

Piano di Attività Centro di Referenza Nazionale (CRN) Paratubercolosi

Anno 2010-2011

Attività Diagnostica

1) standardizzazione e validazione di metodiche analitiche

Nel corso dell'anno si è proceduto alla **codifica** dei seguenti metodi di prova:

- Metodo di prova interno per la tipizzazione molecolare di ceppi di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* tramite PCR (MP 09/088, rev.0).
- Metodo di prova interno per la ricerca di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* tramite real time PCR in matrici di origine animale (MP 09/78, rev.0).

I metodi sono a disposizione degli altri Istituti, al fine di giungere ad una standardizzazione delle varie metodiche.

Alcuni IIZZSS hanno richiesto, nel corso dell'anno di attività, copia dei vari metodi di prova e delle schede relative ai terreni utilizzati nelle prove batteriologiche, nonché consulenza su problemi specifici riguardanti gli aspetti diagnostici.

2) produzione e distribuzione di reagenti

Sono a disposizione dei vari IIZZSS ed Università che ne fanno richiesta:

- sieri di animali infetti;
- feci di animali infetti;
- ceppi batterici;
- DNA di ceppi batterici.

Presso il CRN è stata realizzata una biobanca, in cui sono stati codificati:

- sieri di riferimento positivi e negativi
- ceppi batterici tipizzati mediante metodica molecolare, appartenenti alle specie:
 - o *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map);
 - o *Mycobacterium porcinum* (agente di false positività in PCR-IS900 per Map).

3) attività analitica

Nel periodo di riferimento l'attività di routine si è indirizzata alla diagnosi di infezione prevalentemente dalla specie bovina.

Sui campioni pervenuti sono stati eseguiti complessivamente **33.213 esami**, di cui:

Sierologici	31.668
Microbiologici	694
PCR	851

I risultati non rivestono importanza epidemiologica, in quanto i campioni sono stati inviati al laboratorio per diverse finalità (animali con forma clinica, monitoraggi a tappeto in allevamenti di stato sanitario sconosciuto, campionamenti mirati ecc.). Si può comunque

affermare che la Paratubercolosi, analogamente agli altri Paesi Europei, è una malattia molto diffusa sul nostro territorio, così come già messo in evidenza da precedenti indagini epidemiologiche sul territorio nazionale. Sono di seguito riportati i dati relativi ad alcune indagini effettuate dal CRN e/o da altri IIZZSS.

Area	Periodo	Test Diagnostico	Prev. Apparente Allevamenti	Prev. Apparente Animali
Veneto	2000-2001	ELISA indiv.	64.9%	3.5%
Lombardia	2003-2005	ELISA indiv.	43.7%	2.6%
Lazio	2005	ELISA indiv.	42%	2.4%
Umbria e Marche	2009-2010	ELISA indiv.	52.8%	4.7%
Emilia-Romagna	2011	ELISA latte di massa	11.3%	Non determinato

Nonostante la conferma diagnostica per la Paratubercolosi non sia prevista da alcuna normativa, il CRN riceve comunque materiale biologico (ceppi, feci, sieri) da vari IIZZSS per la conferma diagnostica.

4) circuiti interlaboratorio organizzati dal CRN

E' stato organizzato dal CRN un circuito interlaboratorio per la diagnosi diretta (coltura e/o PCR), a cui hanno aderito 15 laboratori appartenenti a 9 IIZZSS.

Per la realizzazione del ring test è stato attivato il sito internet dell'IZSLER, con possibilità di iscrizione on-line, inserimento risultati, caricamento e scaricamento documenti, protocolli e report.

I campioni sono stati spediti il 28.2.2011; la deadline prevista per l'inserimento dei risultati era il 1 agosto 2011. I risultati sono stati inseriti da tutti i laboratori partecipanti nei tempi previsti.

Il CRN ha provveduto alla pubblicazione di:

- tabella per la decodifica dei risultati entro 7 giorni dalla deadline, al fine di provvedere prontamente alla correzione di eventuali non conformità;
- report completo entro 30 giorni dalla deadline, come previsto dal protocollo.

Il protocollo ed il report del ring test sono disponibili presso il CRN e sul sito IZSLER.

5) ring test a cui ha partecipato il personale del CRN.

Il CRN ha partecipato a:

- 2 prove interlaboratorio (novembre 2010, febbraio 2011), organizzate a livello europeo, per esame sierologico mediante ELISA (Ente organizzatore: QA Veterinary Laboratory Agency - UK). I risultati sono stati corretti nel 100% dei casi.

- 2 prove interlaboratorio (novembre 2010, febbraio 2011), organizzate a livello europeo, per esame sierologico mediante AGID (Ente organizzatore: QA Veterinary Laboratory Agency - UK). I risultati sono stati corretti nel 100% dei casi.
- 1 prova interlaboratorio (gennaio 2011), organizzata a livello europeo, per PCR su feci (Ente organizzatore: QA Veterinary Laboratory Agency - UK). I risultati sono stati corretti nel 100% dei casi.

Epidemiologia

1) creazione banca dati

E' stata realizzata una banca dati sulle caratteristiche genotipiche dei ceppi di campo isolati presso il CRN o inviati al CRN da parte di altri IZS o Enti. I dati raccolti sono stati pubblicati su una rivista impattata (Ricchi M, Barbieri G, Taddei R, Belletti GL, Carra E, Cammi G, Garbarino CA, Arrigoni N. Effectiveness of combination of Mini- and Microsatellite loci to sub-type Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Italian type C isolates. BMC Vet Res. 2011 Sep 19;7(1):54. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21929793. DOI:10.1186/1746-6148-7-54

2) sviluppo e gestione di sistemi informativi;

Non esistono al momento sistemi informativi organizzati, finalizzati alla raccolta di dati relativi alla paratubercolosi.

