

RELAZIONE ANNUALE

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

(Periodo: dal 01.10.2020 al 30.09.2021)

Centro di Referenza Nazionale (C.R.N.) Paratubercolosi Relazione sulla attività svolta dal 01.10.2020 al 30.09.2021

Premessa

In data 19/04/2021 è stata comunicata al Ministero della Salute la nomina della dott.ssa Chiara Garbarino a Responsabile del Centro di Referenza Nazionale per la Paratubercolosi, in sostituzione della dott.ssa Norma Arrigoni.

Inoltre, in data 03/11/2021, l'OIE ha inviato la comunicazione di aver approvato la richiesta di designare l'IZSLER, Sede territoriale di Piacenza, come Laboratorio di Riferimento OIE per la paratubercolosi, con il Dott. Matteo Ricchi quale esperto designato.

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 IZZSS, a seguito di richieste specifiche.

MP	REV	Titolo	IZS richiedente	Data invio
MP 04/022	8	METODO DI PROVA INTERNO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI NEI CONFRONTI DI <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> SUBSP. <i>PARATUBERCULOSIS</i> DA SANGUE E LATTE TRAMITE ELISA INDIRETTA – KIT ID VET	IZS Sicilia	21/10/2020
MP 09/078	6	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	IZS Sicilia	21/10/2020
MP 09/088	0	METODO DI PROVA INTERNO PER LA TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> SUBSP. <i>PARATUBERCULOSIS</i> MEDIANTE PCR	IZS Sicilia	21/10/2020
MP 13/011	0	METODO DI PROVA INTERNO PER LA DETERMINAZIONE DI INTERFERON-GAMMA NEL SANGUE PER LA DIAGNOSI DI PARATUBERCOLOSI BOVINA MEDIANTE ELISA	IZS Sicilia	21/10/2020
MP 09/078	6	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	IZS Venezia	25/02/2021
PSV 09/078	3	PROTOCOLLO DI STUDIO E VALIDAZIONE 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 REV. 5	IZS Venezia	25/02/2021
RV 09/078	3	REPORT DI VALIDAZIONE 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 REV. 5	IZS Venezia	25/02/2021
MP	6	METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DI	IZS Sicilia	02/03/2021

09/078		MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS TRAMITE REAL TIME PCR IN FECI, LATTE E TESSUTI		
PSV 09/078	3	PROTOCOLLO DI STUDIO E VALIDAZIONE METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DI <i>Mycobacterium avium</i> subsp. paratuberculosis TRAMITE REAL TIME PCR IN FECI, LATTE E TESSUTI REV. 5	IZS Sicilia	02/03/2021
RV 09/078	3	REPORT DI VALIDAZIONE METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DI <i>Mycobacterium avium</i> subsp. paratuberculosis TRAMITE REAL TIME PCR IN FECI, LATTE E TESSUTI REV. 5	IZS Sicilia	02/03/2021
MP 04/022	8	METODO DI PROVA INTERNO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI NEI CONFRONTI DI MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS DA SANGUE E LATTE TRAMITE ELISA INDIRECTA – KIT ID VET	IZS Lazio e Toscana	11/06/2021
PSV 04/022	2	PROTOCOLLO DI STUDIO E VALIDAZIONE METODO DI PROVA INTERNO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI NEI CONFRONTI DI <i>Mycobacterium avium</i> subsp. paratuberculosis DA SANGUE E LATTE TRAMITE ELISA INDIRECTA – KIT IDVET – REV. 8	IZS Lazio e Toscana	11/06/2021
RV 04/022	2	REPORT DI VALIDAZIONE METODO DI PROVA INTERNO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI NEI CONFRONTI DI <i>Mycobacterium avium</i> subsp. paratuberculosis DA SANGUE E LATTE TRAMITE ELISA INDIRECTA – KIT IDVET - REV. 8	IZS Lazio e Toscana	11/06/2021

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

2) Produzione e distribuzione di reagenti

All'interno della Biobanca centralizzata IZSLER sono stoccati:

- campioni di siero positivi e negativi (ELISA) 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 IZZSS, 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 per conferma diagnostica:

- sierologica da 2 conferimenti, per un totale di 2 campioni, rispettivamente di siero di bufalo e di siero bovino da IZSUM
- diagnosi diretta (PCR) da 2 campioni di latte da IZSVE.

Escludendo le finalità “controlli interni” e “Progetti di ricerca”, nel periodo considerato sono stati eseguiti complessivamente 42.354 esami, di cui:

	Non ufficiali	Ufficiali	Totale
Coltura	21	32	53
Sierologia	27.932	13.660	41.592
PCR	189	520	709
Totale	28.142	14.212	42.354

L'intera attività analitica, nel periodo di riferimento, è in aumento (+7% rispetto all'anno precedente), con particolare riferimento all'attività di diagnosi sierologica sia su campioni ufficiali che su campioni conferiti da privati.

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 inter-laboratorio per la diagnosi diretta di paratubercolosi mediante PCR e coltura su feci bovine.

Al circuito hanno aderito 21 laboratori appartenenti ai 10 II.ZZ.SS presenti sul territorio nazionale.

I campioni sono stati spediti il giorno 08.03.2021, con scadenza prevista per la restituzione dei risultati 08.08.2021.

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 10 giorni dalla scadenza del ring test, al fine di provvedere prontamente alla correzione di eventuali non conformità;
- report completo entro 30 giorni dalla scadenza.

In generale i risultati del ring test sono risultati soddisfacenti.

L'accuratezza è infatti risultata:

- molto soddisfacente per il test PCR (0,990), con ottimi risultati anche per i valori di accordanza e concordanza (0,979 e 0,980).

- molto soddisfacente per il test colturale (0,963), con ottimi risultati anche per i valori di accordanza e concordanza (0,980 per entrambi).

I risultati della prova interlaboratorio sono in linea con quelli ottenuti nelle cinque precedenti prove.

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

Il C.R.N. ha partecipato a:

- 1 prova inter-laboratorio (aprile 2021), organizzata a livello europeo, per esame sierologico su siero di sangue (8 campioni) e latte individuale bovino (8 campioni) mediante ELISA (Ente organizzatore: GD Animal Health – Deventer, NE). I risultati sono stati corretti nel 100% dei casi.
- 1 prova inter-laboratorio (agosto 2021), organizzata a livello europeo, per coltura e PCR su feci (Ente organizzatore: QA Veterinary Laboratory Agency - UK). I risultati non sono ancora disponibili.

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, nel periodo di interesse, tra il numero di aziende con qualifica “Allevamento con casi clinici (PTC)” (n=27) ed il numero di focolai di malattia registrati in SIMAN (n=1).

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.

Regione	Riferimento
Abruzzo	Determinazione n. DG 21/206 del 21.11.2013
Basilicata	Deliberazione della Giunta Regionale 17 novembre 2015, n. 1476
Calabria	Decreto del Commissario ad Acta n.47 del 21/05/2015
Campania	Deliberazione della Giunta Regionale n. 657 del 30/12/2013
Emilia-Romagna	Deliberazione della Giunta Regionale N. 2100 del 30/12/2013
Friuli Venezia Giulia	Deliberazione della Giunta regionale N. 916 del 15/05/2015
Lazio	Decreto del Commissario ad acta n. 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 e Veneto).
- Tutte le altre Regioni hanno recepito integralmente le linee guida.

A 5 anni dalla loro emanazione, 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 (prot. 30699/2018). Il Ministero ha inviato il documento alle Regioni sollecitando eventuali osservazioni, richieste di modifica e integrazione. Il C.R.N. ha puntualmente risposto alle osservazioni delle Regioni Emilia Romagna, Lombardia, Veneto, Piemonte, pervenute il 13.11.2019, accogliendole in gran parte attraverso opportune revisioni delle Linee guida. Il documento recante le Linee guida revisionate è stato inviato al Ministero in data 24.3.2020. Il Ministero ha risposto in data 08.10.2020 con ulteriori richieste di modifica/integrazione da parte delle Regioni Umbria e Campania, che sono state prese in

considerazione dal C.R.N. per la versione finale del documento, inviato al Ministero della Salute (Prot.21898 del 26.10.2020) per la presentazione in Conferenza Stato Regioni.

A seguito della introduzione della paratubercolosi nell'elenco delle malattie categorizzate come malattie di categoria e) ai sensi del Regolamento (UE) 2016/429 e relativo Regolamento di esecuzione 2018/1882, la proposta di modifica al Ministero è stata integrata con l'estensione delle Linee guida a tutte le specie di interesse previste, estendendole quindi alle specie bufalina, ovina e caprina. Questa ultima modifica è stata inviata al Ministero per la presentazione in Conferenza Stato Regioni in data 13.10.2021.

