



RELAZIONE ANNUALE

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

(Periodo: dal 01.10.2017 al 30.09.2018)

Centro di Referenza Nazionale (C.R.N.) Paratubercolosi Relazione sulla attività svolta dal 01.10.2017 al 30.09.2018

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 dei vari Istituti Zooprofilattici (II.ZZ.SS) l'elenco dei metodi di prova, validati ed emessi in qualità, tramite accesso ad un link indicato all'interno del sito dello stesso C.R.N.

Nel periodo considerato non risultano richieste da parte degli IZZSS di copia dei vari metodi di prova e/o delle schede relative ai terreni utilizzati nelle prove batteriologiche.

E' frequente la richiesta di consulenza su problemi specifici riguardanti gli aspetti diagnostici.

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

2) Produzione e distribuzione di reagenti

All'interno della Biobanca centralizzata IZSLER sono stoccati:

- Campioni di sieri positivi e negativi (ELISA e/o AGID) liofilizzati;
- Campioni di latte positivi e negativi, liofilizzati;
- Ceppi batterici tipizzati mediante metodica molecolare, appartenenti alle specie:
 - *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP);
 - *Mycobacterium porcinum* (agente di false positività in PCR-IS900 per MAP).

Sono inoltre a disposizione presso il C.R.N. altri materiali, necessari alla validazione dei metodi di prova, quali:

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

Nel periodo considerato sono stati inviati:

- sieri di bufalo positivi e negativi all'IZS di Viterbo, per la validazione interna del MP ELISA (data invio 27.3.2018)
- sieri bovini di campo positivi e negativi all'IZS di Pavia per la validazione interna del MP ELISA (data invio 30.9.2018).
- sieri bovini di campo positivi e negativi all'IZS di Lodi per la validazione interna del MP ELISA (data invio 30.8.2018).

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 101 campioni da vari IZZSS, in particolare:

- 1 conferimento di 22 ceppi batterici dall'IZSPLV per conferma diagnostica e caratterizzazione;
- 9 conferimenti di 67 campioni di siero di bufalo per analisi sierologica da IZSUM;
- 2 conferimenti di 12 campioni di siero bovino per analisi sierologica da IZSLT.

Considerando l'intera attività analitica, nel periodo di riferimento si è osservato, rispetto all'anno precedente, un significativo aumento dell'attività diagnostica (+11%), indirizzata principalmente alla diagnosi sierologica nella specie bovina, su campioni ricevuti da AUSL e privati.

Sui campioni pervenuti sono stati eseguiti complessivamente 46.338 esami, di cui:

	Non ufficiali	Ufficiali	Totale
PCR	2424	351	2775
Coltura	451	99	550
Esami sierologici ELISA	32644	10369	43013
Totale	35519	10819	46338

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).

Da segnalare che, con l'adozione delle nuove linee guida sulla paratubercolosi (novembre 2013), il test PCR dalle feci degli animali sospetti clinici è diventato il test di conferma, ai fini della segnalazione dei casi clinici al Servizio Veterinario dell'ASL di competenza.

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

E' stato organizzato dal C.R.N. un circuito interlaboratorio per la diagnosi sierologica (ELISA e/o AGID) su siero bovino, latte bovino e siero bufalino, a cui hanno aderito 43 laboratori appartenenti a 10 II.ZZ.SS.

I campioni sono stati spediti il 2.10.2018, con scadenza prevista per la restituzione dei risultati 26.10.2018.

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

Il C.R.N. ha provveduto alla pubblicazione sul sito IZSLER, nella sezione dedicata, dei seguenti documenti:

- tabella per la decodifica dei risultati entro 7 giorni dalla scadenza del ring test, al fine di provvedere prontamente alla correzione di eventuali non conformità;

- report completo entro 30 giorni dalla scadenza.

I risultati confermano un'ottima accuratezza dei laboratori partecipanti sui panel di siero bovino e di latte bovino, con entrambi i kit utilizzati sul territorio nazionale (IDEXX e ID VET). Al contrario si osservano differenze significative di sensibilità tra i laboratori partecipanti, legate all'utilizzo di un kit non idoneo (IDEXX) per l'analisi della matrice siero bufalino; a questo problema alcuni laboratori hanno ovviato con l'utilizzo di un coniugato specifico, fornito dalla ditta produttrice, raggiungendo un'accuratezza ottima.

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

Il C.R.N. ha partecipato a:

- 1 prova interlaboratorio (maggio 2018), organizzata a livello europeo, per esame sierologico su siero di sangue bovino mediante ELISA (Ente organizzatore: GD Animal Health – Deventer, NE). I risultati sono stati corretti nel 100% dei casi.
- 1 prova interlaboratorio (maggio 2018), organizzata a livello europeo, per esame sierologico su latte bovino mediante ELISA (Ente organizzatore: GD Animal Health – Deventer, NE). I risultati sono stati corretti nel 100% dei casi.
- 1 prova interlaboratorio (febbraio 2018), organizzata a livello europeo, per coltura e PCR su feci (Ente organizzatore: QA Veterinary Laboratory Agency - UK). I risultati sono stati corretti nel 100% dei casi.
- 1 prova interlaboratorio (agosto 2018), organizzata a livello europeo, per coltura e PCR su feci (Ente organizzatore: QA Veterinary Laboratory Agency - UK) (risultati non ancora pervenuti).

Epidemiologia

1) Creazione banca dati

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

2) Sviluppo e gestione di sistemi informativi

A seguito dell'adozione delle Linee guida sulla paratubercolosi, è stata implementata all'interno del Sistema Informativo Veterinario (<https://www.vetinfo.sanita.it/>) la funzionalità per la gestione informatica delle attività previste dalle Linee Guida, in particolare per la registrazione di:

- casi clinici, ai fini della certificazione per l'esportazione nei Paesi terzi che richiedono l'assenza di casi clinici;
- qualifica sanitaria assegnata all'allevamento nella Anagrafe Bovina (BDN).

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

Relazione annuale 2017-2018 Centro di Referenza Nazionale Paratubercolosi - Documento prodotto in originale informatico e firmato digitalmente ai sensi del "Codice dell'amministrazione digitale" (Decreto legislativo n.82/2005)

3.a. Linee guida (nazionali) per l'adozione di Piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria degli allevamenti nei confronti della paratubercolosi bovina

Le "Linee guida per l'adozione di Piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria degli allevamenti nei confronti della paratubercolosi bovina", approvate in Conferenza Stato Regioni il 17 ottobre 2013 (G.U. 19.11.2013), prevedono la segnalazione obbligatoria dei casi clinici di Paratubercolosi e l'adesione volontaria ad un sistema di classificazione del rischio, basato sugli esiti di esami sierologici eseguiti secondo protocolli codificati.

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

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

Viene inoltre riportato il riferimento al relativo documento di recepimento.