3) studio, sviluppo e gestione di sistemi di sorveglianza, verifica e controllo;

3.a. Piano di monitoraggio nazionale

A seguito di un incontro (16.5.2011) convocato dalla Dr.ssa G.Ferri del Ministero, a cui hanno partecipato, oltre al Dr.L.Ruocco, il Dr.G.Varisco, il Dr.M.Tamba e la Dr.ssa Arrigoni in rappresentanza dell'IZSLER, è stato richiesto al CRN di presentare una proposta di un piano di monitoraggio e di intervento sulla paratubercolosi da effettuarsi a livello nazionale. Tale proposta (Vedi all.3 Programmazione attività, punto 3.a), di durata biennale, è stata trasmessa al Ministero, da questo alle Regioni ed è in fase di valutazione.

Attraverso l'esecuzione del progetto si vogliono raggiungere i seguenti obiettivi:

- stimare la diffusione dell'infezione paratubercolare negli allevamenti bovini, con particolare riferimento a quelli da latte;
- individuare con una sufficiente probabilità gli allevamenti di bovini da latte ad alta prevalenza di infezione, distinguendoli da quelli a bassa prevalenza o negativi;
- sensibilizzare gli allevatori alle problematiche connesse alla Paratubercolosi;
- fornire indicazioni operative per la riduzione dell'incidenza di casi clinici ed il controllo dell'infezione negli allevamenti infetti;
- ridurre il rischio per il consumatore di assumere MAP vitale attraverso il consumo di latte e derivati.

3.b. Piano di monitoraggio regionale (Emilia Romagna)

Nel mese di marzo 2011 è iniziato in tutta la regione Emilia-Romagna il Piano regionale di monitoraggio della Paratubercolosi, di durata triennale.

Il Piano vuole sensibilizzare gli allevatori alla gestione della problematica connessa alla Paratubercolosi:

- definendo lo stato di infezione degli allevamenti;
- fornendo delle indicazioni operative per il controllo dell'infezione negli allevamenti infetti;
- valorizzando le produzioni degli allevamenti negativi o a bassa probabilità di infezione;
- limitando il rischio di presenza di Map nel latte.

Nell'anno in corso è stato dato l'avvio alla fase 1 del progetto, che prevede un monitoraggio su tutto il patrimonio bovino da latte della Regione, allo scopo di stimare la prevalenza di infezione paratubercolare, mediante test ELISA sul latte di massa di ogni allevamento, contestualmente al prelievo per Brucellosi e Leucosi; tale monitoraggio è tuttora in fase di attuazione (è in corso il secondo prelievo su tre previsti).

E' da tenere presente che il test ELISA sul latte di massa è poco sensibile ed è nota dalla bibliografia la sua capacità di mettere in evidenza solo le aziende ad elevata prevalenza, anche se il campionamento ripetuto tende ad aumentare la sensibilità della metodica.

La prevalenza di aziende positive al latte di massa (= con almeno un controllo positivo) si attesta intorno all'11.3 % (dati parziali aggiornati al 30.09.2011).

Nell'anno in corso sono stati realizzati 2 incontri tecnici, rivolti specificatamente ai veterinari delle ASL e ai veterinari liberi professionisti.

3.c. Piano di Certificazione nelle Province di Lodi e Milano

Il CRN ha partecipato alla stesura di un Piano di Certificazione per la Paratubercolosi, su richiesta dall'Associazione Allevatori della province di Milano e Lodi, in collaborazione con le rispettive ASL. Tale Piano, a carattere volontario, è stato approvato dall'ASL di Lodi (det. n.113 del 23/04/2007) e dall'ASL di Milano (Det. n.20 del 02/04/2008). Il piano prevede test annuali mediante esame sierologico ELISA e/o colture fecali, in base ai quali l'allevamento viene categorizzato in 4 livelli, cui corrispondono livelli di garanzia crescente di assenza di infezione in allevamento.

Assemblando i dati delle 2 province, a tutt'oggi 32 aziende hanno ottenuto la certificazione, di cui 23 di 1° livello, 7 di 2° livello, 1 di 3° livello e 1 di 4°.

Il CRN fa parte del Comitato tecnico, che ha il compito di valutare i risultati del piano ed eventualmente proporre modifiche per migliorarne l'efficacia, nonché promuovere azioni di sostegno.

3.d Progetto di Monitoraggio e Formazione nella provincia di Lodi

E' stato siglato un protocollo di intesa tra Provincia di Lodi, Camera di Commercio, Industria, Artigianato e Agricoltura di Lodi, ASL della provincia di Lodi, APA di Milano e Lodi, Ordine dei Veterinari della provincia di Lodi e IZSLER per lo sviluppo di azioni

concertate contro la paratubercolosi bovina, a sostegno del Piano di certificazione in atto nelle stesse province. Il Centro di Referenza ha partecipato ad una riunione con gli enti coinvolti in data 27 gennaio 2011, per la verifica dello stato di avanzamento delle azioni previste dal progetto.

Tali azioni prevedono:

- una indagine mediante test ELISA sul latte di massa degli allevamenti della provincia di Lodi, prelevato per i piani di profilassi per Brucellosi e Leucosi, per un totale di 338 aziende campionate 2 volte nel corso dell'anno; le aziende risultate positive almeno una volta sono risultate 99 (29.3%). Di queste, il 7.7% risulta sempre positivo e il 21.6% risulta positivo una volta su due. Considerando che il latte di massa individua solo aziende a prevalenza medio-alta (>5-10%), la prevalenza di aziende infette è ampiamente sottostimata.
- un monitoraggio sulle stesse aziende mediante test ELISA su un campione di 30 animali e un campione di feci ambientale, allo scopo di promuovere l'adesione al piano di certificazione. I risultati confermano la diffusione preoccupante dell'infezione, in particolare nelle aziende di dimensioni medio-grandi, dove la prevalenza apparente di aziende con almeno un campione positivo è del 64.7%.
- è stato prodotto un depliant illustrativo "Paratubercolosi nell'allevamento della bovina da latte", che è stato stampato e distribuito agli allevatori e ai tecnici presenti. Il depliant è stato pubblicato sul sito del Centro di referenza (vedi Capitolo "Pubblicazioni scientifiche e divulgative").

3.e Manuali per il Controllo della Paratubercolosi

Sono a disposizione sul sito del CRN due *Manuali per il Controllo per la Paratubercolosi*, uno destinato agli allevamenti di vacche da latte (http://www.izsler.it/pls/izs_bs/v3_s2ew_CONSULTAZIONE.mostra_pagina?id_pagina=507) e uno a quelli di vacche da carne (http://www.izsler.it/pls/izs_bs/v3_s2ew_CONSULTAZIONE.mostra_pagina?id_pagina=508). I due Manuali ed il loro utilizzo sono stati illustrati nel corso di vari interventi pubblici.