Oltre all'estensione del campo di applicazione a tutte le specie previste, le modifiche sono di seguito riportate.

- Art.1. 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 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, con frequenza minima definita dalle Regioni, tenendo conto delle attività pianificate negli allevamenti (ad es. sfruttando i controlli di stalla per la Tuberculosis per i quali è necessario catturare singolarmente tutti gli animali dell'allevamento).
- 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, ad eccezione degli allevamenti con qualifica PT1 per i quali è necessario applicare il protocollo S2 per una gestione più efficace degli animali infetti.
 - 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 possibilità di conferma mediante PCR è prevista solo in caso di applicazione del protocollo S2, sia per acquisizione che per mantenimento qualifica.

- è stata 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 alla situazione delle qualifiche previste dalle Linee Guida, si riportano di seguito i dati relativi alle qualifiche degli **allevamenti bovini** presenti in BDN al 30.09.2021 per le singole Regioni (numero di allevamenti e relativa qualifica).

Complessivamente i dati sono stabili rispetto all'anno precedente (2019-2020) dove la percentuale di allevamenti con qualifica era risultata essere il 33,6%, mentre nell'anno in corso è risultata il 34,7%.

Etichette di riga	PTC	PT0	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5	Senza QUALIFICA	Totale complessivo	% con qualifica
ABRUZZO								4.305	4.305	0,0
BASILICATA		28		4				2.704	2.736	1,2
CALABRIA		3	6	13	1			8.651	8.674	0,3
CAMPANIA		395						10.087	10.482	3,8
EMILIA ROMAGNA	10	5.298	36	56	9	9	8	945	6.371	85,2
FRIULI VENEZIA GIULIA				2				2.201	2.203	0,1
LAZIO		1	12	21	1	1		12.045	12.081	0,3
LIGURIA		576	5	14				468	1.063	56,0
LOMBARDIA		4.225	907	633	139	127	131	9.070	15.232	40,5
MARCHE	5	596	14	18	12	5		2.583	3.233	20,1
MOLISE								2.277	2.277	0,0
PIEMONTE	4	8.711	258	369	199	171	153	2.023	11.888	83,0
PUGLIA		170		1				3.938	4.109	4,2
SARDEGNA		8.114	45					1.222	9.381	87,0
SICILIA	8	3.137		298				7.217	10.660	32,3
TOSCANA		4	2	5				3.692	3.703	0,3
TRENTINO - ALTO ADIGE (BZ)		8.013						17	8.030	99,8
TRENTINO - ALTO ADIGE (TN)		162	104	848	154	51	46	231	1.596	85,5
UMBRIA				2				3.226	3.228	0,1
VALLE D'AOSTA		1		1.580				387	1.968	80,3
VENETO		949		444				11.916	13.309	10,5
Totale complessivo	27	40383	1389	4308	515	364	338	89205	136529	34,7

Di seguito si riportano i dati relativi alle qualifiche degli **allevamenti bufalini** presenti in BDN al 30.09.2020 per le singole Regioni (numero di allevamenti e relativa qualifica). Complessivamente i dati sono stabili rispetto all'anno precedente (2019-2020) dove la percentuale di allevamenti con qualifica era risultata essere il 7,1%, mentre nell'anno in corso è risultata il 6,9%.

Etichette di riga	PTC	PT0	PT1	PT3	Senza QUALIFICA	Totale complessivo	% con qualifica
ABRUZZO					21	21	0,0
BASILICATA		2			25	27	7,4
CALABRIA				1	21	22	4,5
CAMPANIA		87			1.201	1.288	6,8
EMILIA ROMAGNA		14			11	25	56,0
FRIULI VENEZIA GIULIA					28	28	0,0
LAZIO			2		722	724	0,3
LIGURIA		1			2	3	33,3
LOMBARDIA		19	5		64	91	29,7
MARCHE		16			72	88	18,2
MOLISE					13	13	0,0
PIEMONTE		16		1	13	30	56,7
PUGLIA		2			67	69	2,9
SARDEGNA		2			1	3	66,7
SICILIA		4			11	15	26,7
TOSCANA					20	20	0,0
TRENTINO - ALTO ADIGE (BZ)		2				2	100,0
UMBRIA				1	33	34	2,9
VALLE D'AOSTA					1	1	0,0
VENETO		3			127	130	2,3
Totale complessivo		168	7	1	2453	2634	6,9

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 delle 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 formazione degli allevatori e la sensibilizzazione dell'industria di trasformazione ad opera di IZSLER, in collaborazione con le ASL e i veterinari liberi professionisti, hanno portato ad una buona adesione al piano.

Nel periodo 2014-2020 gli allevamenti aderenti al piano sono aumentati dal 56,0% al 77,8% sul totale degli allevamenti da latte. Nello stesso periodo si è registrato un incremento del numero di allevamenti testati (dal 7,2% al 29,6% del totale di allevamenti da latte) ed una riduzione sia degli allevamenti infetti (dal 74,2% al 51,0% degli allevamenti testati) che degli animali positivi (dal 4,2% all'1,4% degli animali testati).

La percentuale di allevamenti con Prevalenza apparente (PA) superiore al 5% sono diminuiti dal 28,8% (2014) al 5,0% (2020).

La percentuale di animali infetti è diminuita dal 4,2% (2014) all'1,4% (2020).

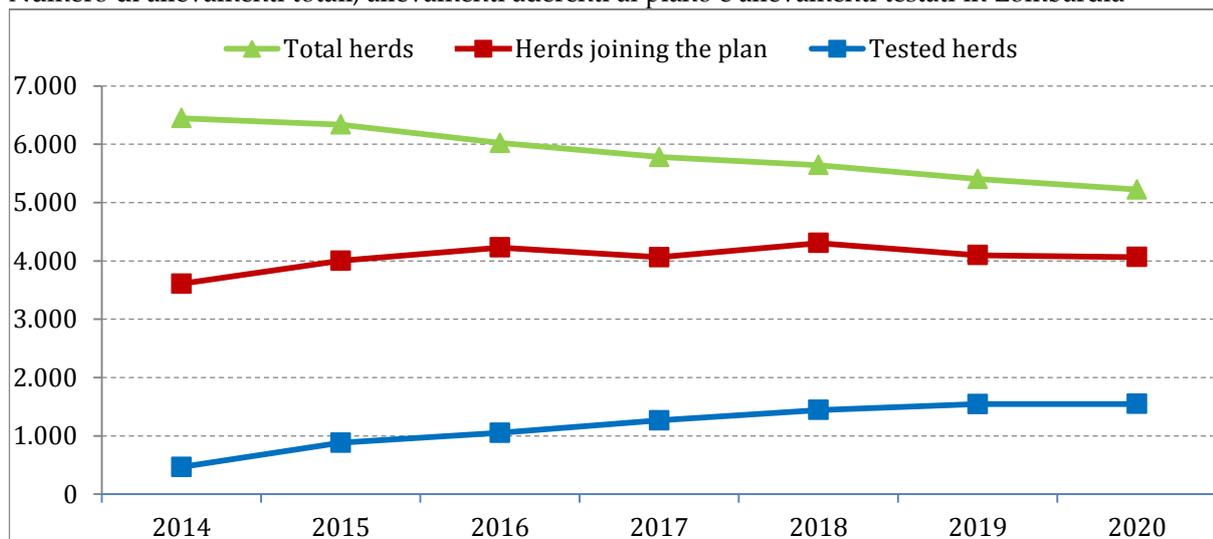
Prevalenza apparente (PA) di allevamenti infetti in Lombardia dal 2014 al 2020

Anno	Totale allevamenti	Allevamenti aderenti al piano	Allevamenti testati	PA Allevamenti infetti	% allevamenti con AP>5%
2014	6.445	3.608 (56,0%)	466 (7,2%)	346 (74,2%)	28,8
2015	6.336	4.001 (63,1%)	881 (13,9%)	629 (71,4%)	18,8
2016	6.022	4.230 (70,2%)	1.052 (17,5%)	815 (77,5%)	23,0
2017	5.781	4.061 (70,2%)	1.266 (21,9%)	652 (51,5%)	7,9
2018	5.640	4.307 (76,4%)	1.443 (25,6%)	753 (52,2%)	9,6
2019	5.402	4.098 (75,9%)	1.544 (28,6%)	809 (52,4%)	8,4
2020	5.223	4.064 (77,8%)	1.546 (29,6%)	788 (51,0%)	5,0