Regione	Riferimento
Abruzzo	Determinazione n. DG 21/206 del 21.11.2013
Basilicata	Deliberazione della Giunta Regionale 17 novembre 2015, n. 1476
Calabria	Decreto del Commissario ad Acta n.47 del 21/05/2015
Campania	Deliberazione della Giunta Regionale n. 657 del 30/12/2013
Emilia-Romagna	Deliberazione della Giunta Regionale N. 2100 del 30/12/2013
Friuli Venezia Giulia	Deliberazione della Giunta regionale N. 916 del 15/05/2015
Lazio	Decreto del Commissario ad acta n. U00109 del 28/03/2014 Determinazione N. G02603 del 13/03/2015, Proposta n. 3168 del 05/03/2015 Linee guida Regionali per l'adozione di piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria degli allevamenti bovini e bufalini nei confronti della paratubercolosi.
Liguria	Deliberazione della Giunta Regionale n. 644 del 30/05/2014
Lombardia	DDGN N°6845 del 18/07/2013 Piano regionale di controllo e certificazione nei confronti della paratubercolosi bovina
Piemonte	Deliberazione della Giunta Regionale n. 15-7093 del 10/02/2014
Marche	Deliberazione della Giunta Regionale n. 116 del 3/10/2016
Molise	Decreto della Giunta regionale n.66 del 5.12.2016
Puglia	Deliberazione della Giunta Regionale n. 2567 del 30/12/2013
Sardegna	Deliberazione della Giunta Regionale N. 27/10 del 15.7.2014
Sicilia	Decreto Assessoriale 23/02/2015
Toscana	Deliberazione della Giunta Regionale n. 1103 del 16/12/2013
Trentino-Alto Adige	Provincia di Trento: Deliberazione n. 2702 del 20/12/2013 Provincia di Bolzano: Decreto N. 31.12/514378 DEL 15/12/2014 Piano di controllo nei confronti della paratubercolosi in Provincia di Bolzano.
Umbria	Deliberazione della Giunta Regionale n. 819 del 7 luglio 2014
Valle d'Aosta	Deliberazione della Giunta Regionale n. 14 del 10/1/2014
Veneto	Deliberazione della Giunta Regionale n. 2836 del 29/12/2014, ALLEGATO C Piano di miglioramento dello stato sanitario negli allevamenti della Regione Veneto nei confronti della paratubercolosi.

Da rilevare che:

- 2 Regioni hanno recepito le linee guida limitatamente alla segnalazione dei casi clinici (Provincia di Bolzano - con indennizzo - e Veneto).
- Tutte le altre Regioni hanno recepito integralmente le linee guida.

Tra le criticità della applicazione delle Linee Guida nazionale segnaliamo:

1. La sottonotifica dei casi clinici (vedi punto 4.b di questa relazione), in relazione ai dati di prevalenza elevata stimata sul territorio nazionale (vedi punto 4.a di questa relazione). Questo potrebbe essere, almeno parzialmente, dovuto al fatto che gli allevatori tendono ad anticipare la macellazione dei capi positivi, in particolare quelli con elevati valore S/P, prevenendo la comparsa dei sintomi clinici. Da rilevare inoltre che la ridotta vita produttiva della vacca da latte contribuisce a mascherare la reale situazione, dato che il picco dei casi clinici si manifesta tra i 4 e i 5 anni di età.
2. Il basso livello di applicazione delle linee guida dove l'industria lattiero-casearia non supporta l'applicazione di piani di controllo e certificazione. In assenza di supporto e stimolo da parte dell'industria, solo gli allevatori più motivati e con specifici interessi commerciali aderiscono al *Piano volontario per l'assegnazione della qualifica sanitaria degli allevamenti nei confronti della paratubercolosi bovina*".
3. Coinvolgimento delle associazioni di allevatori
Attualmente i test diagnostici (sierologia ELISA) per paratubercolosi, oltre che dagli II.ZZ.SS, sono eseguiti anche da APA/ARA sul latte dei controlli funzionali in diverse Regioni. Questi test non sono validi per l'assegnazione delle qualifiche, ma possono essere utilizzati nell'ambito dei piani di gestione sanitaria a determinate condizioni:
 - Il servizio di analisi deve essere accompagnato da un servizio di assistenza in azienda, per l'interpretazione e l'utilizzo del dato di analisi. Da sottolineare che questi esiti potrebbero contrastare con i dati dell'AUSL, soprattutto a causa della diversa matrice analizzata. L'APA esegue infatti i test sul latte, mentre i controlli ufficiali sono effettuati prevalentemente sul siero. E' noto che latte e siero sono sovrapponibili come sensibilità, ma potrebbero non essere contemporaneamente positivi, raggiungendo il picco di sensibilità in momenti diversi della lattazione. La presenza di esiti discordanti può creare confusione e demotivare l'allevatore e necessita quindi di un supporto interpretativo;
 - l'AUSL dev'essere a conoscenza dell'utilizzo di questo servizio da parte dell'allevatore e dell'esito positivo dell'analisi con relativa matricola dell'animale. Questo per evitare la commercializzazione di animali infetti e l'attribuzione di qualifiche sulla base di dati incompleti.
 - i laboratori devono essere accreditati. Il C.R.N. può organizzare un ring test specifico per le ARA che eseguono l'analisi, in caso di necessità e su specifica richiesta.
4. La presenza di sospette, seppur rare, false positività ai test sierologici ELISA utilizzati per l'assegnazione delle qualifiche sanitarie. La scelta di questa strategia è stata basata sull'economicità e sulla conseguente sostenibilità economica del sistema e sulla dichiarata specificità media del test (98-99%). Tuttavia, alcune segnalazioni di positività in allevamenti precedentemente negativi, in assenza di introduzione di animali e con esito negativo ai test di conferma in PCR su feci, fanno pensare che le

false positività siano più frequenti di quanto atteso. Inoltre, in letteratura si segnalano reazioni falsamente positive a causa di sensibilizzazione per avvenuta prova tubercolinica nei 3 mesi precedenti il prelievo.

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

Per ovviare a queste criticità, il C.R.N. ha elaborato una proposta di modifica/integrazione delle Linee Guida Nazionali, che ha trasmesso al Ministero in data 9.10.2018 con prot. 30699.

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

- Art.1.d. E' stata eliminata la possibilità di utilizzo dei campioni di latte per l'attribuzione della qualifica sanitaria, data la minore robustezza del dato riscontrato sul latte rispetto al dato riscontrato sul sangue. Il test sierologico sul latte infatti risulta maggiormente influenzato dallo stadio di lattazione, risultando meno sensibile e ripetibile rispetto al dato sul sangue. Si conferma peraltro la possibilità di utilizzo del latte per l'applicazione di piani di autocontrollo aziendali.
- Art. 3. Data la sottonotifica evidente dei casi clinici, si è introdotta la raccomandazione di effettuare visite cliniche periodiche negli allevamenti per la rilevazione dei segni tipici della malattia. Allo stesso scopo si chiede alle Regioni una verifica sull'attuazione della sorveglianza al macello nelle strutture che macellano più di 1000 capi all'anno (art. 6).
- Allegato 2. Sono state introdotte alcune modifiche sostanziali ai criteri di attribuzione delle qualifiche sanitarie. In particolare:
 - per l'attribuzione della qualifica si è ritenuto di sostituire il prelievo campionario (S1) con il prelievo di tutti i capi di età superiore a 36 mesi (S2). L'approccio secondo il protocollo S1 era stato introdotto inizialmente per limitare gli oneri a carico degli aderenti, ma si ritiene che l'applicazione del protocollo S2, già peraltro applicato volontariamente dalla maggior parte degli allevamenti, essendo più sensibile, eviti la comparsa di positività inattese in fasi successive, che potrebbero demotivare l'allevatore, causando la perdita della qualifica e l'uscita dal piano. Per il mantenimento della qualifica è stato mantenuto il protocollo S1.
 - Per tutte le qualifiche (invece che per i soli livelli PT3-PT5 come previsto da versione originale delle Linee guida) è stata prevista la possibilità per l'allevatore di richiedere una conferma diagnostica dei capi sieropositivi mediante PCR dalle feci, purché la sieroprevalenza risulti inferiore al 3%. Questo ha lo scopo di chiarire e approfondire i casi di sospette false positività dei test sierologici (comparsa di sieropositività in allevamenti ripetutamente negativi o a bassissima prevalenza). La comparsa di positività in allevamenti precedentemente ripetutamente negativi ha infatti costituito una causa di

abbandono del piano da parte di alcuni allevamenti. La conferma mediante PCR di almeno un campione comporta la conferma della presenza di infezione in allevamento; in questo caso tutti i capi sieropositivi sono considerati infetti anche se negativi alla PCR.