4) aggiornamenti epidemiologici sulle materie di competenza

A seguito della pubblicazione di un articolo (Cossu et al. "Association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with Multiple Sclerosis in Sardinian patients", PlosOne, 2011, 6, 4, e18482) relativo alla possibile connessione tra *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e Sclerosi Multipla dell'uomo, il CRN ha inviato nel mese di aprile 2011 al Ministero della Salute un parere, qui di seguito riportato.

Parere relativo alla ipotizzata relazione tra Map e sclerosi multipla

L'ipotesi di un nesso causale tra *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), agente della Paratubercolosi dei ruminanti, e Sclerosi Multipla dell'uomo ha avuto notevole risalto sulla stampa nazionale, a seguito della pubblicazione sulla rivista scientifica PlosOne di un articolo di un gruppo di ricercatori, coordinati dal Prof. Leonardo Sechi dell'Università di Sassari (Cossu et al.

“Association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with multiple sclerosis in Sardinian patients”, PlosOne, 2011, 6, 4, e18482).

Lo studio, relativo a 50 pazienti sardi con Sclerosi Multipla, ipotizza che, attraverso un meccanismo di mimetismo molecolare, Map sia in grado di indurre una risposta auto-immunitaria nei confronti di componenti del sistema nervoso centrale, causando demielinizzazione degli assoni. La teoria che agenti batterici possano in qualche modo fungere da fattori scatenanti lo sviluppo di malattie autoimmuni in soggetti con peculiari polimorfismi genetici a carico di proteine del sistema immunitario non è nuova. Infatti, gli stessi autori hanno ipotizzato un ruolo di Map in altre patologie a eziologia autoimmunitaria, come il Diabete mellito tipo 1 e il Morbo di Crohn.

Gli autori basano la loro ipotesi su:

- evidenze epidemiologiche (elevata prevalenza della Sclerosi Multipla e del Diabete mellito di tipo 1 nella popolazione sarda, fortemente esposta a Map)
- omologia tra la proteina MAP2694 (codificata da Map) e alcune proteine del sistema immunitario (la catena C del recettore gamma presente sulle cellule T e il componente 1 del Complemento)
- presenza di polimorfismi genetici particolarmente rappresentati nella popolazione sarda.

Tuttavia, MAP2694 è una proteina trans-membrana **conservata nella famiglia delle Mycobacteriaceae, pertanto non esclusiva di Map**, come sottolineato dagli stessi autori.

Nell'articolo, il sangue del 42% dei pazienti affetti da sclerosi multipla mostrava la presenza di DNA di Map, rilevata tramite PCR, rispetto al 12.5% dei controlli; gli stessi pazienti mostravano la presenza di anticorpi diretti verso la proteina MAP2694 nel 32% rispetto al 2% dei controlli.

La scarsa correlazione tra positività ad anticorpi e alla PCR è stata spiegata dagli autori ipotizzando differenti pattern di risposta immunitaria in differenti fasi progressive dell'infezione, con sviluppo di anergia nelle fasi terminali.

A nostro parere, non si può escludere che la presenza di Map e anticorpi in circolo possano essere legati alla **condizione di particolare permissività del sistema immunitario** che soggetti geneticamente predisposti manifestano. **Questo non esclude un analogo ruolo per altri agenti batterici/virali, non indagati in questo studio.**

Le teorie proposte, sebbene interessanti e meritevoli di un approfondimento, **necessitano di una validazione su più su vasta scala**, eventualmente testando tale ipotesi anche in popolazioni con diversi polimorfismi a carico delle proteine del sistema immunitario. Tale necessità veniva peraltro sottolineata dagli stessi autori.

Ribadendo un parere del 2000 della Comunità Europea (Comitato Scientifico sulla Salute e sul Benessere Animale: *“Indipendentemente dal possibile ruolo di Map (nel morbo di Crohn), l'applicazione di ogni mezzo volto ad eradicare la paratuberculosis dall'allevamento animale deve costituire una priorità”*).

Indipendentemente dal possibile ruolo zoonosico di Map, si sottolinea che è indiscutibile che la popolazione, così come già in diverse occasioni espresso dal Centro di Referenza nazionale, sia esposta al contatto con Map attraverso varie fonti alimentari, come il latte, le carni e l'acqua.

Le indagini eseguite finora sul nostro territorio, in analogia con i dati segnalati nel territorio europeo, riportano dati di prevalenza di allevamenti infetti superiori al 50%.

Gli interventi per controllare il problema sono al momento limitati e su base volontaria.

Alcune regioni sono partite con Piani di monitoraggio ed esperienze di certificazione.

Ricerca e sperimentazione

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

Ricerca Corrente

- Progetto di Ricerca Corrente IZS LE 19/09: “Tipizzazione molecolare dei ceppi di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) e sue applicazioni in epidemiologia molecolare” (Responsabile scientifico: Dr. N. Arrigoni). La ricerca ha avuto inizio il 1.9.2010 e terminerà il 31.8.2012. I risultati del progetto sono stati pubblicati in 2 pubblicazioni su riviste impattate e in 2 congressi, di cui uno nazionale ed uno internazionale (vedi sezione pubblicazioni).