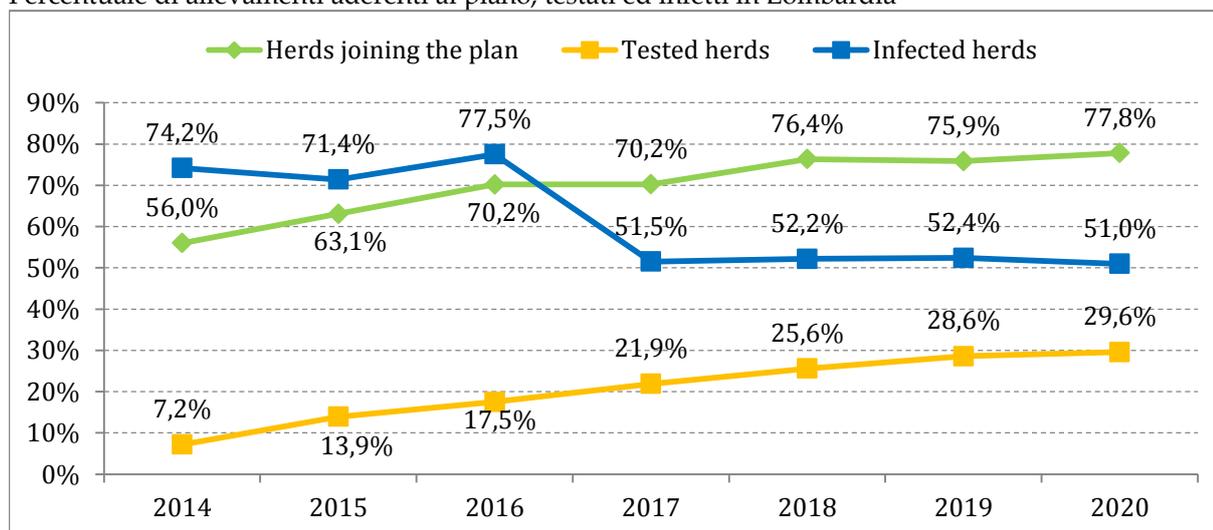
Prevalenza apparente (PA) di animali positivi in Lombardia dal 2014 al 2020

Anno	Animali testati (ELISA screening)	Animali positivi (ELISA conferma)	PA animali positivi
2014	52,963	2,230	4.2 %
2015	105,466	3,363	3.2 %
2016	124,750	4,170	3.3 %
2017	147,125	2,631	1.8 %
2018	163,684	3,093	1.9 %
2019	177,243	2,984	1.7 %
2020	172,696	2,431	1.4 %

Numero di allevamenti totali, allevamenti aderenti al piano e allevamenti testati in Lombardia

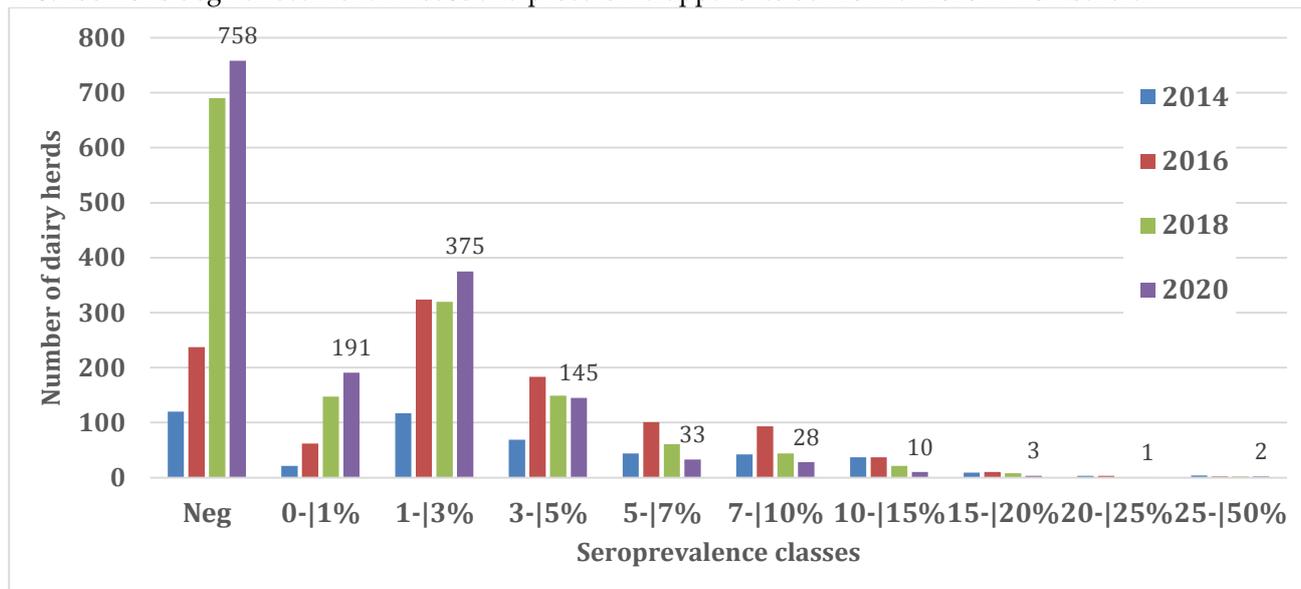


Percentuale di allevamenti aderenti al piano, testati ed infetti in Lombardia



Questo miglioramento è anche evidente considerando le variazioni osservate nella distribuzione di frequenza degli allevamenti in base alla loro prevalenza intra-aziendale dal 2014 al 2020. Nella figura e tabella seguenti, appare evidente l'aumento del numero di allevamenti "negativi" e "a bassa prevalenza" (0-1%; 1-3%) dal 2014 al 2020, in contrasto con la distribuzione degli allevamenti ad alta prevalenza di infezione, che mostrano una graduale diminuzione.

Distribuzione degli allevamenti in base alla prevalenza apparente dal 2014 al 2020 in Lombardia



Distribuzione degli allevamenti in base alla prevalenza apparente dal 2014 al 2020 in Lombardia

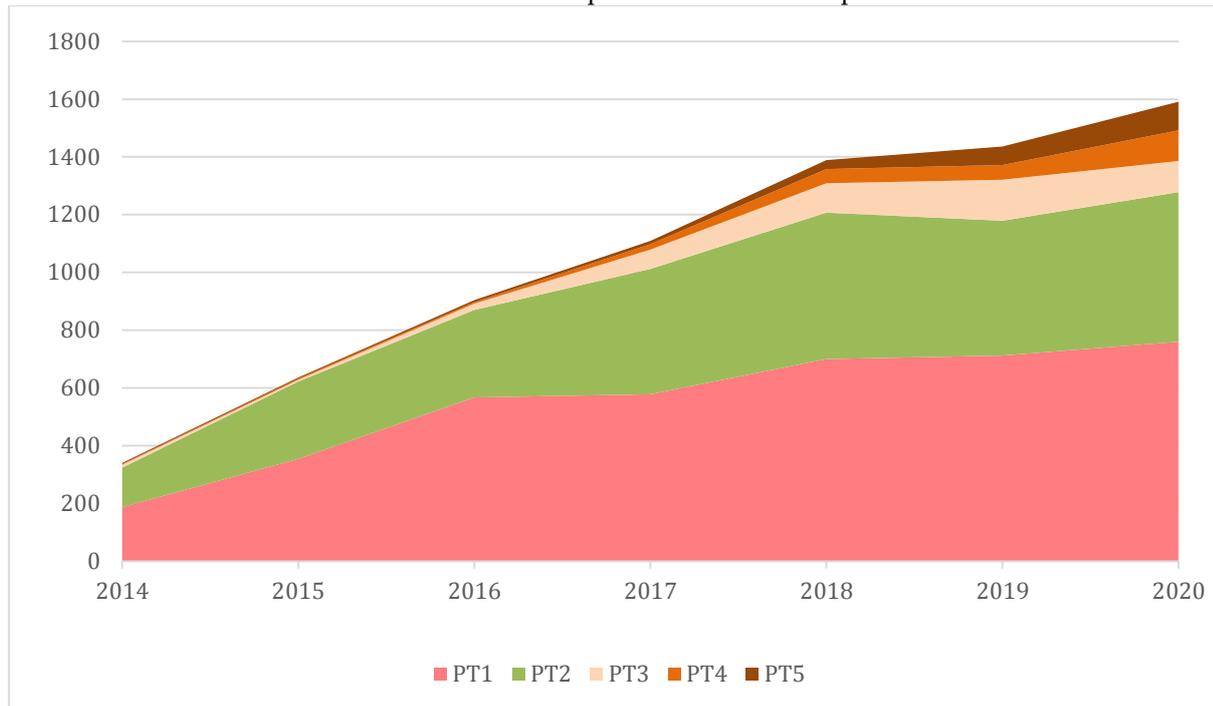
Anno	Neg	0-1%	1-3%	3-5%	5-7%	7-10%	10-15%	15-20%	20-25%	25-50%	Totale
2014	120	21	117	69	44	42	37	9	3	4	466
2016	237	62	324	183	101	93	37	10	3	2	1,052
2018	690	147	320	149	61	44	21	8	1	2	1,443
2020	758	191	375	145	33	28	10	3	1	2	1,546

In parallelo con una diminuzione di prevalenza, è stato registrato un aumento del numero di allevamenti che hanno ottenuto una qualifica sanitaria, in particolare PT1 (basso rischio) e PT2 (negativi ad uno o due controlli) (vedi figura e tabella seguenti).