- La conferma mediante PCR è prevista solo in caso di applicazione del protocollo S2, sia per acquisizione che per mantenimento qualifica.
- Si è introdotta la raccomandazione di non eseguire i prelievi per le analisi sierologiche nei tre mesi successivi all'esecuzione della prova intradermica per la profilassi della tubercolosi, che potrebbe essere causa di reazioni falsamente positive.

Relativamente allo stato di applicazione delle qualifiche previste dalle Linee Guida, si riportano di seguito i dati relativi alle qualifiche presenti in BDN al 30.10.2018 per le singole Regioni.

<i>Regione</i>	<i>PTC</i>	<i>PT0</i>	<i>PT1</i>	<i>PT2</i>	<i>PT3</i>	<i>PT4</i>	<i>PT5</i>
<i>Abruzzo</i>				1			
<i>Basilicata</i>				3			
<i>Calabria</i>				1			
<i>Campania</i>		468					
<i>Emilia-Romagna</i>	10	5593	42	38	9	1	1
<i>Friuli Venezia Giulia</i>				2			
<i>Lazio</i>			1		1		
<i>Liguria</i>							
<i>Lombardia</i>	1	4513 (di cui 2825 PTEX1)	659	537	85	44	30
<i>Marche</i>	1	636	9	15			
<i>Piemonte</i>	7	8807	224	591			
<i>Molise</i>							
<i>Puglia</i>							
<i>Sardegna</i>		6613	54	109			
<i>Sicilia</i>	1	2274		337			
<i>Toscana</i>		4		2			
<i>Trentino AA-Bolzano</i>							
<i>Trentino AA-Trento</i>		143	97	988	76	2	
<i>Umbria</i>		1		1			
<i>Valle d'Aosta</i>				812			
<i>Veneto</i>	3	920		400			
TOTALE	22	29972	1086	3837	171	47	31

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.

Relazione annuale 2017-2018 Centro di Referenza Nazionale Paratubercolosi - Documento prodotto in originale informatico e firmato digitalmente ai sensi del "Codice dell'amministrazione digitale" (Decreto legislativo n.82/2005)

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’exportazione verso paesi terzi ed è stato redatto secondo le indicazioni comprese nelle Linee guida Nazionali.

L’assegnazione della qualifica sanitaria agli allevamenti avviene su richiesta dell’allevatore (richiesta di adesione al piano). Ricevuta la richiesta, i servizi veterinari della ASL effettuano una visita clinica in allevamento con cadenza annuale, in base alla quale viene assegnata la qualifica PTC o PTEX del piano lombardo. La qualifica PTEX corrisponde alla qualifica PT0 delle linee guida nazionali con l’azione aggiuntiva della visita clinica. La visita clinica non solo permette di individuare eventuali casi clinici non ancora notificati, ma rappresenta anche un’occasione di formazione e sensibilizzazione dell’allevatore.

La richiesta di una qualifica sanitaria volontaria (PT1, PT2, PT3, PT4 e PT5) avviene in seguito ad un’ulteriore istanza (richiesta di qualifica).

Nelle province di Cremona, Brescia e Bergamo, la sensibilizzazione e formazione/informazione con il coinvolgimento di ASL, veterinari liberi professionisti, IZS e industria di trasformazione hanno portato ad una buona adesione al piano.

Ad oggi hanno aderito al Piano 4.180 allevamenti, pari al 77.8% del totale di 5.375 allevamenti registrati in BDN. La percentuale di adesione sale al 94,5% se si considerano i 4.424 allevamenti attivi con almeno 20 capi.

Si osserva comunque un trend positivo degli allevamenti aderenti al piano (77,8% rispetto al 73.3% dell’anno precedente e al 65.0% di due anni prima).

Di questi, 2.825 hanno raggiunto la qualifica PTEX (assenza di casi clinici a seguito di una visita clinica in allevamento e assenza di segnalazioni nei precedenti 12 mesi), pari al 67.6% degli allevamenti aderenti al Piano e al 52,6% del totale.

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

Per quanto riguarda le qualifiche superiori:

- 659 allevamenti (15.8% degli aderenti e 12,3% del totale, in aumento rispetto al 13,9% degli aderenti e al 10.2% del totale dell’anno precedente) hanno raggiunto la qualifica PT1 (allevamenti a basso rischio);
- 537 (12,8% degli aderenti e 10,0% del totale, in aumento rispetto al 9.5% degli aderenti e al 6.9% del totale dell’anno precedente) hanno ottenuto la qualifica PT2 (allevamento negativo);
- 159 hanno ottenuto la qualifica di allevamento certificato, rispettivamente 85 allevamenti PT3, 44 allevamenti PT4 e 30 allevamenti PT5 (in aumento rispetto a 92 allevamenti dell’anno precedente).

Nel 2018 si osserva un trend positivo del numero di aziende che richiede e acquisisce le qualifiche rispetto agli anni precedenti (2014-2017). Questo risultato è stato ottenuto grazie al ruolo attivo delle ASL e di IZSLER, che hanno coinvolto i caseifici maggiormente

interessati all'export e organizzato incontri tra rappresentanti dell'industria di trasformazione, allevatori afferenti, veterinari ASL e liberi professionisti.

3.c Piano regionale di controllo e assegnazione delle qualifiche sanitarie nei confronti della Paratubercolosi bovina in Regione Emilia Romagna

La Regione Emilia-Romagna ha recepito integralmente le *Linee guida nazionali* approvate in Conferenza Stato-Regioni con la Delibera di Giunta n. 2100/2013, pubblicata sul Bollettino Ufficiale Regione Emilia-Romagna del 16 gennaio 2014.

Successivamente, con Determina del Responsabile del Servizio Veterinario e Igiene degli Alimenti n. 5302 del 16 aprile 2014, sono state date indicazioni operative ai servizi sull'applicazione del piano di controllo regionale. In tale atto era previsto che la Regione avrebbe chiesto a BDN l'assegnazione della qualifica PT0 (senza casi clinici) a tutte le aziende bovine con riproduttori, lasciando ai Servizi Veterinari ASL il compito di aggiornare la qualifica.

Nella tabella seguente è riportata la situazione delle qualifiche sanitarie registrate in BDN al 30/09/2018.

AUSL	Totale	PTC	PT0	PT1	PT2	Pt3	PT4	Pt5
	allevamenti	Con Casi Clinici	Senza Casi Clinici	A Basso Rischio	Negativo	Certificato	Certificato	Certificato
PIACENZA	635	0	571	32	14	3	0	0
PARMA	1285	4	1272	4	2	1	0	0
REGGIO EMILIA	1112	2	1092	2	5	2	0	0
MODENA	916	2	900	2	2	0	0	0
IMOLA	70	1	58	0	0	0	0	0
BOLOGNA	384	0	358	2	3	3	1	1
FERRARA	81	0	74	0	5	0	0	0
RAVENNA	128	0	122	1	0	0	0	0
FORLI'	167	0	165	0	0	0	0	0
CESENA	153	0	145	0	6	0	0	0
RIMINI	133	0	127	0	1	0	0	0
TOTALE	5773	9	4884	43	38	9	1	1

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

A differenza di altre regioni, dove per l'assegnazione della qualifica sanitaria il prelievo deve essere eseguito da veterinari AUSL, in Emilia-Romagna, seguendo le indicazioni regionali, il prelievo può essere eseguito anche da veterinari liberi professionisti, purchè l'invio al laboratorio IZS sia accompagnato dall'elenco delle marche auricolari.

