gruppi di miglioramento provinciali (es Bergamo, Brescia, Cremona) che preveda il coinvolgimento di AUSL, IZS (sezione provinciale) e il coordinamento da parte del C.R.N. potrebbe ulteriormente stimolare l'adesione al programma volontario da parte degli allevatori.

- *Allevamento ovi-caprino.*

Verrà valutata la possibilità di estendere all'allevamento ovicaprino le linee guida per l'adozione dei piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria degli

allevamenti nei confronti della Paratubercolosi. Dai dati nazionali, la prevalenza di allevamenti ovini e caprini infetti da Paratubercolosi è pari o superiore rispetto a quella degli allevamenti bovini. Nel corso del prossimo anno verrà realizzata una brochure informativa/divulgativa dal titolo "Paratubercolosi nell'allevamento della capra da latte" destinata ad allevatori e veterinari.

#### **4. Aggiornamenti epidemiologici sulle materie di competenza**

Il C.R.N. continuerà l'attività di coordinamento dei Piani di monitoraggio regionali o provinciali, fornendo attività di supporto per la realizzazione di piani di campionamento e fornendo consulenza per l'elaborazione dei dati.

### **Ricerca e sperimentazione**

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

##### *Ricerca Corrente come Capofila*

- Progetto di ricerca corrente IZS LE 2018/011: "Studio sulla sopravvivenza di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* al processo di produzione della mozzarella ottenuta da latte vaccino e bufalino" (Responsabile scientifico: M.Ricchi). Il progetto è stato avviato il 31.12.2018 e terminerà il 30.12.2020.
- Progetto di ricerca corrente IZS LE 2019/010: "Rischio di infezione da paratubercolosi al pascolo: contributo di ruminanti domestici e selvatici" (Responsabile scientifico: C.Garbarino). Il progetto sarà avviato entro la fine del 2019.

##### *Ricerca Corrente come Unità Operativa*

Il C.R.N. è inoltre coinvolto, come Unità Operativa, nei seguenti Progetti di Ricerca Corrente, 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 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 31.03.2020 (progetto prorogato).
- 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: Responsabile scientifico: M.S.Gennero). Il progetto è iniziato il 1.11.2016 e terminerà il 31.10.2020 (progetto prorogato).
- Progetto di ricerca corrente IZS SA 2017/108: "Automazione e validazione di un test fagico per la rilevazione di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) in campioni clinici di bovini". (Responsabile scientifico: A.Ruiu). Il progetto è iniziato il 01.12.2017 e terminerà il 30.11.2020 (progetto prorogato).

- Progetto di ricerca corrente IZS LE 2018/005: “Analisi di parametri produttivi e loro correlazione con lo stato di benessere in allevamenti di capra da latte” (Responsabile scientifico A.Gaffuri). Il progetto è iniziato il 31.12.2018 e terminerà il 31.12.2020.
- Progetto di ricerca corrente IZS PLV 2018/104: “L'interpretazione dei dati di sequenziamento dell'intero genoma nello studio delle dinamiche di infezione di M. Bovis e M. Paratuberculosis: quanto si adatta l'approccio matrice SNPs” (Responsabile scientifico: M.Goria). Il progetto è iniziato il 20.12.2018 e terminerà il 19.12.2020.
- Progetto di ricerca corrente 2018 PLV 2018/106 “Valutazione del profilo immunitario delle cellule T nella diagnosi precoce della malattia di Johne” (Responsabile scientifico: MS Gennero) il progetto è iniziato il 20.12.2018 e terminerà il 19.12.2020.

### *Ricerca finalizzata*

- E' in fase di presentazione un Progetto di Ricerca finalizzata, per lo sviluppo e la validazione di nuove metodiche di rilevazione di MAP, dal titolo “Quantum dots nanotechnology to implement diagnosis of Paratuberculosis” (Capofila: Dott.ssa Paola Molicotti, Azienda Ospedaliera Universitaria Sassari, Dipartimento di Scienze Biomediche), a cui il CNR parteciperà come Unità Operativa. L'obiettivo del progetto è studiare una nuova metodica di rilevamento di MAP con un approccio nanotecnologico, basato su tecnologia Quantum Dots, per l'applicazione in campo alimentare (rilevazione di MAP nel latte e in altri prodotti lattiero-caseari) ed in campo diagnostico umano, contribuendo a raccogliere dati sul possibile coinvolgimento di MAP nell'eziopatogenesi di alcune malattie dell'uomo (sclerosi multipla, diabete di tipo 1 e malattia di Crohn). Il test sviluppato potrebbe essere utilizzato in associazione a tecniche molecolari, in particolare alla digital PCR, contribuendo a fornire informazioni sul possibile coinvolgimento di MAP nelle fasi precoci dello sviluppo delle suddette malattie dell'uomo con componenti eziopatogenetiche autoimmuni.