Paratubercolosi in Lombardia: numero totale di allevamenti e relativa qualifica

Anno	Qualifica sanitaria					Total PT1-PT5
	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5	
2014	187	137	10	2	4	340
2015	354	268	6	4	4	636
2016	567	303	22	5	7	904
2017	578	434	67	19	11	1,109
2018	700	507	102	49	31	1,389
2019	712	467	142	51	64	1,436
2020	760	518	108	106	99	1,591

Numero di allevamenti che hanno ottenuto una qualifica sanitaria nel periodo 2014-2020



In Regione Lombardia nell'anno 2020 si conferma quindi un trend positivo del numero di aziende che richiede e acquisisce le qualifiche rispetto agli anni precedenti (2014-2020). 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.

Da registrare l'autorizzazione da parte del Ministero della Salute, previa relazione favorevole del Servizio Veterinario delle ATS Lombarde, all'utilizzo di un vaccino commerciale spento adiuvato in cinque allevamenti di capre con alta prevalenza di infezione.

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.

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

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

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 successivamente, in data 17/04/2014 ha trasmesso alle ASL le relative istruzioni operative.

Rispetto a quanto indicato dalle Linee Guida Nazionali sono state previste le seguenti azioni supplementari:

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

Per incentivare le adesioni, il prelievo viene eseguito dai Servizi Veterinari a titolo gratuito nelle aziende aderenti al piano regionale di controllo della Rinotracheite infettiva, e in possesso di qualifica (allevamento IBR indenne o negativo).

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.

Nelle aziende da carne è stata riscontrata una situazione meno favorevole, 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.

Da registrare l'autorizzazione da parte del Ministero della Salute, previa relazione favorevole del Servizio Veterinario della Provincia autonoma di Trento, all'utilizzo di un vaccino commerciale spento adiuvato in due allevamenti di capre con alta prevalenza di infezione.

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".

Nell'anno in corso è stata realizzata una brochure informativa/divulgativa dal titolo "*Paratubercolosi nella capra: conoscerla per combatterla*", destinato ad allevatori e veterinari. La brochure è stata presentata in occasione del webinar sulla paratubercolosi nell'allevamento caprino il 30.10.2020 e successivamente caricata sul sito del C.R.N.

4) Aggiornamenti epidemiologici sulle materie di competenza

Il nuovo Regolamento (UE) 2016/429 ("Animal Health Law"), e il relativo Regolamento di Esecuzione (UE) 2018/1882, definiscono che la Paratubercolosi sia annoverata tra le malattie di categoria E, per le quali è necessario da parte degli Stati Membri attivare un sistema di sorveglianza. A tale scopo è stata inviata al Ministero una proposta di adeguamento delle Linee Guida nazionali in data 13.10.2021.

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.

Regione	Anno	Prevalenza apparente aziende	Prevalenza apparente animali	Metodologia	Riferimento bibliografico
Veneto	2002	64,6%	3,5%	ELISA individuale siero	Pozzato et al, 2011
Lazio	2002	42,0%	2,5%		Lillini et al, 2005
Umbria e Marche	2008	52,8%	4,6%		Papa et al, 2011
Piemonte	2007-2008	9,5%	N.D.	ELISA latte massa	Gennero (comunicazione personale)
Emilia-Romagna	2011-2012	14,5%	N.D.		PRC2005/003
Lombardia	2003-2005	43,7%	2,6%		Pozzato et al 2001
	2014	74,2%	4,2%		Arrigoni et al, 2014
	2020	51,0%	1,4%		Arrigoni et al, 2021
Provincia Trento	2019	18,7%	2,0%		Dellamaria (comunicazione personale)

Relativamente al **patrimonio ovi-caprino**, si riportano di seguito i dati disponibili e la relativa fonte.

Regione	Anno	Prevalenza apparente aziende	Prevalenza apparente animali	Test	Riferimento bibliografico
Sicilia	2015	64,2% ovini 56,9% caprino	3,6%	ELISA individuale	Fiasconaro, 7° Congresso nazionale sulla Paratubercolosi
Piemonte	2017	40,0% caprini	3,0%		Gennero (comunicazione personale)
Puglia	2019	Capra 82,2% Pecora 44,8% Capra-Pecora 73,9% Pecora – capra 61,2%	Capra 15,7% Pecora 2,8% Capra-Pecora 9,9% Pecora – capra 3,7%		Iarussi (2019)
Provincia Trento	2019	Caprini 19,7%	Caprini 4,0%		Dellamaria (comunicazione personale)

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 sono stati oggetto di un Progetto di Ricerca corrente e pubblicati nell'anno in corso sul Journal of Dairy Science (vedi pubblicazioni):

Regione	Anno	Prevalenza apparente aziende	Prevalenza apparente animali	Metodologia	Riferimento bibliografico
Campania	2016-2018	54,7%	1,8%	ELISA individuale	Martucciello, 2021

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 sono i seguenti:

Allevamento con qualifica PTC assegnata nell'anno

Regione	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	TOTALE
Emilia-Romagna	1	1	1			2	1		6
Lombardia						1			1
Piemonte	7	7	2				3	1	20
Marche				2					2
Sardegna	2	2	2	2			1		9
Toscana	1								1
Trento	6	4	2						12
ITALIA	17	14	7	4	0	3	5	1	51

(Fonte: SIMAN: Dati aggiornati al 30/09/2021)

Da sottolineare la scarsa segnalazione di casi clinici rispetto alla diffusione della malattia sul territorio nazionale, e la mancanza di allineamento con il numero di allevamenti con qualifica PTC rilevabili da BDN, possibilmente dovuti a erroneo o mancato inserimento dei dati nei due database.

Gli allevamenti con qualifica PTC nel periodo considerato sono infatti 27, a fronte di 1 focolaio registrato in SIMAN. 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 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 ha avuto inizio il 31.10.2019 e terminerà il 31.05.2022 (Progetto prorogato).

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) è sospettato di essere coinvolto nell'eziopatogenesi del morbo di Crohn, del diabete di tipo I, della sarcoidosi, della sclerosi multipla e della tiroidite di Hashimoto. Pur non essendo stato provato definitivamente il suo ruolo zoonotico, questo non è mai stato escluso (EFSA Scientific opinion: Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) N. 2016/429): paratuberculosis).

Il consumo di latte e prodotti lattiero-caseari è considerato la principale via di esposizione umana a MAP e molti studi hanno rilevato la presenza sia di DNA che del batterio vitale nei formaggi venduti al dettaglio. Poiché MAP non è in grado di crescere in vitro al di fuori dell'ospite in assenza di siderofori specifici (mycobactin), la sua concentrazione nel prodotto trasformato può solo diminuire. Lo studio è rivolto a verificare l'efficacia delle fasi di produzione e conservazione del formaggio nella inattivazione di MAP. Si ritiene che il punto critico nel processo di produzione della mozzarella sia la fase di riscaldamento e filatura della cagliata in acqua ad alta temperatura (da 65 a 80 °C), come precedentemente osservato per altri patogeni (ad es. *E. coli*, *A. butzleri* e *L. monocytogenes*). Per questo motivo, in un primo momento, si sta valutando l'impatto di questa fase sulla sopravvivenza di MAP. In accordo con il programma, il primo anno è stato dedicato alla messa a punto delle colture per la contaminazione dei prodotti e delle metodiche per la ricerca di MAP dal prodotto durante le fasi di trasformazione. La sperimentazione, ripresa dopo il lockdown nazionale, ha permesso di determinare i valori di D-value e Z-value, utilizzando un ceppo di riferimento ATCC 19698. I risultati ottenuti saranno utilizzati per fornire informazioni ai portatori di interesse (trasformatori e Autorità Competente) relative alla sicurezza alimentare nel processo di produzione della mozzarella. Il progetto sta proseguendo con la valutazione dell'intero processo di produzione della mozzarella, valutando la sopravvivenza di MAP a due temperature estreme, una permissiva e una non permissiva.

Inoltre, è prevista una indagine sulla presenza di MAP su prodotti in commercio.