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

La Regione Veneto ha recepito le *Linee Guida nazionali* limitatamente alla segnalazione dei casi clinici.

In Regione Veneto dal 2004 al 2009 sono state portate avanti iniziative su base volontaria con scarsa partecipazione.

Nel 2010-2012 sono state realizzate iniziative di formazione per i veterinari aziendali.

Nel 2013, con la DGR 1564 è stato approvato e realizzato un Piano Regionale di controllo della paratubercolosi bovina, in cui era previsto un monitoraggio mediante qPCR su latte di massa su tutti gli allevamenti da latte con almeno 30 animali in lattazione.

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

L'IZSVE fornisce consulenza alle aziende infette che vogliono intraprendere piani aziendali volontari di controllo ed ha predisposto delle Linee Guida per ridurre il rischio di contaminazione del latte nelle aziende infette, disponibili sul sito:

http://www.izsvenezie.it/images/stories/Pdf/Temi/LG_in_VET2_paratubercolosi.pdf

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

In Piemonte nel 2008 è stata data attuazione ad un Programma regionale con l'obiettivo di individuare criteri e protocolli di controllo della paratubercolosi, propedeutici all'emanazione di un piano regionale ad adesione volontaria per il controllo dell'infezione. Con la D.G.R. n. 15-7093 del 10/02/2014, la Regione Piemonte ha recepito le linee guida del Ministero della Salute, e successivamente sono state trasmesse alle ASL istruzioni operative in data 17/04/2014.

Sono state definite azioni aggiuntive rispetto a quanto previsto dalle Linee Guida Nazionali:

- il prelievo su sospetti clinici riscontrati al macello
- la visita clinica su tutti gli allevamenti da riproduzione (9.100 allevamenti circa) per l'assegnazione delle qualifiche sanitarie base (PT0/PTC).

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

Nel periodo ottobre 2017 – settembre 2018 i controlli per la qualifica e la certificazione hanno riguardato 878 allevamenti aderenti (9,65% di quelli attivi, con un incremento di circa il 30% del numero delle aziende aderenti rispetto al periodo precedente) che, sottoposti a campionamento mediante il protocollo previsto in funzione della qualifica sanitaria da attribuire o confermare, sono stati così classificati:

- 89 allevamenti PT0 (10,14% degli aderenti PT0) (sieroprevalenza >5%);
- 221 allevamenti PT1 (25,17% degli aderenti) (sieroprevalenza <5%);
- 499 allevamenti PT2 (56,83% degli aderenti) (sieronegativi);
- 55 allevamenti PT3 (6,26% degli aderenti);
- 14 allevamenti PT4 (1,60% degli aderenti).

Su 36.649 capi testati, 609 sono risultati sieropositivi e 54 dubbi (complessivamente pari all'1,81% dei controllati).

E' stata ancora confermata una situazione epidemiologica significativamente più favorevole negli allevamenti di piccole dimensioni. E' infatti risultato negativo all'accertamento diagnostico circa il 90% delle aziende controllate di consistenza fino a 50 capi, mentre in quelle con un numero di capi presenti superiore a 50 la percentuale di aziende negative corrisponde al 59,3%.

Per contro la sieroprevalenza media non è risultata molto diversa tra le due categorie di aziende (1,17% di positività media sui controllati nelle aziende fino a 50 capi e 1,88% in quelle con più di 50 capi).

Nel periodo considerato 16 allevamenti sono stati interessati da segnalazioni di sospetti clinici per un totale di 22 capi controllati con PCR, solamente 4 dei quali sono stati confermati. Al controllo sierologico negli allevamenti con casi clinici, la siero-prevalenza media è risultata del 2,85%.

Nelle aziende da carne è stata riscontrata una situazione più grave, in relazione alle maggiori difficoltà nell'applicazione delle misure di controllo ed al rischio elevato determinato dalla pratica dell'alpeggio.

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

A partire dal 2018, con l'adozione della Delibera della Giunta Provinciale n.33 del 18.1.2018, si passati da una attività di monitoraggio ufficiale su tutti gli allevamenti, alla adozione di un piano volontario, basato sul controllo a tappeto dei bovini di età superiore a 36 mesi (protocollo S2) mediante test ELISA su sangue. E' previsto inoltre il controllo in compravendita su capi di età superiore a 24 mesi destinati ad allevamenti aderenti al piano, mediante test sierologico su sangue. Queste modifiche hanno coinciso con il passaggio dal controllo individuale sul sangue per la profilassi relativa a brucellosi, leucosi e IBR all'analisi del latte di massa, con un significativo risparmio economico. Le "Linee guida nazionali per l'adozione di Piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria degli allevamenti nei confronti della paratubercolosi" non prevedono l'utilizzo del latte di massa per l'acquisizione e/o per il mantenimento delle qualifiche, ma solo l'analisi sierologica individuale.

La provincia autonoma di Trento, in collaborazione con l'IZSVE, ha anche eseguito nel corso del 2017 una prova sperimentale, analizzando in parallelo il sangue individuale e il latte di massa, adottando modifiche al test ELISA su latte di massa per concentrare gli anticorpi e aumentare la sensibilità del test su questa matrice, concludendo che comunque la sensibilità ottenuta per il test ELISA sul latte di non permetteva di rilevare gli allevamenti con prevalenza intra-aziendale inferiore al 5%, confermando i precedenti dati del CRN.

Sono inoltre previste limitazioni per lo spostamento in alpeggio dei capi positivi ai test diagnostici, a meno che non siano separati efficacemente dai capi di altri allevamenti.

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) e uno a quelli di vacche da carne

(http://www.izsler.it/izs_bs/allegati/443/Allegato%201_B_MANUALE_carne_Rev_1.pdf).

I Manuali ed il loro utilizzo sono stati illustrati nel corso di vari interventi pubblici e sono inseriti nelle "Linee guida per l'adozione dei piani di controllo e per l'assegnazione di della qualifica sanitaria nei confronti della paratubercolosi".

4) aggiornamenti epidemiologici sulle materie di competenza

4.a Raccolta di dati di diffusione di infezione sul territorio italiano

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

E' da rilevare che le prime 5 indagini mostrano una prevalenza di allevamenti infetti superiore perché la sensibilità della metodica di rilevazione adottata (ELISA su sangue individuale) è decisamente superiore rispetto a quella adottata nelle ultime due indagini, dove la metodica adottata (ELISA su latte di massa) consente la rilevazione solo degli allevamenti a prevalenza intra-aziendale medio-alta.

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

Regione	Anno	Prevalenza apparente aziende	Prevalenza apparente animali	Metodologia
Veneto	2002	64.6%	3.5%	ELISA individuale
Lombardia	2003-2005	43.7%	2.6%	
Lazio	2002	42.0%	2.5%	
Umbria e Marche	2008	52.8%	4.6%	
Trento	2012	17.7%	2.5%	
Piemonte	2007-2008	9.47%	N.D.	ELISA latte massa
Emilia-Romagna	2011-2012	14.5% (41.7% dei negativi erano positivi al test ELISA su 30 capi)	N.D.	

Relativamente al **patrimonio ovi-caprino**, si riportano di seguito i dati presentati in occasione del 7° Congresso nazionale sulla Paratubercolosi (novembre 2015), raccolti nell'ambito del Progetto PON_01-1841 EPISUD, in corso di pubblicazione.