Il Centro di Referenza è inoltre coinvolto nei seguenti Progetti di Ricerca Corrente di altri IZZSS, in cui fornisce attività di consulenza sulle metodiche analitiche ed eventuale attività di conferma:

- Progetto di ricerca corrente IZS PLV 10/08: “Approccio multi task finalizzato al controllo dell’infezione da *M.avium* subsp. *paratuberculosis*: valutazioni sull’efficacia diagnostica di un protocollo integrato e analisi dei fattori genetici di resistenza alla malattia (Responsabile scientifico: Dr. Maria Goria); la ricerca è iniziata il 31.10.2009 e terminerà il 30.10.2012;
- Progetto di ricerca corrente IZS UM 11/08: “Messa a punto e validazione di nuovi allergeni da impiegare per gli accertamenti diagnostici in vivo ed in vitro per *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*” (Responsabile scientifico: Dr. Monica Cagiola). Il progetto è iniziato il 1.6.2009 ed è terminato il 31.5.2011 (prorogato al 30.11.2011);
- Progetto di ricerca corrente IZS UM 07/08: “Indagine sulla prevalenza della Paratubercolosi in aziende da latte ed in centri genetici delle Regioni Umbria e Marche e predisposizione di protocolli per il contenimento della malattia in aziende infette e per la prevenzione della contaminazione del latte” (Responsabile scientifico: Dr. Paola Papa). Il progetto è iniziato il 1.6.2009 ed è terminato il 31.5.2011;
- Progetto di ricerca corrente IZS SA 07/08: “Paratubercolosi dei ruminanti: definizione di protocolli diagnostici, studio della resistenza/suscettibilità genetica e della dinamica della escrezione di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) nel latte (Responsabile scientifico: Dr. Ciriaco Ligios). Il progetto è iniziato il 1.09.2009 ed è terminato il 31.8.2011.
- Progetto di ricerca corrente IZS SA 04/09: “Genotyping e gene expression in ovini clinicamente e sub-clinicamente affetti da *M.avium* subsp. *paratuberculosis* (Map)” (Responsabile scientifico: Dr. Nicoletta Ponti). Il progetto è iniziato il 15.12.2010 e terminerà il 14.12.2011.

Ricerca Finalizzata

Il CRN ha presentato un progetto di Ricerca Finalizzata (Area: FOOD SAFETY) dal titolo “Risk evaluation of human exposure to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and comparative analysis of strains of human and animal origin” (Principal investigator: Leonardo Sechi).

Le Unità Operative coinvolte sono:

- UO 1 (Capofila): IZSLER Piacenza, Centro Referenza Nazionale Paratubercolosi (Dr. N.Arrigoni)
- UO 2: Università Sassari, Dipartimento di Scienze biomediche (Prof. L.Sechi)
- UO 3: IZSLER Brescia, Analisi del rischio (Dr. S. Pongolini,)
- UO 4: IZSLER Brescia, Microbiologia predittiva (Dr. P.Daminelli,)
- UO 5: IZSLER Pavia (Dr. M.Fabbi)

Il progetto è stato approvato dal Ministero della Salute. L'avvio del progetto è previsto per fine 2011-inizio 2012.

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

- E' stata avviata, nel mese di aprile 2011, una ricerca della durata di 18 mesi dal titolo "Valutazione della prevalenza e del livello di contaminazione da Map nel latte alimentare". La ricerca è finanziata dall'Università degli Studi di Bologna, Dipartimento di Scienze mediche Veterinarie. La ricerca prevede la messa a punto di protocolli di PCR quantitativa dal latte, in parallelo ai filtri di mungitura e ai test ELISA. Su un campione di aziende verrà effettuata l'indagine individuale in ELISA per la valutazione della sensibilità delle metodiche precedenti. Nel primo anno di attività sono state messe a punto le metodiche PCR da latte e filtri e sono stati analizzati i campioni di latte di massa in ELISA.
- Continua la collaborazione con il Parco Tecnologico Padano, con uno studio sulla resistenza genetica del bovino nei confronti dell'infezione Paratubercolare e di correlazione della virulenza dei ceppi con le loro caratteristiche genotipiche.

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

E' in corso un progetto con il Policlinico IRCCS S.Matteo di Pavia (Dr. P.Marone), il Gruppo Policlinico di Monza (Prof. A. Giacosa) e l'Università di Milano (Prof. C. Bandi), dal titolo "Studio dell'infezione/colonizzazione da *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in pazienti con morbo di Crohn e in ruminanti". Sono in corso di pubblicazione su una rivista internazionale i risultati del progetto.

Aggiornamento e formazione professionale

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

- XII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.- Genova, 27-29 ottobre, dove il Dr.Ricchi è stato selezionato per una presentazione orale dal titolo "Sub-tipizzazione molecolare di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mediante High-Resolution Melting DNA Analysis e sonde non marcate".
- Convegno "Paratubercolosi: conoscerla per combatterla" organizzato dalla provincia di Lodi, presso il Parco Tecnologico Padano, Lodi, il 11.3.2011, dove la Dr.ssa Arrigoni ha presentato una relazione dal titolo "Paratubercolosi: perché preoccuparsi".

- Corso “Aggiornamenti sulle patologie di interesse zootecnico e nuove strategie di intervento” organizzato dall’ASL di Nuoro, a Nuoro il 25 marzo 2011, a cui ha partecipato la Dr.ssa Arrigoni con una relazione dal titolo “Paratubercolosi: generalità sulla malattia ed epidemiologia”.
- “5th international qPCR Symposium & Industrial Exhibition & Application Workshop Molecular Diagnostics: from single-cells to Next Generation Sequencing”, che si è svolta dal 28 Marzo al 1 Aprile 2011, presso l’Università di Monaco, a Freising-Weihenstephan (Germany), dove il Dr. Ricchi ha presentato un poster dal titolo “High Resolution Melting with Unlabelled Probe approach for the analysis of Short Sequence Tandem Repeats loci to sub-type *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*”.
- Corso “Biosicurezza nell’allevamento dei bovini attraverso lo studio delle loro malattie”, organizzato dal Servizio Sanitario Regionale Emilia-Romagna, in 2 edizioni (1°ed. presso INFORMO, ASL Modena, il 7 giugno 2011; 2° ed: presso IZS Parma il 6 ottobre 2011) a cui ha partecipato la Dr.ssa Arrigoni con due relazioni dal titolo: “Paratubercolosi: Modalità di trasmissione, Modalità di controllo in allevamenti da latte e da carne, Primi risultati del piano regionale” e “Applicazione pratica: utilizzo di una scheda per la valutazione del rischio di trasmissione della Paratubercolosi in aziende da latte e da carne”.
- Convegno “Paratubercolosi: la patologia negli animali e il possibile ruolo in sanità pubblica”, organizzato dall’IZS del Mezzogiorno a Copanello di Staletti (CZ), il 30 giugno 2011, dove la Dr.ssa Arrigoni ha presentato 3 relazioni dal titolo: “Presenza di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) nella catena alimentare”, “Piani di intervento nei confronti della Paratubercolosi in Europa” e “Conclusioni e prospettive future”.