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

Nulla da segnalare.

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

Nulla da segnalare.

### **Aggiornamento e formazione professionale**

- **Corsi che il C.R.N. organizzerà o a cui parteciperà;**

Nulla in previsione.

- **Convegni/congressi che il C.R.N. organizzerà o a cui parteciperà;**

- E' in previsione per il secondo semestre del 2020 la realizzazione da parte del C.R.N di un convegno nazionale (9° Congresso Nazionale sulla Paratubercolosi). Sono ancora da definire date e luogo di realizzazione. In questa occasione verranno discusse le novità emerse dal congresso mondiale e verranno forniti aggiornamenti relativi alle modifiche alle Linee guida nazionali.
- Il C.R.N. (Dr. N.Arrigoni) parteciperà al XIX Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., Matera, 23-25 ottobre 2019, con due presentazioni:
  - Cammi G, Ricchi M, Galiero A, Daminelli P, Cosciani-Cunico E, Dalzini E, Losio MN, Cerutti G, Garbarino C, Arrigoni N. "Valutazione della sopravvivenza di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) durante il processo produttivo dei formaggi Parmigiano Reggiano e Grana Padano" (poster).
  - Butot S, Ricchi M, Sevilla IA, Michot L, Molina E, Tello M, Russo S, Arrigoni N, Garrido J, Tomas D. "Performance dei metodi analitici per la ricerca di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* nel latte" (poster).
- Il C.R.N. (Dr. C.Garbarino) parteciperà al XLIII Convegno AIE, Catania, 23-25 ottobre 2019, con una presentazione:
  - Arrigoni N, Pigoli C, Guadagnini D, Ricchi M, Bonacina E, Russo S, Gibelli LR, Garbarino CA. "Isolamento di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in un gruppo di orici dalle corna a sciabola (*Oryx dammah*) in un parco del Nord Italia" (poster).
- Il C.R.N. (Dr. N.Arrigoni) parteciperà al 51° Congresso nazionale Società italiana Buiatria, Parma, 7-8 novembre 2019, con una presentazione:
  - De Carlo E, Ricchi M, Galletti G, Martucciello A, Pesce A, Russo S, Galiero A, Gamberale F, Russo M, Sannino E, Garbarino CA, Cammi G, Arrigoni N. "Paratubercolosi nel bufalo: risultati di uno studio di siero-prevalenza in regione Campania" (comunicazione orale).
- E' in previsione la partecipazione del C.R.N al 15th International Colloquium on Paratuberculosis (Dublin, 14-18 giugno 2020). Il C.R.N. presenterà:
  - i risultati definitivi del Progetto di ricerca corrente IZS LE 2015/002: "Valutazione delle performances dei test sierologici per la diagnosi di Paratubercolosi nella specie bufalina".
  - i risultati preliminari del Progetto di ricerca corrente IZS LE 2018/011 "Studio sulla sopravvivenza di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* al processo di produzione della mozzarella ottenuta da latte vaccino e bufalino".

### **3. Comitati scientifici e gruppi di lavoro a cui parteciperà il personale del C.R.N.**

- E' in previsione l'organizzazione da parte del C.R.N. di una riunione dei referenti degli Istituti Zooprofilattici per la discussione dei risultati dei ring test e dello stato di applicazione delle Linee guida nelle varie Regioni. Sono ancora da definire data e luogo.
- E' in programma inoltre che il C.R.N. partecipi ai seguenti gruppi di lavoro:
  - Gruppo di lavoro con Ministero della Salute, Regioni e IIZZSS per il coordinamento del piano di intervento nazionale nei confronti della Paratubercolosi;
  - Board of Directors, International Association of Paratuberculosis (Rappresentante italiano: Dr. N.Arrigoni)
  - Comitato scientifico del 15th International Colloquium on Paratuberculosis (Dublin, 14-18 giugno 2020)(Dr. N.Arrigoni).