Regione	Anno	Prevalenza apparente aziende	Prevalenza apparente animali	Metodologia
Puglia	2013-14	Ovi-caprine 60.5%	Ovini 3% (n:272408) Caprini 14.5%(n:51582)	

Sicilia	2013-14	Ovini 64.2% (n:293) Caprini 56.9% (n:144)	Ovini 4.4% (n:35.385) Caprini 3.6% (n:12.101)	ELISA individuale
---------	---------	--	--	----------------------

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

4.b Dati sui focolai

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

Regione	2014	2015	2016	2017	2018
Emilia-Romagna	1	1	1	6	10
Lombardia				1	1
Piemonte	7	7	2	11	7
Marche				1	1
Sardegna	2	2	2	2	
Sicilia				1	1
Toscana	1				
Trento	6	4	1		
Veneto					3
ITALIA	17	14	6	22	22

Fonte: SIMAN e BDN: Dati aggiornati al 30/10/2018

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

Ricerca e sperimentazione

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

Ricerca Corrente come Capofila

- Progetto di ricerca corrente IZS LE 2015/002: "Valutazione delle performances dei test sierologici per la diagnosi di Paratubercolosi nella specie bufalina" (Responsabile scientifico: N. Arrigoni). Il progetto ha avuto inizio il 1.10.2016 e terminerà il 31.03.2019 (prorogato). Il progetto parte dall'interesse della filiera lattiero-casearia bufalina nei confronti di questa problematica, dopo la richiesta di garanzie sanitarie da parte di alcuni paesi terzi (Cina, Russia ed India) nei confronti della paratubercolosi, per l'esportazione di prodotti lattiero-caseari derivati dal latte di

questa specie, in primis la “Mozzarella di Bufala Campana” (DOP). Il test ELISA è al momento il più utilizzato per il controllo della paratubercolosi ed è il test previsto dalle Linee Guida Nazionali per l’attribuzione delle qualifiche sanitarie agli allevamenti bovini e bufalini. I kit ELISA attualmente disponibili per la diagnosi di paratubercolosi non sono però adeguatamente supportati da dati robusti di validazione relativi alle performances dei test nella specie bufalina. Il progetto prevede la raccolta di campioni di siero di bufale positive e negative, sulla base dell’esito del test PCR da feci, considerato come riferimento per l’attribuzione dello stato di infezione dell’animale.

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

Sino ad ora, presso i laboratori del C.R.N, sono stati analizzati le feci, mediante qPCR, e il sangue, mediante test ELISA Id Vet, di 2276 animali, provenienti da 11 diversi allevamenti appartenenti a due regioni diverse, il Lazio (province di Frosinone, Latina e Roma) e la Campania (province di Caserta e Salerno), dove è massima la diffusione dell’allevamento bufalino.

Il *gold standard* raccomandato dal “Manuale dei test diagnostici e dei vaccini relativi agli Animali Terrestri dell’OIE” per la diagnosi in vivo della paratubercolosi è la coltura. Tuttavia, sebbene la specificità diagnostica, accoppiata alle prove identificative, sia prossima al 100%, la sensibilità di questo test è bassa. Inoltre, a causa dei lunghi tempi di incubazione, questo tipo di test è considerato poco adatto ad essere utilizzato come standard di riferimento nella convalida dei test indiretti. Per queste ragioni, alcuni ricercatori hanno proposto i test PCR come standard, dato che questi si sono rivelati essere sufficientemente sensibili e soprattutto molto rapidi, se paragonati all’esame colturale. Su questa base, si è deciso di confrontare la PCR e i test ELISA commerciali, diretti a target diversi, utilizzando un approccio a classi latenti, con lo scopo finale di determinare le performances, in termini di Sensibilità (Se) e Specificità (Sp) diagnostica, di entrambi i test.

I valori di Se e Sp stimati variavano sulla base del cut-off scelto per ciascuno dei due test (ELISA e qPCR) e vengono riportati nella tabella seguente:

cutoff		Se	Sp
PCR (cicli)	ELISA (S/P)		
36	0.6	51.8 (38 - 65.3)	97.3 (96.6 - 98)
36	0.7	50 (36.3 - 63.7)	97.5 (96.8 - 98.1)
38	0.6	44.3 (34.2 - 54.8)	97.9 (97.2 - 98.5)
38	0.7	42.3 (32.3 - 52.7)	98.1 (97.4 - 98.6)

Il modello potrà essere ulteriormente affinato, aggiungendo ulteriori dati e utilizzando informazioni a priori meno stringenti.

Si rileva che il grado di concordanza tra i due test, misurato con la K di Cohen, è stato di 0.384, risultando dunque scarso. Questo valore di concordanza tra i due test è legato a più fattori, tra i quali ricordiamo senz'altro il diverso target cui sono dirette le due metodiche (anticorpi nel sangue per la metodica ELISA, DNA nelle feci per la PCR).

La raccolta di dati di validazione robusti del test ELISA nella specie bufalina permetterà di elaborare dati di sensibilità e specificità, individuando valori di cut-off ottimali per la specie bufalina, massimizzando la predittività diagnostica nei confronti della paratubercolosi in questa specie. I dati di performances diagnostiche nei confronti di questa malattia nella specie bufalina permetteranno una migliore applicazione delle *Linee Guida per l'adozione di piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria nei confronti della paratubercolosi* negli allevamenti bufalini.

I dati parziali ottenuti nell'ambito del progetto sono stati presentati allo scorso congresso Internazionale sulla Paratubercolosi svoltosi in Messico in giugno 2018 e saranno presentati come comunicazione orale al congresso SIDILV che si svolgerà a Perugia il 7 novembre p.v.

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 agli altri IZZSS consulenza sulle metodiche analitiche ed eventuale attività di conferma:

Progetto di ricerca corrente IZS LE 2014/013: "Epidemiologia ed ecosistema dei Micobatteri presenti in Italia: *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Mycobacterium microti*" (Responsabile scientifico: M.L. Pacciarini). Il progetto ha avuto inizio il 1.11.2015 ed è terminato il 31.10.2018. MAP è un organismo caratterizzato da una lenta crescita e da scarsa variabilità genetica. Uno degli obiettivi del progetto è stato quello di valutare gli eventuali cambiamenti che si verificano nel genoma di MAP in un'azienda naturalmente infetta. A tal fine, ceppi isolati da vacche provenienti dalla stessa azienda e in diversi anni (2012 - 2017) sono stati sottoposti ad analisi Whole Genome Sequencing (WGS). La prima parte del

progetto è stata impiegata per la messa a punto di una metodica di estrazione in grado di garantire il recupero di un'elevata quantità di DNA di MAP (nell'ordine dei 100 µg) di elevata qualità (ratio 260/280 >1,8). Una volta messo a punto il sistema di estrazione, è stato estratto il DNA da 49 ceppi, per essere sottoposto ad analisi WGS. Il primo step eseguito su questi isolati di campo è stato quello di analizzare 13 loci mini- e micro-satelliti, in cui si è dimostrato come tutti i ceppi mostrassero un identico profilo. L'analisi WGS ha dimostrato un elevato grado di omogeneità genomica fra i ceppi sequenziati, infatti non sono stati ritrovate nè delezioni, nè inserzioni all'interno del genoma di questi isolati di campo. Tuttavia, è stato possibile riconoscere almeno 7 SNPs (pos7, pos33, pos68, pos43, pos53, pos37 e pos19) informativi, presenti cioè in almeno due isolati. L'analisi filo-dinamica utilizzando un approccio di tipo bayesiano (eseguita utilizzando la suite Beast2) ha mostrato una struttura evolutiva coerente della popolazione di ceppi, suggerendo l'ipotesi che un singolo evento infettivo (unico clone) abbia originato l'infezione nella mandria. Attraverso questa analisi è stato anche possibile indicare una possibile data di infezione, tuttavia, ancorché tale data sia stata confermata da informazioni anamnestiche, gli intervalli di confidenza sono troppi ampi per garantirne un margine di credibilità sufficiente. Inoltre, l'analisi filo-dinamica ha mostrato come i ceppi di MAP si siano evoluti in maniera indipendente rispetto al loro ospite. Infatti dallo stesso ospite sono stati isolati ceppi appartenenti a differenti clusters, ma d'altra parte ceppi del medesimo cluster sono stati trovati in più ospiti. Le nostre osservazioni, se da un lato suggeriscono fenomeni di co-infezione, d'altra parte sottolineano dinamiche di trasmissione ancora da chiarire. I dati parziali ottenuti nell'ambito del progetto sono stati presentati allo scorso congresso Internazionale sulla Paratubercolosi svoltosi in Messico in giugno 2018 e saranno presentati come comunicazione orale al congresso SIDILV che si svolgerà a Perugia il 7 novembre p.v.