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 ha avuto inizio il 20.12.2019 e terminerà il 19.05.2022 (Progetto prorogato). Gli animali selvatici e quelli domestici, nelle fasi cliniche e subcliniche dell'infezione, diffondono MAP nell'ambiente principalmente attraverso le feci; essendo MAP caratterizzato da elevata resistenza ambientale, la trasmissione al pascolo attraverso ingestione di alimenti contaminati da feci infette costituisce il fattore di rischio centrale per la diffusione della malattia. Di conseguenza, il pascolo, quando condiviso da diverse popolazioni, può costituire un anello debole nell'ambito dei piani di contenimento della malattia. I risultati di una precedente ricerca nell'area lombarda del Parco Nazionale dello Stelvio (SO) avevano rilevato una prevalenza del 20% di MAP nella popolazione di cervo a vita libera (2011-2015). I ceppi di MAP isolati erano tutti di Tipo II, con un profilo allelico tra i più diffusi anche nel bovino. Ogni anno vengono monticati animali domestici nel Parco, ma la loro situazione sanitaria nei confronti della paratubercolosi non è sempre nota, non essendo obbligatoria l'adozione di programmi di controllo della malattia.

Lo studio vuole definire il contributo dei ruminanti domestici e selvatici, bovini e cervi in particolare, nella contaminazione da MAP del pascolo, attraverso l'analisi di feci

prelevate dal suolo. Il campionamento ambientale ha il vantaggio di non richiedere la cattura e il contenimento degli animali e di essere applicabile anche in periodi in cui questi non sono presenti sul pascolo. I dati raccolti forniranno indicazioni utili per la gestione dei ruminanti selvatici nel Parco, cervi in particolare. Nel corso delle stagioni 2020 e 2021 sono state raccolte direttamente dal pascolo feci di cervo (2020 N= 470 ; 2021 N= 1338) e bovino (2020 N= 287; 2021 N= 662) con differenti disegni di campionamento (distance sampling, randomizzato ecc). I campioni sono stati analizzati mediante Real-time PCR per la presenza di MAP. I campioni positivi sono stati analizzati mediante *digital*PCR per quantificare la presenza di MAP e sottoposti a coltura. I ceppi di MAP isolati vengono sottoposti a tipizzazione mediante analisi di loci mini- e micro-satelliti. E' in corso l'analisi dei dati.

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 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 ed è terminato il 31.03.2021 (progetto prorogato). I dati provenienti dal progetto sono stati utilizzati per una pubblicazione scientifica (vedi sezione dedicata).
- 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 ed è terminato il 30.04.2021 (progetto prorogato). I dati provenienti dal progetto sono stati utilizzati per una pubblicazione scientifica (vedi sezione dedicata).
- Progetto di ricerca corrente IZS PLV 2018/106 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 20.05.2022 (progetto prorogato).
- Progetto di ricerca corrente IZS PLV 2018/104 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. Gorla). Il progetto è iniziato il 20.12.2018 e terminerà il 20.05.2022 (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 29.11.2021 (progetto prorogato).

Ricerca Finalizzata

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

Nulla da segnalare.

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

- Il CRN ha partecipato al Progetto di Ricerca di Rilevante Interesse Nazionale (PRIN 2020) intitolato "*An integrated genetic, genomic and system biology approach to contrast paratuberculosis in cattle – ParaTB-omics*". Il Progetto è coordinato dall'Università Cattolica di Piacenza ed ha coinvolto altre quattro Università (Perugia, Tuscia, Padova e Bari), cinque Istituti Zooprofilattici (Venezie; Lombardia ed Emilia Romagna; Lazio e Toscana; Umbria e Marche; Puglia e Basilicata) e due associazioni di allevatori (Italian Holstein - ANAFIJ - e Italian Simmental - ANAPRI).

L'obiettivo principale del progetto era migliorare gli strumenti per il controllo e la prevenzione della Paratubercolosi, utilizzando tecnologie *omics* all'avanguardia (genomica, trascrittomica, proteomica, metabolomica) e nuovi approcci di analisi dei dati (intelligenza artificiale e apprendimento automatico).

Il progetto comprendeva sette Work-packages (WP) interconnessi con i seguenti obiettivi:

1. WP1: dedicato alla gestione;
2. WP2: definire le procedure operative standard (SOP), raccogliere e organizzare i dati disponibili, identificare le aziende target;
3. WP3: condurre uno studio di associazione genome-wide e stimare i valori per il rischio Paratubercolosi in allevamento;
4. WP4: condurre uno studio longitudinale per studiare biomarcatori predittivi e profili del microbioma durante la progressione della malattia;
5. WP5: studiare le interazioni in vitro tra i macrofagi dell'ospite e ceppi patogeni di MAP;
6. WP6: integrare i dati per sviluppare un modello di rischio e migliorare le previsioni di resistenza genetica;
7. WP7: diffondere le informazioni sul progetto e trasferire le conoscenze.

I risultati attesi includevano:

- la messa a punto di nuovi strumenti di allevamento per aumentare la resistenza alla Paratubercolosi;
- l'identificazione di biomarcatori diagnostici precoci;
- la valutazione del ruolo del microbioma nell'infezione da MAP e nell'andamento della Paratubercolosi;
- l'acquisizione di nuove conoscenze di base sulle interazioni MAP - macrofagi e la creazione di un nuovo modello di rischio della Paratubercolosi.

Il CRN (Matteo Ricchi) è stato coinvolto come subcontractor dal responsabile del progetto, Prof. Paolo Ajmone Marsan dell'università Cattolica di Piacenza, sin dalle prime fasi del progetto, ed ha partecipato alle fasi di pianificazione del progetto,

contribuendo alla definizione degli strumenti analitici, degli approcci necessari e dei Work-packages.

Con comunicazione del 11 novembre 2021, il Prof. Paolo Ajmone Marsan ha informato che il progetto non è stato finanziato.

- 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 di questa collaborazione è stata realizzata una tesi di Dottorato dal titolo "Mycobacterial diseases in veterinary medicine: morphopathology and Mycobacterial phenotypes (dott. Claudio Pigoli, Data discussione: 17/05/2021; Relatore: Prof.ssa Valeria Grieco).
- 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 allo studio delle 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 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.
- Collaborazione del C.R.N. (C. Garbarino, tutor e correlatore della tesi) con l'Università degli Studi di Parma, Facoltà di medicina veterinaria, per una tesi di specializzazione in "Sanita' animale, allevamento e produzioni zootecniche" dal titolo: "Paratubercolosi e benessere nell'allevamento caprino da latte: indagine in 5 allevamenti nelle province di Parma e Piacenza" (Carlo Rossi, Discussione Luglio 2021, Relatrice dr.ssa Silvia Clotilde Cabassi).

Aggiornamento e formazione professionale

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

- E' stato organizzato un corso ECM, nella giornata del 30.10.2020, in modalità Webinar, dal titolo "Paratubercolosi nell'allevamento caprino e aspetti di benessere e biosicurezza", di cui si riporta di seguito il programma:
 - 8.30: Registrazione partecipanti

- 8.45 - 9.30: La paratubercolosi nell'allevamento caprino: clinica ed epidemiologia (N. Arrigoni – CRN Paratubercolosi)
 - 9.30 - 10.30: La paratubercolosi nell'allevamento caprino: diagnosi e profilassi (C. Garbarino - CRN Paratubercolosi)
 - 10.30 - 11.30: Benessere e biosicurezza nell'allevamento caprino (A. Gaffuri, IZSLER Bergamo)
 - 11.30 - 12.30: Piano di monitoraggio ed esperienze di vaccinazione nella provincia autonoma di Trento (D. Dellamaria, IZSVE - V. Dorigoni, Serv. Politiche San. PA TN)
 - 12.30-13.30 TAVOLA ROTONDA. La paratubercolosi nell'allevamento ovicaprino: interventi degli stakeholders (coordinatore M. Tamba - Sorveglianza Epidemiologica - IZSLER)
- **Convegni/congressi che il C.R.N. ha organizzato o a cui ha partecipato**
 - Il C.R.N. (N. Arrigoni) ha partecipato al Paratuberculosis Virtual Forum 2021 Paratb Forum, organizzato dalla International Dairy Federation in modalità webinar, il 26.5.2021, presentando la situazione italiana con particolare riferimento a quella di regione Lombardia (Arrigoni N, Cerioli M, Nassuato C, Farioli M, Boldini M, Gradassi M, Ventura G, Giovannini S, Paterlini F, Rosignoli C, Vezzoli F, Garbarino C, Bellini S, Ruocco L, Procopio A, Tamba M: “Bovine paratuberculosis in Italy: review of the national guidelines after seven years of their application”).
 - Per l'anno oggetto di rendicontazione era prevista la partecipazione al 15th International Colloquium on Paratuberculosis, che avrebbe dovuto avere luogo a Dublino, dal 14 al 18 giugno 2021. A causa della situazione sanitaria mondiale dovuta alla pandemia da COVID-19, il congresso è stato rimandato a giugno 2022.
 - **Comitati scientifici e gruppi di lavoro a cui ha partecipato il personale del C.R.N.**
 - Il C.R.N. (N. Arrigoni) è stata inclusa nel comitato tecnico scientifico del 15th International Colloquium on Paratuberculosis come valutatore dei lavori scientifici presentati.