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

- Il CRN, in collaborazione con il Centro di Referenza nazionale per la Formazione (IZSLER Brescia), ha organizzato il IV Convegno Nazionale sulla Paratubercolosi, che si è tenuto a Bologna, il 4 novembre 2010, presso il palazzo della Regione Emilia-Romagna.
Di seguito viene riportata la relazione sulla giornata.

IV CONGRESSO NAZIONALE SULLA PARATUBERCOLOSI

Bologna, 4 novembre 2010

Responsabile scientifico: Norma Arrigoni

Il congresso si è tenuto presso il Palazzo della Regione Emilia Romagna, ed ha visto la presenza di 134 partecipanti (127 accreditati ECM e 7 uditori), tra cui veterinari e biologi del Servizio Sanitario Nazionale (sia ASL che IZS), liberi professionisti, docenti universitari e studenti, a conferma dell'interesse e dell'attualità dei temi trattati nel convegno.

Il congresso è stato strutturato in due parti:

- la prima, che ha occupato tutta la mattinata, ha riguardato gli aspetti generali della patologia e le possibili connessioni con la medicina umana, con particolare riferimento alla Malattia di Crohn;
- la seconda, che ha occupato il pomeriggio, in cui è stato fatto il punto sulle iniziative europee ed italiane nel campo del controllo della paratubercolosi.

Il **Dott. Gian Luca Belletti**, responsabile della Sezione Diagnostica di Piacenza dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, ha aperto i lavori con una relazione introduttiva sugli aspetti generali della patologia, a partire dalle caratteristiche dell'agente eziologico, per passare alle modalità di trasmissione, alla patogenesi ed ai problemi connessi con l'utilizzo delle metodologie diagnostiche attualmente disponibili. La relazione si è conclusa con una analisi delle problematiche relative al controllo della patologia in allevamento, attualmente basata sull'eliminazione degli animali positivi ai test e sull'applicazione di un piano di sicurezza a tutela dei giovani animali. Il Dr. Belletti ha discusso inoltre alcuni aspetti connessi all'utilizzo dei vaccini. I vaccini oggi disponibili (inattivati ed adiuvati) limitano la gravità delle forme cliniche migliorando le performances produttive dell'animale e dell'allevamento, e contemporaneamente limitano l'escrezione di Map nell'ambiente, con un effetto favorevole sul controllo della diffusione dell'infezione. Tuttavia il loro utilizzo non è attualmente consentito per la interferenza con la diagnosi della tubercolosi bovina, oltre che con la diagnosi indiretta della paratubercolosi.

Il secondo intervento della mattinata, tenuto dalla **Dott. Norma Arrigoni**, responsabile del Centro di Referenza Nazionale della Paratubercolosi, ha sottolineato l'interesse crescente da parte della comunità scientifica per questa patologia, con particolare riferimento al suo potenziale carattere zoonosico. La relazione ha riassunto le conoscenze attuali sull'esposizione dell'uomo, al fine di caratterizzare il rischio potenziale cui sono esposti i consumatori attraverso la catena alimentare. In particolare sono stati affrontati i problemi relativi alla contaminazione degli alimenti di origine animale (latte, formaggi, carni), senza però sottovalutare la possibilità che, attraverso la contaminazione ambientale, anche acqua e vegetali possano contenere Map. Sono quindi stati presi in rassegna i risultati di studi sull'efficacia delle tecnologie di trasformazione applicate al latte (pastorizzazione, bactofugazione, alta pressione), alla carne (cottura) e alle acque (clorazione), concludendo che le tecnologie applicate potrebbero non essere completamente efficaci nel distruggere Map, come anche testimoniato dalla presenza di Map vivo e vitale in una piccola percentuale di latte pastorizzato del commercio. L'intervento è terminato insistendo sulla necessità di ridurre la prevalenza di Map negli allevamenti, limitando in tal modo la contaminazione della catena alimentare, come anche raccomandato da una Opinione della Comunità Europea sul possibile rapporto tra Map e Malattia di Crohn. Si è inoltre sottolineata l'importanza di sviluppare nuovi test diagnostici rapidi, in grado di rilevare e quantificare la presenza di cellule batteriche di Map "vive" negli alimenti.

Il Prof. **Attilio Giacosa**, Direttore del Dipartimento di Gastroenterologia e Nutrizione del Policlinico di Monza, ha introdotto gli aspetti clinici ed epidemiologici della Malattia di Crohn, una patologia umana nota già agli inizi del secolo precedente. Il Prof. Giacosa ha sottolineato i parallelismi tra Malattia di Crohn nell'uomo e Paratubercolosi nei ruminanti, in particolare la morfologia delle lesioni intestinali cronicizzanti e l'andamento clinico delle due patologie. L'eziopatogenesi della Malattia di Crohn sembra essere di tipo multifattoriale, legata alla presenza di particolari polimorfismi a carico di geni che regolano l'immunità cellulare. L'ipotesi avanzata è che, in presenza di tali polimorfismi, batteri a spiccata localizzazione intestinale, come appunto Map, possano dare luogo a una infiammazione cronica. Il Prof. Giacosa ha terminato il suo intervento discutendo le evidenze sperimentali che supportano l'ipotesi di un coinvolgimento del MAP nello sviluppo del Morbo di Crohn, in particolare la presenza di positività alla PCR in una proporzione significativamente maggiore di pazienti con Malattia di Crohn rispetto ai controlli.