- Progetto di ricerca corrente IZS PLV 2014/109: “Dalla genetica all'epigenomica: studio delle interazioni DNA-proteina e modificazioni della cromatina in modelli di malattie infettive animali” (Responsabile scientifico: S. Peletto). Il progetto è iniziato il 1.10.2015 e terminerà il 31.03.2020 (progetto prorogato).
- Progetto di ricerca corrente IZS VE 2015/103: “Applicazione di metodi spettroscopici e spettrometrici ad elevata capacità per l'identificazione di biomarcatori sierici associati all'infezione paratubercolare nei bovini da latte” (Responsabile scientifico: Responsabile scientifico: N. Pozzato). Il progetto ha avuto inizio il 1.9.2016 e terminerà il 31.8.2019 (progetto prorogato).
- Progetto di ricerca corrente IZS PLV 2015/104: “Paratubercolosi caprina: strategie per la gestione sanitaria degli allevamenti e salubrità della Robiola di Roccaverano” (Responsabile scientifico: M.S. Gennero). Il progetto ha avuto inizio il 1.11.2016 e terminerà il 31.10.2019.

Ricerca Finalizzata

Nulla da segnalare.

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

E' stato siglato un accordo di collaborazione con la ditta Nestec Ltd, per la validazione di metodologie finalizzate alla ricerca di MAP nel latte crudo, in quello sottoposto a trattamento termico e nel latte in polvere. Le metodologie comprendono il test microbiologico, la PCR e la metodica "phage assay".

Si è trattato di un progetto che ha previsto l'analisi di un numero significativo di campioni. Il C.R.N. ha analizzato 360 campioni in totale per le prove di sensibilità, eseguite come definito dalla ISO 16140:2016 rev 2, in particolare 40 campioni per tre tipi di prodotti diversi, da analizzare con tre metodiche differenti.

A questa prima fase ha fatto seguito l'analisi di 450 campioni per le prove di definizione del LOD (limit of detection) (50 campioni per ogni tipo dei tre prodotti, da analizzare con tre metodiche differenti), definito secondo quanto riportato nella medesima ISO.

Un analogo numero di campioni è stato analizzato da un altro laboratorio di riferimento, individuato dalla ditta Nestec nei laboratori del centro Neiker (Bilbao, Spagna). I campioni sono stati tutti allestiti presso i laboratori Nestec, contaminando artificialmente latte crudo, latte trattato termicamente e latte in polvere ricostituito. I campioni sono stati poi distribuiti ai laboratori che li hanno analizzati entro tre settimane dal loro arrivo in laboratorio. Lo scopo del progetto è stato quello di valutare la sensibilità analitica, i valori di esattezza (somma delle accordanze diviso la somma delle accordanze e delle discordanze tra il valore atteso e il valore ottenuto) e il LOD di tre metodi diversi in tre matrici diverse, in accordo con la ISO16140. Dai risultati è emerso come le metodiche PCR e colturali possiedano buone performances in termini di sensibilità ed esattezza, atte a consentirne l'utilizzo anche per la rilevazione di MAP negli alimenti. Questo non si è rivelato vero per il phage assay che, nelle condizioni in cui è stato condotto lo studio, non ha dimostrato di essere né sensibile, né affidabile. Inoltre, lo studio ha evidenziato come sia la sensibilità che il limite di rilevabilità cambino sulla base sia della matrice e sia della metodica considerata.

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

E' in atto una collaborazione con l'Università degli Studi di Milano, Facoltà di Medicina Veterinaria, a scopo di pubblicazione scientifica, per la diagnosi di paratubercolosi da un orice pervenuto dal Parco delle Cornelle (PG).

Aggiornamento e formazione professionale

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

- Il C.R.N. (Dr. N.Arrigoni) ha partecipato come relatore al corso FAD "Le zoonosi a trasmissione alimentare: aggiornamento sulle fonti, agenti zoonotici e focolai di tossinfezione alimentare", con una relazione dal titolo "Paratubercolosi: possibili aspetti zoonotici", organizzato dall'IZSLER, aperto dal 6.7.2017 al 30.11.2017 e dal 1.3.2018 al 30.11.2018;

- Il C.R.N. (Dr. N.Arrigoni) ha partecipato come docente al corso ECM “Paratuberculosis: introduzione alla problematica e gestione dell’infezione in allevamento”, organizzato dall’ASL di Lecce, il 30.1.2018.

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

- Il C.R.N. (Dr. N.Arrigoni) ha partecipato al 6th ParaTB Forum, Cancun (Mexico), 4.6.2018, con una presentazione orale:
 - Arrigoni N, Boldini M, Galletti G, Ruocco L, Gemma Brenzoni L, Farioli M, Gradassi M, Ventura G, Giovannini S, Paterlini F, Rosignoli C, Martinelli C, Garbarino C, Tamba M. “Bovine paratuberculosis in Italy: results after four years of application of the National Guidelines”;
- Il C.R.N. (Dr. M.Ricchi, Dr. N.Arrigoni) ha partecipato al 14th International Colloquium on Paratuberculosis, Cancun, (Mexico) dal 4 al 6.6.2018, con due presentazioni orali e quattro poster:
 - Butot S, Ricchi M, Sevilla I, Michot L, Molina E, Tello M, Russo S, Tomas D. “Estimation of performance characteristics of analytical methods for Mycobacterium avium paratuberculosis (MAP) detection in milk” (presentazione orale).
 - Ricchi M, Russo S, Scaltriti E, Leo S, Bolzoni L, Arrigoni N. “On the use of Whole Genome Sequencing to unveil local spread of a paratuberculosis clone within a single herd” (presentazione orale).
 - Galiero A, Leo S, Garbarino C, Arrigoni N, Russo S, Ricchi M. “Genotype profile of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis isolated from red deer (Cervus elaphus) in Northern Italy” (poster).
 - Ricchi M, Galletti G, Russo S, Gamberale F, De Carlo E, Arrigoni N. “Evaluation of serological tests for the detection of paratuberculosis in Italian Buffalos (Bubalus bubalis): a class latent approach”(poster).
 - Leo S, Calamari L, Arrigoni N, Tamba M, Trevisi E, Amadori M. “Effect of Paratuberculosis infection on welfare parameters of dairy cows” (poster).
 - De Grossi L, Santori D, Barone A, Abbruzzese S, Ricchi M, Marcario GA. “Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in faeces and tissue of small ruminants using a non - automated liquid culture system method” (poster).
- Il C.R.N. (Dr. N.Arrigoni) ha partecipato al 50th National Congress of the Italian Association of Buiatrics, Bologna, dal 10 al 13.10.2018 con una presentazione orale:
 - Arrigoni N, Boldini M, Galletti G, Ruocco L, Gemma Brenzoni L, Farioli M, Gradassi M, Ventura G, Giovannini S, Paterlini F, Rosignoli C, Martinelli C, Garbarino C, Tamba M (2018). “Bovine paratuberculosis in Lombardy: results after four years of application of the National Guidelines”.