Consulenze, attività di docenza, collaborazioni nazionali

1) Consulenze richieste ad esterni

Nulla da segnalare.

2) Consulenze e pareri tecnici forniti ad esterni

Nel periodo considerato sono stati richiesti al C.N.R i seguenti pareri:

- Parere (Prot. IZSLER 12926 del 24.5.2021) conseguente alla richiesta del Ministero della Salute, pervenuta via mail dal dott. Lomolino il 12.5.2021, relativa a misure che la Svezia intende inserire in una normativa nazionale dal titolo “*Regolamento della Commissione svedese dell'agricoltura sulle misure per prevenire la diffusione della*

paratuberculosis nei bovini presenti negli allevamenti in Svezia". Il contenuto del parere viene di seguito riportato:

La Svezia riporta all'interno del documento "Impact assessment of paratuberculosis (notification of technical rules 2021") prodotto dallo Swedish Board of Agriculture in data 11.3.2021, lo stato epidemiologico particolarmente favorevole riguardo la paratuberculosis (stima della prevalenza di allevamenti infetti <5% con una confidenza >95%), sottolineando come l'ultima segnalazione di paratuberculosis risalga al 2005 su un toro da carne importato. Sul territorio svedese sono previste una serie di misure volte alla sorveglianza ed al controllo della malattia; oltre alla notifica obbligatoria per tutte le specie sensibili alla malattia, sono previsti approfondimenti diagnostici e applicazione di misure di eradicazione in caso di positività (compreso l'abbattimento dell'intera mandria o, in caso di bassa incidenza, abbattimento dei soli capi positivi ai test). Al fine di proteggere lo stato sanitario raggiunto, il documento propone misure da applicare in caso di introduzione di animali vivi (bovini, bisonti e bufali) negli allevamenti presenti sul territorio svedese; tali misure sono da applicare sia che gli animali introdotti provengano da allevamenti svedesi che da paesi esteri (ed in tal senso definite dal documento in esame come "non discriminatorie"). La richiesta del Regolamento della Commissione svedese è che gli animali introdotti provengano da allevamenti con "buona situazione sanitaria" relativa alla paratuberculosis, documentata da:

- tre campioni annuali su tutti i capi di età superiore a 24 mesi con esito negativo;

- nessun caso clinico confermato da almeno 5 anni.

Nel caso in cui il requisito non possa essere soddisfatto, in alternativa si procede come segue:

- all'arrivo nell'allevamento di destinazione, l'animale introdotto viene sottoposto ad idoneo isolamento e successivamente, da parte di un veterinario designato, a prelievo fecale per test PCR (o coltura) e di sangue per test ELISA, da eseguire presso un laboratorio accreditato. In caso di negatività, i prelievi vanno ripetuti annualmente (da 2 a 4 prelievi annuali in funzione dell'età all'introduzione, rispettivamente superiore a 24 mesi ed inferiore a 12 mesi).

Pur comprendendo le motivazioni tecnico-scientifiche alla base delle misure svedesi, basate sullo stato sanitario favorevole raggiunto, si ritiene che tali richieste non siano supportate dal punto di vista legislativo, essendo la paratuberculosis classificata dal Regolamento (UE) 2016/429 e dal relativo Regolamento di esecuzione (UE) 2018/1882 come malattia di categoria E, per la quale è prevista, oltre alla notifica obbligatoria, unicamente una attività di sorveglianza all'interno dell'Unione Europea, mentre non sono previste misure armonizzate per prevenire la diffusione attraverso la movimentazione di animali e loro prodotti.

Infatti, ai sensi degli art. 170 e 269 del Regolamento 429/2016 "Gli Stati membri restano liberi di adottare misure nazionali, supplementari e più rigorose del presente regolamento, per il controllo delle malattie elencate di cui all'articolo 9, paragrafo 1, lettera d) e all'articolo 9, paragrafo 1, lettera e), relativamente ai movimenti all'interno dei rispettivi territori di animali terrestri e di materiale germinale di tali animali", ma è specificato nei medesimi articoli che tali misure "non possono ostacolare i movimenti di animali e prodotti tra Stati membri".

Si ritiene utile sottolineare inoltre come, dal punto di vista dell'impatto delle misure per l'Italia, non risulti dal sistema Traces alcuna importazione in Svezia di capi bovini e bufalini provenienti dal nostro Paese nel periodo 2015-2020.

Infine, si sottolinea come, nonostante in Italia sia in essere un sistema nazionale di classificazione degli allevamenti per la paratuberculosis ("Linee guida per l'adozione di piani di controllo e per l'adozione della qualifica sanitaria nei confronti della paratuberculosis", approvate dalla Conferenza Stato Regioni il 17.10.2013), con qualifiche sanitarie assegnate dall'Autorità Competente e registrate in BDN, i requisiti previsti dalla normativa svedese non possano essere soddisfatti ai sensi della normativa italiana, in quanto il Regolamento svedese prevede il campionamento di tutti i capi di età superiore a 24 mesi, mentre l'età minima di campionamento secondo le Linee guida italiane è 36 mesi.

Inoltre, dato che le Linee guida italiane prevedono il controllo su tutti i capi solo per i livelli PT3-4-5, il raggiungimento dei requisiti previsti dalla normativa Svedese (3 anni di negatività su tutti i capi)

sarebbe possibile solo per la categoria PT5. La proposta di modifica delle Linee guida italiane, inviata da parte di questo Centro di riferimento al Ministero della Salute in data 26.10.2020 (nostro prot. 2020/21898), va in questo senso, sostituendo il prelievo campionario con quello a tappeto anche per le qualifiche inferiori a PT3.

- Parere (Prot.IZSLER 1906 del 29.1.2021) conseguente alla richiesta del Ministero della Salute del 3.12.2020 (P-I.1.a.e/2020/23), relativa alla autorizzazione all'immissione in commercio di vaccino per paratubercolosi "OVAX GUDAIR" prodotto dalla ditta CZ, per la profilassi dell'enterite paratubercolare nelle specie ovina e caprina, elaborato congiuntamente dal Centro di Riferenza Nazionale paratubercolosi e dal Centro di riferimento nazionale tubercolosi. Le conclusioni del parere vengono di seguito riportate:

I Centri di Riferenza Nazionali per la tubercolosi e per la paratubercolosi suggeriscono che, al momento, l'utilizzo del vaccino possa essere autorizzato, purché regolamentato secondo le seguenti limitazioni:

- *in territori/regioni ufficialmente indenni da tubercolosi;*
- *in aziende non soggette a controlli per la tubercolosi (presenza di bovini e/o bufalini);*
- *previa autorizzazione da parte dei Servizi Veterinari territorialmente competenti e sotto controllo da parte degli stessi Servizi Veterinari;*
- *con registrazione in BDN dei soggetti vaccinati;*
- *in aziende riconosciute ad alta prevalenza di paratubercolosi.*

- Proposta di modifica alle "Linee guida per l'adozione dei piani di controllo e certificazione nei confronti della paratubercolosi bovina", inviato al Ministero della Salute ((Prot.IZSLER 21898 del 26.10.2020)(vedi capitolo dedicato).
- Proposta di modifica alle "Linee guida per l'adozione dei piani di controllo e certificazione nei confronti della paratubercolosi: aggiornamento", per adeguamento al Regolamento (UE) 2016/429 e al relativo Regolamento di esecuzione 2018/1882", inviato al Ministero della Salute per la presentazione in Conferenza Stato Regioni in data 13.10.2021. La precedente proposta di modifica al Ministero è stata integrata con l'estensione delle Linee guida a tutte le specie di interesse previste dal Regolamento (bufalini, ovini e caprini).
- Parere relativo alla sopravvivenza di MAP nell'effluente del biogas, richiesta da un consorzio di produttori. Le conclusioni vengono di seguito riportate:
Alla luce dei dati pubblicati in letteratura, la permanenza del digestato a temperatura di almeno 55°C per un periodo di 40 giorni è probabilmente sufficiente ad inattivare le forme vegetative di MAP, ma non è possibile escludere che le sue forme simil-sporigene possano sopravvivere a queste condizioni. L'aggiunta di uno step di trattamento termico a 75 °C del digestato offre ulteriori garanzie circa l'inattivazione completa di MAP, anche se comporta un costo non trascurabile.
Riteniamo tuttavia utile sottolineare come, in considerazione del fatto che:
 - *la sopravvivenza di MAP alle condizioni di inattivazione dipende in misura significativa dalla sua concentrazione nelle feci che vengono usate per alimentare il digestore,*

- *le feci di vacche con sintomi clinici o pre-clinici (super-shedder) di paratubercolosi possono infatti contenere quantità rilevanti di MAP (fino a 10¹² batteri al giorno).*

l'opzione più efficace sia quella di agire sullo stato sanitario degli allevamenti che alimenteranno il digestore.