La chiusura della mattinata è stata affidata al Prof. **Leonardo Sechi**, dell'Università di Sassari, che rappresenta un punto di riferimento per i suoi studi sul possibile coinvolgimento di Map nella Malattia di Crohn e in altre patologie su base immunitaria, come il diabete tipo I. Il Prof. Sechi ha illustrato studi di metanalisi, da cui appare evidente l'associazione tra Map e Malattia di Crohn, dato che le probabilità di trovare MAP in pazienti affetti da Malattia di Crohn è circa 7 volte superiore rispetto ad individui non affetti da tale patologia. Quello che non è ancora chiaro è il ruolo del microorganismo nella patogenesi della malattia dell'uomo. Map è in grado di penetrare attraverso la parete intestinale attraverso gli enterociti e le cellule M e di diffondere ad altri distretti all'interno dei macrofagi, dove può sopravvivere attraverso meccanismi di inibizione della fagocitosi. Recenti pubblicazioni sembrano associare lo sviluppo del Morbo di Crohn a particolari polimorfismi sulla proteina SLC11A1, in precedenza denominata NRAMP1 (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1), prodotta dai macrofagi e coinvolta nei meccanismi di resistenza nei confronti del *Mycobacterium tuberculosis* attraverso la regolazione dei fenomeni di fagocitosi. Inoltre, polimorfismi dei geni che codificano per le proteine SLC11A1 e NOD2 mostrano una significativa associazione con lo sviluppo di morbo di Crohn. Il Prof. Sechi ha chiuso il suo intervento mostrando alcune evidenze sperimentali che suggeriscono come Map possa essere coinvolto, sulla base di alcune osservazioni cliniche, epidemiologiche e molecolari, anche con lo sviluppo del Diabete di tipo I, sulla base di meccanismi di similarità antigenica tra gli antigeni della proteina HSP65 prodotta da Map e delle cellule beta del pancreas. Tutte queste patologie sono in aumento nella popolazione umana, in parallelo ad un aumento della paratubercolosi nei ruminanti (in Sardegna il 43% degli allevamenti ovini risultano infetti), anche se questo di per sé non significa che tra i due eventi ci sia necessariamente un nesso di causalità.

Nel pomeriggio sono stati affrontati temi di pertinenza veterinaria, relativi alla diffusione e al controllo della Paratubercolosi in Italia ed in Europa. In particolare la Dott. **Norma Arrigoni** ha fatto una disamina dei motivi che impongono interesse al problema, a partire dall'elevata diffusione di infezione (stimata in Europa intorno al 50% degli allevamenti), ai danni economici rilevanti che questa arreca agli allevamenti, alla difficoltà nel controllo a breve termine, alla notevole resistenza di Map agli agenti fisici e chimici, all'assenza di presidi terapeutici e vaccinali adeguati, alla possibilità di contaminazione della catena alimentare. Per tutti questi motivi alcuni paesi europei hanno messo in atto una serie di misure volte in alcuni casi a conoscere la prevalenza di infezione, in altri a limitare la prevalenza di infezione negli allevamenti infetti, oppure ad eradicare l'infezione. In particolare sono stati presentati il *piano danese*, in atto dal 2006, a cui aderiscono circa il 30% delle aziende e circa il 40% degli animali. Il piano danese, i cui costi sono a carico degli allevatori, ha come scopo quello di ridurre la prevalenza di infezione negli allevamenti di bovine da latte, limitando in tal modo i danni economici associati, e prevede un intenso coinvolgimento degli allevatori, con piani di formazione e informazione serrati. Il piano danese si basa sulla gestione differenziata dei singoli animali, in relazione al rischio di infezione, valutato sulla base della successione degli esiti dei test sierologici trimestrali, eseguiti sul latte dei singoli animali. La gestione del rischio presuppone una serie di misure igienico-sanitarie, non sempre rispettate dagli allevatori, con conseguente riduzione dell'efficacia del piano. Uno dei punti critici è che il commercio degli animali positivi si indirizza verso altri allevamenti, anche appartenenti al nostro paese, con conseguente tendenza alla diffusione dell'infezione.

E' stato quindi illustrato il piano olandese, il cui obiettivo principale è quello di ridurre la contaminazione della catena alimentare a livelli inferiori a 10^3 UFC/l, soglia oltre la quale la pastorizzazione potrebbe non essere efficace. Per far questo, il latte dei singoli animali viene sottoposto annualmente a test ELISA e gli animali positivi devono essere eliminati dall'allevamento. Da rilevare che dal 1.1.2010 il piano è diventato obbligatorio per tutti gli allevamenti da latte olandesi ed è previsto che dal 1.1.2011 il latte venga prodotto solo da animali negativi. Altri paesi adottano misure più o meno restrittive (Austria, Francia, Belgio, Spagna). A conclusione è stato ribadito che un intervento deve partire da una stima di prevalenza e deve prevedere due percorsi paralleli, uno per gli allevamenti infetti ed uno per gli allevamenti indenni, i cui costi devono essere sostenuti da parte dei beneficiari (allevatori, industria lattiero-casearia), in funzione dello scenario che si andrà delineando in merito all'ipotesi zoonosica.

Il Dott. **Davide Barchi**, Responsabile Servizio Produzioni Animali presso la Direzione generale Agricoltura della Regione Emilia-Romagna, ha introdotto la sua relazione sottolineando l'importanza di conoscere lo stato di diffusione dell'infezione nell'allevamento e del conseguente mancato reddito. Le scelte gestionali dell'allevatore devono derivare da un apposito programma nel quale siano chiari obiettivi e metodi, sotto la guida di un professionista (veterinario aziendale riconosciuto) competente e responsabile della progettazione e della attuazione del programma.

Il Dott. Barchi ha quindi elencato le possibilità di contributi per l'allevatore che voglia intraprendere un cammino di risanamento. In particolare il Regolamento (Ce) N. 1974/2006 (Disposizioni di applicazione del Reg. (Ce) N. 1698/2005 con successive modifiche), prevede apposite misure per la formazione professionale, la consulenza aziendale e l'ammmodernamento delle aziende agricole. Inoltre sono state prese in rassegna la Legge Regionale 11 agosto 1998, n. 28 e la Legge Regionale 7 aprile 2000, n. 24 che prevedono fondi per ricerca, sperimentazione e assistenza tecnica.

La tavola rotonda aveva come tema "Esperienze e iniziative italiane: piani di controllo, certificazione ed indagini epidemiologiche".