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

- Il C.R.N. (Dr. N. Arrigoni) è stato incluso nel comitato scientifico del 14th International Colloquium on Paratuberculosis, nell'ambito del quale ha svolto attività di revisore dei lavori scientifici sottomessi e di valutazione dei lavori più meritevoli, da selezionare come presentazioni orali. Il congresso si è svolto a Cancun (Messico) nel mese di giugno 2018 (Chair: Gilberto Chavez).

Consulenze, attività di docenza, collaborazioni nazionali

1) Consulenze richieste ad esterni

Nulla da segnalare.

2) Consulenze e pareri tecnici forniti ad esterni

- E' stato fornito un **Parere alla provincia autonoma di Trento (prot. 35483 del 19.12.2017)**, relativo alla applicazione del Piano di controllo provinciale per la paratubercolosi Dall'esame della documentazione inviata, relativa alla proposta di deliberazione della Giunta provinciale di Trento "Piano di controllo volontario della paratubercolosi (malattia di Johne) negli allevamenti bovini (Sostituzione della deliberazione della Giunta provinciale n.2359 del 16 dicembre 2016)", si sono rilevate alcune modifiche rispetto alle "Linee guida per l'adozione dei piani di controllo e certificazione nei confronti della paratubercolosi bovina" (Accordo tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano del 17 ottobre 2013), recepito dalla Provincia autonoma di Trento in data 20 dicembre 2013. In particolare, le modifiche riguardavano:
 - l'adozione sistematica del protocollo di campionamento S2 (prelievo da tutti i capi di età superiore a 36 mesi invece che prelievo campionario come da protocollo S1);
 - la vigilanza mirata, ai fini dell'individuazione di casi clinici, in tutti gli allevamenti in cui siano riscontrati capi con valori di S/P al test ELISA >1,5;
 - i vincoli sui figli degli animali positivi, che possono essere venduti ad allevamenti da riproduzione solo dopo aver compiuto 36 mesi ed essere stati sottoposti ad un test sierologico con esito negativo;
 - l'adozione del test in compravendita su tutti i capi di età superiore a 24 mesi;
 - l'obbligo di abbattimento dei capi con valori S/P medio-alti al test sierologico.

Fatto salvo quanto previsto dalle "Linee guida per l'adozione dei piani di controllo e certificazione nei confronti della paratubercolosi bovina", al punto 7 (Qualifiche sanitarie), ove si definisce che l'introduzione di animali da allevamenti di stato sanitario sconosciuto o inferiore comporta la perdita di qualifica, con acquisizione della qualifica dell'allevamento di provenienza degli animali, in considerazione del fatto che:

- sono soddisfatti i criteri minimi previsti dalle suddette linee guida;
- tutte le modifiche rispetto alle Linee Guida Nazionali sono più restrittive rispetto a quanto riportato dalle Linee Guida stesse;

Il Centro di riferimento nazionale per la Paratubercolosi ha espresso parere favorevole alla proposta di deliberazione della Giunta provinciale di Trento "Piano di controllo

volontario della paratubercolosi (malattia di Johne) negli allevamenti bovini. Sostituzione della deliberazione della Giunta provinciale n.2359 del 16.12.2016”.

- E' stata fornita una attività di **consulenza al Ministero della Salute (vedi prot. 4967 del 16.2.2018)** a seguito della richiesta pervenuta per le vie brevi il 14.2.2018 dal Dr. Marco Sordilli relativamente alla classificazione della Paratubercolosi ai sensi della Animal Health Law (Regolamento CE 2016/429).

Visto il parere EFSA “Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation EU No 2016/429) adopted 30-6-2017, e i documenti allegati alla richiesta di parere (Verbali delle riunioni del Working group to discuss the categorisation exercise of listed animal diseases and the list of species according to the Animal Health Law del 17/11/2017, del 24/11/2017, del 18-19/1/2018, del 5-6/2/2018), il C.R.N. si è così espresso:

- Il citato parere EFSA, sia ai fini dell'inclusione della paratubercolosi, che della sua classificazione in categoria C) ai sensi dell'art.9 della AHL (Reg. EU 2016/429) è basato su dati scientifici documentati, su cui il Centro di Referenza per la paratubercolosi non può che concordare;
- La classificazione della malattia secondo quanto previsto al punto C) dell'art.9 comporta la conseguente adozione di misure per evitare la diffusione in parti dell'Unione che ne sono ufficialmente indenni o che hanno programmi di eradicazione per la malattia interessata per cui si applicano, se del caso:
 - a. norme per l'eradicazione opzionale secondo l'art. 31.
 - b. norme per gli Stati membri e le zone indenni da malattia ai sensi dell'art.36

Relativamente a tale punto, è importante valutare le modalità ed i criteri con cui uno Stato Membro dichiara la propria eventuale indennità dalla malattia; la paratubercolosi è infatti una malattia a lungo periodo di incubazione (oltre 2 anni nel bovino), ed i test diagnostici disponibili ed applicabili (test sierologici mediante metodica ELISA e PCR dalle feci), se utilizzati sul singolo capo, non garantiscono una sufficiente sensibilità, se non negli stadi avanzati di malattia. Inoltre, i costi elevati della PCR, decisamente superiori a quelli dei test sierologici, ne limitano l'applicazione su vasta scala.

Viceversa, la probabilità che un allevamento, una regione o uno Stato membro siano indenni da paratubercolosi può essere dimostrata con elevata probabilità attraverso piani di sorveglianza attiva che prevedano test ripetuti sulla popolazione (inclusi i ruminanti selvatici, cervidi in particolare) per lunghi periodi di tempo su vasta scala. Al contrario, l'assenza di casi clinici ha un valore predittivo negativo molto basso. Per questo è importante che i criteri adottati da uno Stato membro per la dichiarazione di indennità siano scientificamente documentati e ispirati possibilmente a Linee guida internazionali, come le Linee Guida promosse dalla International Association for paratuberculosis (“Guidelines for certification with respect to the movement of livestock for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis -MAP- infection”), citate anche dal parere EFSA 2017 al punto

3.1.4.5. "Restriction on the movement of animals and products", che sono state allegare al parere.

- E' stata fornita una attività di **consulenza al Ministero della Salute (vedi prot. 32215 del 19.10.2018)** a seguito della richiesta pervenuta per le vie brevi il 18.10.2018 dal Dr. Luigi Ruocco, relativo all'invio di una scheda tecnica sulla paratubercolosi nella specie caprina, con riferimento alla vaccinazione.
- E' stato realizzato un **Material Transfer Agreement con l'Università degli Studi di Pisa**, Dipartimento di Scienze Veterinarie, per una collaborazione relativa alla tipizzazione da parte del C.R.N. di ceppi di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mediante analisi loci mini- e microsattelliti ed eventuale Whole Genome Sequencing (scadenza novembre 2018).
- E' stata realizzato un tirocinio formativo a scopo di **Tesi di laurea (Dipartimento di scienze veterinarie, Università degli studi di Bologna**, anno accademico 2015/2016), del laureando Piercosimo Capozzolo, dal titolo: "Paratubercolosi: diffusione negli allevamenti bovini da latte della regione Calabria e risvolti igienico-sanitari" (Relatore: Prof. Andrea Serraino, Correlatore: Dott. Norma Arrigoni).
- E' stato realizzato un **tirocinio dal 17.9.2018 al 30.11.2018 richiesto dall'Università degli Studi di Bari**, Facoltà di medicina veterinaria, per la frequenza da parte del Dott. Alessio Sposato ai laboratori del C.R.N., per l'approfondimento dei test diagnostici e della gestione del problema in allevamento.
- E' in corso di perfezionamento un **Accordo di collaborazione scientifica con il Dipartimento di medicina veterinaria di Milano**, rep. Anatomia patologica, relativo a ricerca nel campo delle patologie da Micobatteri negli animali.