Al fine di ridurre il rischio il più possibile, è opportuno che le aziende i cui reflui alimentano il digestore siano controllate per la paratubercolosi, con stato sanitario possibilmente negativo (PT2), ma almeno di bassa prevalenza (<5%), senza casi clinici.

Infine raccomandiamo come ulteriore misura precauzionale quella di non spandere il digestato sul foraggio nella stessa stagione di raccolta, lasciando passare almeno 3 mesi tra lo spandimento e lo sfalcio. L'opzione migliore sotto il profilo sanitario rimane lo spandimento prima dell'aratura. L'eventuale utilizzo del digestato come lettiera potrebbe rappresentare un ulteriore rischio di introduzione dell'infezione negli allevamenti negativi.

Attività di docenza

- Il C.R.N. (N. Arrigoni) ha svolto attività di docenza il giorno 10 maggio 2021 in modalità webinar, al Corso di Laurea in Medicina Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, con una relazione dal titolo: "Paratubercolosi: aggiornamento".
- Il C.R.N. (C. Garbarino) ha svolto attività di docenza il giorno 3 dicembre 2021 in modalità webinar, al Corso di Laurea Magistrale in Scienze delle Tecnologie delle Produzioni Animali, Corso di gestione dei Piani di Profilassi, 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".

Consulenze e collaborazioni europee

- E' attivo 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. Nell'ambito della collaborazione il C.R.N. (M.Ricchi) ha collaborato alla stesura di un paper (vedi pubblicazioni, Beinhauerova et al).
- Il C.R.N. ha collaborato con l'IZS Venezia, che rappresenta l'Italia nell'ambito di un progetto europeo COST per le malattie del bovino non coperte da piani di intervento obbligatori, per rispondere al questionario relativo alla paratubercolosi previsto dal Progetto (diffusione dell'infezione sul territorio nazionale, sistemi di raccolta dati presenti sul territorio, struttura del Piano di controllo nazionale). Nell'ambito della stessa collaborazione il C.R.N. ha coordinato la stesura di un paper relativo alla situazione italiana delle malattie non coperte da Piani, tra cui la paratubercolosi (vedi pubblicazioni, Tamba et al.)

Consulenze e collaborazioni internazionali

- N. Arrigoni 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).

Pubblicazioni scientifiche e divulgative

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

Su riviste con Impact factor:

1. Tamba M, Pallante I, Petrini S, Feliziani F, Iscaro C, Arrigoni N*, Di Sabatino D, Barberio A, Cibir V, Santi A, Ianniello M, Ruocco L, Pozzato N. Overview of control programs for EU non-regulated cattle diseases in Italy. *Front Vet Sci.* 2021; 8: 665607. Published online 2021 Apr 26. doi: 10.3389/fvets.2021.665607. PMID: PMC8107282 (**IF 3,412**).
2. Beinhauerova M, Beinhauerova M, McCallum S, Sellal E, Ricchi M*, O'Brien R, Blanchard B, Slana I, Babak V, Kralik P: Development of a reference standard for the detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by quantitative PCR. *Sci Rep.* 2021; 11: 11622. Published online 2021 Jun 2. doi: 10.1038/s41598-021-90789-0. PMID: PMC8172567 (**IF 4,380**).
3. Martucciello A, Galletti G, Pesce A, Russo M*, Sannino E, Arrigoni N*, Ricchi M*, Tamba M, Brunetti R, Ottaiano M, Iovane G, De Carlo E. Short communication: Seroprevalence of paratuberculosis in Italian water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the region of Campania. *J Dairy Sci.* 2021 May;104(5):6194-6199. doi: 10.3168/jds.2020-19022. Epub 2021 Mar 6. PMID: 33685689. (**IF 4,034**).
4. Pagliasso G, Di Blasio A, Vitale N, Romano A, Decastelli L, Quasso A, Ricchi M*, Dondo A, Pastorino P, Gennero MS, Bergagna S. Goat paratuberculosis: experimental model for the evaluation of *Mycobacterium* persistence in raw milk cheese. *Microorganisms* 2021, 9, 2032. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102032> (**IF 4,128**).

Su atti di congressi o riviste senza Impact Factor:

- 1 Arrigoni N*, Cerioli M, Nassuato C, Farioli M, Boldini M, Gradassi M, Ventura G, Giovannini S, Paterlini F, Rosignoli C, Vezzoli F, Garbarino C*, Bellini S, Ruocco L, Procopio A, Tamba M: "Bovine paratuberculosis in Italy: review of the national

guidelines after seven years of their application". Proceedings of Paratuberculosis Virtual Forum 2021, organizzato da International Dairy Federation in modalità webinar, il 26.5.2021 (in corso di stampa).

Attività di referaggio:

Nel periodo considerato sono stati effettuati:

- 2 referaggi (N.Arrigoni) sulle materie di interesse del Centro di Referenza per riviste impattate (Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases, Veterinaria Italiana)
- 3 referaggi (M.Ricchi) sulle materie di interesse del Centro di Referenza per riviste impattate (AIMS Microbiology, Molecules, Infection Genetics and Evolution)

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 secondo un format IZSLER comune a tutti i centri di referenza.

Sul sito sono 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.
- una brochure informativa/divulgativa dal titolo "Paratubercolosi nell'allevamento della capra da latte", destinato ad allevatori e veterinari.
http://archive.izsler.it/pls/izs_bs/v3_s2ew_consultazione.mostra_pagina?id_pagina=5710
- 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 test PCR e coltura.

Centro di Referenza Nazionale (C.R.N.) Paratubercolosi **Programmazione attività per il periodo 1.10.2021 – 30.09.2022**

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) 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;
- 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 nei confronti della Paratubercolosi”*, con introduzione della PCR di conferma sugli animali sieropositivi, in allevamenti a bassa prevalenza ed estensione alle altre specie sensibili (bufalo, ovino, caprino).

L'aumento di attività analitica potrebbe inoltre far seguito all'inserimento della paratubercolosi nella lista delle malattie previste dal Regolamento (UE) 2016/429, all'interno della categoria e) da sottoporre a sorveglianza.

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

E' in previsione, per i primi mesi del 2021, la realizzazione di un *ring test* per la diagnosi sierologica mediante ELISA da siero di sangue e latte di bovino, siero di sangue di bufalo e di capra.

Al precedente ring test per la diagnosi sierologica avevano aderito 40 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 o GD Animal Health – Deventer, NE).

6. Altre attività

E' in previsione la stesura di una brochure informativa/divulgativa dal titolo *“Paratubercolosi nella bufala: conoscerla per combatterla”*, destinata ad allevatori e veterinari.

Epidemiologia

1. Creazione banca dati

Verrà mantenuto il presidio del sistema Vetinfo relativamente ai casi clinici 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 bovini e bufalini nei confronti della Paratubercolosi

A seguito della introduzione della paratubercolosi nell'elenco delle malattie di categoria e) ai sensi del Regolamento (UE) 2016/429 e relativo Regolamento di esecuzione 2018/1882, la proposta di modifica al Ministero è stata integrata con l'estensione delle Linee guida a tutte le specie di interesse previste, oltre al bovino (bufalina, ovina e caprina). Questa ultima modifica è stata inviata al Ministero per la presentazione in Conferenza Stato Regioni in data 13.10.2021.

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 29.05.2022 (prorogato).
- 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 è stato avviato 20.12.2019 e terminerà il 19.05.2022.

- Progetto di ricerca corrente IZS LE 2020/009: “Automazione delle metodiche per la rilevazione degli acidi nucleici di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) in campioni diagnostici” (Responsabile scientifico: M. Ricchi). Il progetto è stato avviato il 31.12.2020 e terminerà il 30.12.2022.