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

#### **1.Consulenze richieste ad esterni**

Nulla da segnalare.

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

- Il C.R.N. continuerà a rispondere alle richieste di consulenza, aggiornamento, sopralluoghi, valutazione di metodiche analitiche, provenienti da IIZZSS, Veterinari appartenenti alle AUSL e liberi professionisti, allevatori.
- E' in programma la realizzazione di stage formativi e tirocini curricolari ed extra-curricolari per ricercatori dei vari Istituti Zooprofilattici, neolaureati e studenti di Veterinaria, Scienze Biologiche e Biotecnologie, per l'approfondimento delle metodiche diagnostiche sulla Paratubercolosi.

#### **3. Attività di docenza**

Il personale del C.R.N. parteciperà in qualità di docente a giornate di aggiornamento per allevatori e veterinari in varie province italiane, organizzati da Facoltà Universitarie, ASL, Ordini professionali.

### **Consulenze e collaborazioni europee**

Nulla da segnalare

### **Consulenze e collaborazioni internazionali**

Nulla da segnalare

### **Pubblicazioni scientifiche e divulgative**

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

Sono in corso di stesura alcuni lavori da pubblicare su riviste internazionali relativi a:

Relazione annuale 2018-2019 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)

- Valutazione delle performances dei test sierologici e qPCR nella specie *Bubalus bubalis* (bufalo d'acqua) - Progetto di ricerca corrente IZS LE 2015/002;
- Risultati di un monitoraggio sierologico realizzato sull'allevamento bufalino in regione Campania (studio in collaborazione con il Centro di Referenza igiene allevamento bufalino, IZS Mezzogiorno, Salerno);
- Studio sulla diffusione in allevamento di *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* mediante WGS - Progetto di ricerca corrente IZS LE 2014/013;
- Descrizione di un focolaio di paratubercolosi in orici dalle corna a sciabola (*Oryx dammah*) mantenuti in un parco faunistico (Studio in collaborazione con UNIMI);
- Valutazione di un metodo per l'isolamento di ceppi di *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* di tipo I isolati da allevamenti ovini. (Studio in collaborazione con IZSLT).

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

- Cammi G\*, Ricchi M\*, Galiero A\*, Daminelli P, Cosciani-Cunico E, Dalzini E, Losio MN, Cerutti G\*, Garbarino C\*, Arrigoni N\* "Valutazione della sopravvivenza di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) durante il processo produttivo dei formaggi Parmigiano Reggiano e Grana Padano", XIX Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. Matera, 23 - 25 Ottobre 2019 (poster);
- Butot S, Ricchi M\*, Sevilla I.A, Michot L, Molina E, Tello M, Russo S\*, Arrigoni N\*, Garrido J, Tomas D. "Performance dei metodi analitici per la ricerca di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* nel latte", XIX Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. Matera, 23 - 25 Ottobre 2019 (poster);
- Arrigoni N\*, Pigoli C, Guadagnini D, Ricchi M\*, Bonacina E, Russo S\*, Gibelli LR, Garbarino C\* "Isolamento di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in un gruppo di orici dalle corna a sciabola (*Oryx dammah*) in un parco del Nord Italia". XLIII Convegno AIE, Catania, 23-25 ottobre 2019 (poster);
- De Carlo E, Ricchi M\*, Galletti G, Martucciello A, Pesce A, Russo S, Galiero A\*, Gamberale F, Russo M, Sannino E, Garbarino CA\*, Cammi G\*, Arrigoni N\*. "Paratubercolosi nel bufalo: risultati di uno studio di siero-prevalenza in regione Campania", 51° Congresso nazionale Società italiana Buiatria, Parma, 7-8 novembre 2019 (comunicazione orale).

#### **Sito Web**

Il sito web, messo a punto nel 2011, con funzioni interattive funzionali alla realizzazione e alla gestione di ring test per la diagnosi diretta, verrà aggiornato relativamente a metodi di prova, pubblicazione e progetti.

Il Responsabile del Centro di Referenza Nazionale per la Paratubercolosi

Dott. Norma Arrigoni