Attività di docenza

- Il C.R.N. (Dr. C.Garbarino) ha partecipato come docente al Corso di Laurea Magistrale in Scienze delle Tecnologie delle Produzioni Animali, Biosicurezza della filiera zootecnica, presso la Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, con una relazione dal titolo: "Paratubercolosi: linee guida per l'adozione di piani di controllo e assegnazione della qualifica sanitaria agli allevamenti e piano di gestione sanitaria", il 29/11/2018.

Consulenze e collaborazioni europee

E' in corso di perfezionamento un Accordo di collaborazione scientifica con il Centro di Referenza OIE Veterinary Research Institut di Brno (CZ), referente Dr.Petr Kralik.

Consulenze e collaborazioni internazionali

Relazione annuale 2017-2018 Centro di Referenza Nazionale Paratubercolosi - Documento prodotto in originale informatico e firmato digitalmente ai sensi del "Codice dell'amministrazione digitale" (Decreto legislativo n.82/2005)

- Il Responsabile del C.R.N. è membro del Board of Directors in rappresentanza dell'Italia nell'International Association for paratuberculosis, associazione scientifica mondiale dedicata allo studio della paratubercolosi.
- E' stato stipulato un Material Transfer Agreement con U.S. Department of Agriculture (Agricultural Research Service, Midwest area, Infectious Bacterial Diseases, Dott. Bannantine), per una collaborazione relativa allo scambio di ceppi di *Mycobacterium avium* subsp. *Hominisuis*, da utilizzare in prove di tipizzazione comparativa con MAP mediante metodiche PCR e MALDI-TOF (scadenza novembre 2021).
- Nel corso del 2018 è stato avviato un gruppo di lavoro internazionale, coordinato dal prof. R.Whittington (University of Sydney, Faculty of Science, Sydney School of Veterinary Science, Farm Animal Health) per fare il punto sulla applicazione dei piani di controllo della paratubercolosi a livello mondiale, con l'obiettivo di pubblicare il lavoro su una rivista impattata. A tale scopo è stato realizzato da parte di un gruppo ristretto un questionario che è stato somministrato ai rappresentanti di 48 Paesi. Per l'Italia, il C.R.N. (Dr.ssa N.Arrigoni, Dr.ssa A.Santi) ha provveduto alla compilazione dei dati richiesti, in collaborazione con il Ministero della Salute (Dr.L.Ruocco). E' stato anche realizzato da parte del C.R.N. uno snapshot relativo alla situazione Italiana, da pubblicare nelle informazioni aggiuntive. Si prevede la pubblicazione per fine 2018-inizio 2019.

Publicazioni scientifiche e divulgative

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

Su riviste con Impact factor:

1. Galiero A*, Leo S*, Garbarino C*, Arrigoni N*, Russo S*, Giacomelli S, Bianchi A, Trevisiol K, Idrizi I, Daka G, Fratini F, Turchi B, Cerri D, Ricchi M*. "Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis isolated from wild red deer (*Cervus elaphus*) in Northern Italy". *Vet Microbiol.* 2018 Apr; 217:167-172. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.03.015. (IF 2,524 – If normalizzato 6 – If attribuito 6)
2. Mazzone P, Corneli S, Di Paolo A, Maresca C, Felici A, Biagetti M, Ciullo M, Sebastiani C, Pezzotti G, Leo S*, Ricchi M*, Arrigoni N*. "Survival of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in the intermediate and final digestion products of biogas plants". *J Appl Microbiol.* 2018 Mar 24. doi: 10.1111/jam.13762. (IF 2,160 – IF normalizzato 2 – IF attribuito 2)

Su atti di congressi o riviste senza Impact Factor:

- Arrigoni N, Boldini M, Galletti G, Ruocco L, Gemma Brenzoni L, Farioli M, Gradassi M, Ventura G, Giovannini S, Paterlini F, Rosignoli C, Martinelli C, Garbarino C, Tamba M. "Bovine paratuberculosis in Italy: results after four years of application of the National Guidelines" Proc 6th ParaTB Forum, Cancun (Mexico), 4 June 2018.

- Butot S, Ricchi M, Sevilla I, Michot L, Molina E, Tello M, Russo S, Tomas D. "Estimation of performance characteristics of analytical methods for Mycobacterium avium paratuberculosis (MAP) detection in milk". 14th International Colloquium on Paratuberculosis: Cancun, Mexico, 4-6 June 2018.
- Ricchi M, Russo S, Scaltriti E, Leo S, Bolzoni L, Arrigoni N. "On the use of Whole Genome Sequencing to unveil local spread of a paratuberculosis clone within a single herd". 14th International Colloquium on Paratuberculosis: Cancun, Mexico, 4-6 June 2018.
- Galiero A, Leo S, Garbarino C, Arrigoni N, Russo S, Ricchi M. "Genotype profile of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis isolated from red deer (Cervus elaphus) in Northern Italy". 14th International Colloquium on Paratuberculosis: Cancun, Mexico, 4-6 June 2018.
- Ricchi M, Galletti G, Russo S, Gamberale F, De Carlo E, Arrigoni N. "Evaluation of serological tests for the detection of paratuberculosis in Italian Buffalos (Bubalus bubalis): a class latent approach". 14th International Colloquium on Paratuberculosis: Cancun, Mexico, 4-6 June 2018.
- Leo S, Calamari L, Arrigoni N, Tamba M, Trevisi E, Amadori M. "Effect of Paratuberculosis infection on welfare parameters of dairy cows". 14th International Colloquium on Paratuberculosis: Cancun, Mexico, 4-6 June 2018.
- De Grossi L, Santori D, Barone A, Abbruzzese S, Ricchi M, Marcario GA. "Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in feces and tissues of small ruminants using a non - automated liquid culture system method". 14th International Colloquium on Paratuberculosis: Cancun, Mexico, 4-6 June 2018.
- Arrigoni N, Boldini M, Galletti G, Ruocco L, Gemma Brenzoni L, Farioli M, Gradassi M, Ventura G, Giovannini S, Paterlini F, Rosignoli C, Martinelli C, Garbarino C, Tamba M (2018). "Bovine paratuberculosis in Lombardy: results after four years of application of the National Guidelines". 50th National Congress of the Italian Association of Buiatrics, Bologna, 10-13 October 2018.

Attività di referaggio:

Nel periodo considerate sono stati effettuati 3 referaggi per riviste impattate:

- 1 da N.Arrigoni ("Pathogens and Global Health")
- 2 da M.Ricchi ("Food Control" e "Journal of Applied Microbiology")

Sito Web

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

Sul sito sono inoltre disponibili:

- una brochure informativa/divulgativa dal titolo “Paratubercolosi nell’allevamento della bovina da latte”, destinato ad allevatori e veterinari, aggiornata con i criteri delle Linee guida nazionali.
(http://www.izsler.it/izs_bs/allegati/450/brochure17_12_13B.pdf).
- 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 stato utilizzato per la gestione del ring test per la diagnosi sierologica di Paratubercolosi mediante ELISA e/o AGID.