In particolare:

- nel settore "Indagini epidemiologiche e di prevalenza" sono intervenuti Katia Capello (IZSVE), Luigi De Grossi (IZSLT), Piermario Mangili (IZSUM).
- nel settore "Indagini sulla fauna selvatica" è intervenuta Alessandra Gaffuri (IZSLER).
- nel settore "Piani di certificazione" sono intervenuti Giancarlo Bertola (ASL MONDOVI', CN), Claudio Bovera (ASL LODI) e Ludovica Bonvicini (ASL MILANO).
- nel settore "Interventi per il controllo" sono intervenuti Nicoletta Colombo (SATA MI/LO) e Nicola Pozzato (IZSVE) e Andrea Beltrami (veterinario libero professionista, Reggio Emilia).

I vari relatori hanno portato le loro esperienze, che sono state illustrate e ampiamente discusse.

Il Dott. **Marco Tamba** ha quindi illustrato le attività in previsione in Regione Emilia-Romagna per il controllo della Paratubercolosi per l'anno 2011. E' infatti in fase di studio un Piano regionale di durata triennale, con valutazione annuale dei risultati ottenuti ed eventuale riprogrammazione delle attività.

Il Piano vuole sensibilizzare gli allevatori alla gestione della problematica connessa alla Paratubercolosi:

- definendo lo stato di infezione degli allevamenti;
- fornendo delle indicazioni operative per il controllo dell'infezione negli allevamenti infetti;
- valorizzando le produzioni degli allevamenti negativi o a bassa probabilità di infezione;
- limitando il rischio di presenza di Map nel latte.

Nel primo anno di esecuzione del piano verrà svolta un'indagine su tutto il patrimonio bovino da latte della Regione, con lo scopo di valutare la presenza di infezione paratubercolare negli allevamenti. Lo strumento utilizzato sarà l'esame sierologico mediante ELISA sul latte di massa, prelevato dai Servizi Veterinari delle AUSL contestualmente al prelievo per Brucellosi e Leucosi. A seconda del risultato della fase 1, gli allevatori saranno invitati, su base assolutamente volontaria, ad aderire a due diversi approcci al controllo della malattia, rispettivamente Controllo (nel caso di positività ad almeno uno dei campioni) o Certificazione (in caso di negatività a tutti i campioni).

Nel primo caso, verrà consigliato all'allevatore di eseguire prelievi individuali per la stima della prevalenza intra-aziendale e di seguire un piano di controllo, secondo le linee guida già predisposte dal CRN, individuando un Medico Veterinario referente.

Nel secondo caso, verrà proposto all'allevatore di partecipare al Piano di certificazione per gli allevamenti negativi, che prevede, per il primo anno, il prelievo randomizzato da 30 capi adulti. Il piano Certificazione, già applicato in Provincia di Lodi e Milano, è pubblicato sul sito del CRN e sarà gestito dalle rispettive Ausl.

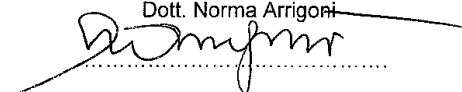
Per permettere la diffusione e la maggior adesione possibile al piano, sarà necessario svolgere un'intensa attività di formazione rivolta sia agli allevatori, sia ai Veterinari (Ufficiali e Liberi professionisti). E' in corso di valutazione la produzione di materiale informativo rivolto agli allevatori, da distribuire unitamente al riepilogo dei risultati dei test diagnostici eseguiti nella fase 1. I Medici Veterinari che saranno coinvolti nei "Piani di certificazione" e "di controllo" dovranno essere formati mediante un corso specifico organizzato dal CRN.

Il Dott. **Luigi Ruocco**, rappresentante del Ministero della Salute, ha infine concluso il convegno rimarcando i motivi di preoccupazione, dovuti al continuo aumento di prevalenza di infezione negli allevamenti zootecnici, alla gravità dei danni economici per gli allevatori, alla possibilità di contaminazione della catena alimentare. Ha sottolineato la necessità di una riflessione seria a tutti i livelli, con il coinvolgimento del mondo della ricerca, dei produttori, delle associazioni, per concordare le strategie future che inevitabilmente dovranno passare attraverso la formazione e il coinvolgimento degli allevatori e dei veterinari, sia pubblici che privati.

Gariga di Podenzano (PC), 11.11.2010

Il Responsabile Scientifico

Dott. Norma Arrigoni



- Sono stati predisposti, su specifica richiesta del Ministero della Salute, il programma e la documentazione per l'accreditamento ECM del V Convegno Nazionale sulla Paratubercolosi, dal titolo "Paratubercolosi: prospettive per la sanità animale e per la salute pubblica", organizzato dal Centro di Referenza Nazionale sulla Paratubercolosi, in collaborazione con il Centro di Referenza nazionale per la Formazione (IZSLER Brescia) e il Ministero della Salute. Responsabile scientifico del convegno è la Dr.ssa Arrigoni del CRN. Il convegno si svolgerà a Roma, presso l'Auditorium del Ministero della Salute, il 10 novembre 2011.

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

- Gruppo di lavoro Ministeriale sulla Paratubercolosi, riunitosi a Roma, presso il Ministero della Salute, in data 12 aprile e 16 maggio 2011 per discutere sia delle iniziative di formazione (realizzazione di un convegno nazionale a Roma presso il Ministero in novembre 2011) che di monitoraggio e intervento a livello nazionale.
- Gruppo di lavoro regionale sulla Paratubercolosi per la realizzazione di un piano di monitoraggio e intervento a livello di Regione Emilia Romagna.
- Comitato tecnico previsto dal Programma volontario di Certificazione per la Paratubercolosi bovina nella province di Lodi e Milano.
- Gruppo di lavoro inter-regionale per l'esportazione di formaggi DOP, che si è riunito presso la Regione Lombardia in data 20.5.2011 e 28.7.2011. Tale gruppo, di cui fanno parte i Servizi Veterinari delle Regioni, Assolatte e i vari Consorzi di tutela dei formaggi DOP, ha l'obiettivo di mettere in campo iniziative atte a fornire dati sperimentali sulla sopravvivenza di Map all'interno delle varie tipologie di formaggi. Questo si è reso necessario a fronte della stipula di accordi commerciali tra il nostro Paese e Paesi terzi, come l'India, che chiedono garanzie sul fatto che i trattamenti tecnologici cui sono sottoposti i prodotti siano sufficienti ad inattivare Map. In collaborazione con il Reparto di Microbiologica Alimenti dell'IZSLER di Brescia, sono quindi stati messi a punto dei programmi di contaminazione e caseificazione sperimentale dei vari prodotti. Il CRN ha preparato i ceppi di campo e i ceppi ATCC necessari per gli inoculi sperimentali del latte destinato ad essere trasformato nelle varie tipologie di formaggi. Le prime prove di contaminazione sperimentale del latte sono state avviate nel settembre 2011.
- Gruppo di lavoro promosso dalle industrie lattiero-casearie associate ad Assolatte, per la realizzazione di monitoraggi e interventi di controllo sulla paratubercolosi, che si è riunito a Milano, presso la sede di Assolatte in data 7.4.2011 e 18.5.2011. Questo si è reso necessario a fronte della stipula di accordi commerciali tra il nostro Paese e Paesi terzi, come la Cina, che chiedono garanzie sul fatto che negli allevamenti destinati alla produzione del latte utilizzato per la caseificazione non si siano verificati casi clinici di paratubercolosi, da certificare ad opera dei Servizi veterinari delle ASL. Assolatte ha deciso di iniziare ad effettuare un monitoraggio