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 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 29.11.2021 (progetto prorogato).
- 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 20.05.2022 (progetto prorogato).
- Progetto di ricerca corrente IZS PLV 2018/106 “Valutazione del profilo immunitario delle cellule T nella diagnosi precoce della malattia di Johne” (Responsabile scientifico: M.S. Gennero). Il progetto è iniziato il 20.12.2018 e terminerà il 20.05.2022 (progetto prorogato).
- Progetto di ricerca corrente IZS UM 2021/006: “Valutazione dei livelli di espressione dei microRNA e loro impiego come biomarkers nella Paratubercolosi bovina. (Responsabile scientifico: Piera Mazzone). Si prevede che il progetto inizi entro la fine del 2021.

Ricerca finalizzata

Nulla da segnalare.

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.)

Il CRN (Chiara Garbarino) sarà correlatrice alla tesi di laurea dal titolo “Rischio di infezione da paratubercolosi al pascolo in ambiente condiviso da ruminanti domestici e selvatici”, di Alessia Bortoloni, in collaborazione con l’Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Medicina Veterinaria, Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie delle Produzioni Animali (Relatrice Prof.ssa Camilla Luzzago).

Aggiornamento e formazione professionale

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

- E' in previsione per i mesi di ottobre e novembre 2021 la realizzazione di un corso FAD relativo a "Paratubercolosi nell'allevamento caprino e aspetti di benessere e biosicurezza" sul portale FAD dell'IZSLER.
- **Convegni/congressi che il C.R.N. organizzerà o a cui parteciperà:**
 - E' in previsione la partecipazione alla Giornata delle ricerche organizzata da IZSLER in data 11.11.2021, con presentazione dei risultati preliminari di due Progetti di Ricerca Corrente (Anita Filippi PRC2019010; Filippo Barsi PRC 2018/011).
 - E' in previsione per il giorno 15.11.2021 la realizzazione da parte del C.R.N di un convegno nazionale, in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico del Mezzogiorno, dal titolo "Paratubercolosi bovina e bufalina: l'importanza di una visione interdisciplinare".

Programma:

 - 14:00 - Saluti Autorità
 - 14:30 - Stato sulle conoscenze e novità legislative - Norma Arrigoni (CRN Paratubercolosi)
 - 15:00 - Indagine di siero prevalenza in Regione Campania nella specie bufalina e applicabilità del Piano Nazionale –Esterina De Carlo (CRENBUF)
 - 15:30 - Esperienze sul territorio campano - Carlo Ferrara (ASL CE)
 - 16:00 - Diagnostica della paratubercolosi nei ruminanti - Matteo Ricchi (CRN Paratubercolosi)
 - 16:20 - Valutazione dei profili di resistenza genetica alla paratubercolosi - Piera Mazzone (IZSUM)
 - 16.40 - Analisi del microbiota intestinale. Può avere un ruolo nel controllo della paratubercolosi? - Luigi Orrù (CREA)
 - 17.00 - L'importanza della motivazione degli allevatori nella gestione della malattia in allevamento - Chiara Anna Garbarino (CRN Paratubercolosi)
 - 17:30 - Progress towards developing vaccines against mycobacterial pathogens – Prof. William Davis (Dipartimento di Microbiologia e Patologia Veterinaria, College of Veterinary Medicine, Washington State University).
- E' in previsione la partecipazione del C.R.N al 15th International Colloquium on Paratuberculosis (Dublin, giugno 2022). In questa occasione il C.R.N. presenterà:
 - 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.
 - i risultati dello studio eseguito presso il C.R.N relativamente alla validazione del metodo di prova per la rilevazione di MAP dalle feci tramite PCR in accordo con le linee guida dell'OIE.

- i risultati preliminari del Progetto di ricerca corrente IZS LE 2019/010 “Rischio di infezione da paratubercolosi al pascolo: contributo di ruminanti domestici e selvatici”.

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

- E' in previsione per il giorno 14 dicembre 2021 l'organizzazione da parte del C.R.N. di una riunione dei referenti degli Istituti Zooprofilattici, con la partecipazione del dott. Lomolino del Ministero della Salute, con il seguente programma:
 - 8.30-9.00: Introduzione lavori (N. Arrigoni)
 - 9.00-9.30: Novità relative alle linee guida nazionali (C. Garbarino)
 - 9.30-10.00: Situazione epidemiologica nelle specie sensibili (M. Tamba)
 - 10.00-10.30: Dati di diffusione nella specie bufalina (A. Martucciello)
 - 10.30-11.00: PTBC nella capra: esperienze e PGS (A. Gaffuri)
 - 11.00-11.30: Aggiornamento attività del Centro di referenza (A. Filippi, S. Russo, F. Barsi)
 - 11.30-12.00: Diagnostica (risultati dei ring test sierologico e diagnosi diretta) (M. Ricchi)
 - 12.00-12.30: Discussione
- E' in programma inoltre che il C.R.N. partecipi ai seguenti gruppi di lavoro:
 - Gruppo di lavoro con Ministero della Salute, Regioni e IZZSS per il coordinamento del piano di intervento nazionale nei confronti della Paratubercolosi;
 - Board of Directors, International Association of Paratuberculosis (Rappresentante italiano: 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 IZZSS, 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 Medicina Veterinaria, Scienze Biologiche e Biotecnologie, per l'approfondimento delle metodiche diagnostiche sulla Paratubercolosi. Nel mese di ottobre 2021 è in previsione una visita formativa del dott. Joel Fernando Soares Filipe, richiesta dal Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Milano.

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.
- E' in previsione per il giorno 02/12/2021 una docenza del C.R.N. (Dr. C.Garbarino) in modalità webinar, al Corso di Laurea Magistrale in Scienze delle Tecnologie delle Produzioni Animali, Corso di gestione dei Piani di Profilassi, 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".

Consulenze e collaborazioni europee

Nulla da segnalare

Consulenze e collaborazioni internazionali

Nulla da segnalare

Pubblicazioni scientifiche e divulgative

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

Su riviste con Impact factor:

E' in previsione la pubblicazione su riviste internazionali dei seguenti lavori scientifici:

- Studio sulla diffusione in allevamento di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mediante WGS - Progetto di ricerca corrente IZS LE 2014/013. Il lavoro è già stato sottomesso alla rivista *Veterinary Microbiology* ed è stato accettato per la pubblicazione (Bolzoni L, Scaltriti E, Russo S, Pongolini S, Garbarino C*, Leo S*, Arrigoni N*, Ricchi M*. "Transmission patterns of a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* clone within a single heard investigated by Whole Genome Sequencing").
- Studio sulla validazione del metodo di prova sviluppato dall'istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, in collaborazione con l'Università di Sassari ed il CNR sull'impiego di fago associato alla PCR per la rilevazione di MAP da latte (Hosseinpourgham S, Rebechesu L, Pintore P, Lollai S, Russo S*, Dattena M, Ruiu A and Sechi LA. "Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) viability in sheep and goat milk samples via a novel and conventional phage assay), sottomesso alla rivista *Scientific Report* il 13/08/2021 ed attualmente in attesa di valutazione da parte dei reviewers.
- Studio sulla validazione del metodo di prova sviluppato e impiegato presso il C.R.N. per la ricerca di DNA di MAP in campioni fecali, dal titolo "Validation of IS900-qPCR assay to assess the presence of *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* in faecal samples". Il lavoro sarà sottomesso alla rivista *Preventive Veterinary Medicine*.

Su atti di congressi o riviste senza Impact factor

- Russo S*, Galletti G, Filippi A*, Arrigoni N*, Garbarino C*, Ricchi M*. Validation of a IS900-qPCR assay for the detection of paratuberculosis in faeces according to the OIE “Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious disease”. 15th International Colloquium on Paratuberculosis, Dublin, 12-16 June 2022.
- Barsi F*, Cosciani-Cunico E, Russo S*, Dalzini E, Filippi A*, Cammi G*, Arrigoni N*, Daminelli P, Losio N, Garbarino C*, Ricchi M*. Heat resistance of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: inactivation kinetics during the production process of Mozzarella cheese. 15th International Colloquium on Paratuberculosis, Dublin, 12-16 June 2022.
- Filippi A*, Luzzago C, Nava M, Forti A, Russo S*, Barsi F*, Corlatti L, Pedrotti L, Bianchi A, Ricchi M*, Arrigoni N*, Garbarino C*. Exposure to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis on Alpine pastures (Northern Italy): evaluation of cattle and red deer (Cervus elaphus) contribution through environmental faecal samples. 15th International Colloquium on Paratuberculosis, Dublin, 12-16 June 2022.

Sito Web

Il sito web, 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.

Verrà pubblicata una brochure sulla paratubercolosi nell'allevamento bufalino e verrà arricchita la sezione relativa alla documentazione fotografica.