sul latte di massa delle aziende conferenti a varie industrie di trasformazione, previo invio di una nota informativa ai Servizi Veterinari della Regione Lombardia.

Consulenze, attività di docenza, collaborazioni nazionali

1) Consulenze richieste ad esterni

- Nulla da segnalare.

2) Consulenze e pareri tecnici forniti ad esterni

- Il CRN ha realizzato uno stage formativo della durata di tre giorni (28 - 30 gennaio 2011) per un tecnico dell'Istituto Zooprofilattico di Catanzaro, per l'utilizzo delle metodiche colturali e PCR nella diagnosi della paratubercolosi.
- Il CRN ha ospitato per la durata di 11 mesi un tirocinante della Facoltà di Scienze matematiche, fisiche e naturali (Corso di laurea specialistica in biotecnologie industriali) che ha realizzato una tesi di laurea dal titolo "Sub-tipizzazione molecolare di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e risoluzione di marcatori Short Sequence repeats con una nuova metodica basata su High Resolution Melting Analysis".
- Al CRN sono afferite numerose richieste telefoniche o via posta elettronica, da parte di altri IIZZSS, per chiarimenti sulle metodiche diagnostiche e sulla gestione del problema in allevamento.
- Al CRN sono pervenute numerose richieste di chiarimento sull'interpretazione dei dati diagnostici e sulla gestione del problema in allevamento, da parte di veterinari liberi professionisti e AUSL di varie regioni italiane.

3) Attività di docenza

L'attività di docenza realizzata nel corso dell'anno è documentata al punto Aggiornamento e formazione professionale (Corsi che il C. d. R. ha organizzato o a cui ha partecipato, Convegni/congressi che il C. d. R. ha organizzato o a cui ha partecipato).

Consulenze e collaborazioni europee

- Il CRN è stato incluso tra le UO di un progetto Europeo EMIDA dal titolo "Assessment of intervention strategies for bovine paratuberculosis" (PARATB-POLICIES), (capofila: Dr. N. Pozzato, IZS Venezia). Le Unità Operative coinvolte sono:
 - IZSLER Piacenza, CRN Paratubercolosi (I)
 - F.Loeffler Institut di Jena (D)
 - Institut National de la Recherche Agronomique, INRA (F)
 - Turingian Animal Health Service (D)
 - ONORIS-INRA (F)
 - Neiker (E)
 - Università di Sassari (I)
 - GODIAGNOSTICS (I)

La proposta è stata inoltrata nel settembre 2011; il progetto è in attesa di valutazione.

- Collaborazione con il Moredun Research Institut di Edimburgo (UK), referente Dr. K.Stevenson, a cui il CNR ha inviato ceppi di campo che verranno utilizzati presso il Moredun Research Institut per studi epidemiologici.

Consulenze e collaborazioni internazionali

Nulla da segnalare.

Pubblicazioni scientifiche e divulgative

SCIENTIFICHE

Vedi All. 5 (copia del frontespizio).

1. Ricchi M, Barbieri G, Belletti GL, Pongolini S, Carra E, Garbarino CA, Cammi G, Arrigoni N (2010): Sub-tipizzazione molecolare di Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis mediante High-Resolution Melting DNA Analysis e sonde non marcate. XII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.- Genova, 27-29 ottobre,108-109.
2. Ricchi M, Barbieri G, Cammi G, Garbarino CA, Arrigoni N. High-resolution melting for analysis of short sequence repeats in Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. FEMS Microbiol Lett 323 (2011) 151–154. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2011.02371.x
3. Ricchi M, Barbieri G, Taddei R, Belletti GL, Carra E, Cammi G, Garbarino CA, Arrigoni N. Effectiveness of combination of Mini- and Microsatellite loci to sub-type Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Italian type C isolates. BMC Vet Res. 2011 Sep 19;7(1):54. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21929793. DOI:10.1186/1746-6148-7-54
4. Pozzato N, Capello K, Comin A, Toft N, Nielsen SS, Vicenzoni G, Arrigoni N (2011): Prevalence of paratuberculosis infection in dairy cattle in Northern Italy. Prev Vet Med. 2011 Oct 1;102(1):83-6. Epub 2011 Jul 31

DIVULGATIVE

“Paratubercolosi nell’allevamento della bovina da latte”
http://www.izsler.it/izs_bs/allegati/1574/Pieghevole_Paratubercolosi.pdf

Sito Web

All’interno del sito dedicato sono disponibili le informazioni relative alla malattia, i manuali per il controllo e i piani di certificazione.

Nell’anno in corso è stato pubblicato sul sito un depliant divulgativo dal titolo “Paratubercolosi nell’allevamento della bovina da latte”, destinato ad allevatori e veterinari.

Nell’anno in corso è stata inoltre attivata una piattaforma interattiva con cui è stato gestito il ring test per la diagnosi diretta, organizzato ad inizio 2011.

Il Responsabile del Centro di Referenza Nazionale per la Paratubercolosi
Dott. Norma Arrigoni