

RELAZIONE ANNUALE

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

(Periodo: dal 01.10.2021 al 30.09.2022)

Centro di Referenza Nazionale (C.R.N.) Paratubercolosi Relazione sulla attività svolta dal 01.10.2021 al 30.09.2022

Premessa

La Sede territoriale di Piacenza, Centro di Referenza Nazionale per la Paratubercolosi, ha ricevuto in data 3.11.2021 la comunicazione da WOAH di approvazione della domanda di riconoscimento come Laboratorio di Riferimento per la paratubercolosi, con il Dott. Matteo Ricchi quale esperto designato. La formalizzazione del riconoscimento del laboratorio si è conclusa in data 3.6.2022 con lettera prot. GT/SL/GP 35.574.

Attività Diagnostica

1) Standardizzazione e validazione di metodiche analitiche

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

Nella tabella seguente sono riportati i metodi di prova, con relativi Protocolli di Studio e validazione e Report di validazione, inviati nel periodo considerato ad altri IIZZSS, a seguito di richieste specifiche.

MP	REV	Titolo	IZS richiedente	Data invio
PSV 04/022	2	PROTOCOLLO DI STUDIO E VALIDAZIONE METODO DI PROVA INTERNO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI NEI CONFRONTI DI Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis DA SANGUE E LATTE TRAMITE ELISA INDIRETTA – KIT IDVET- REV8	IZSPLV	11/11/2021
RV 04/022	8	REPORT DI VALIDAZIONE METODO DI PROVA INTERNO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI NEI CONFRONTI DI Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis DA SANGUE E LATTE TRAMITE ELISA INDIRETTA – KIT IDVET	IZSPLV	11/11/2021
MP 01/207A	2	DOCUMENTO CORRELATO AL METODO DI PROVA NORMATO PER LA RICERCA DI Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis DA FECI - ESAME COLTURALE DOPO CENTRIFUGAZIONE – REV0	IZSLT	15/12/2021
PSV 01/207	0	PROTOCOLLO DI STUDIO E VALIDAZIONE METODO DI PROVA NORMATO PER LA RICERCA DI Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis DA FECI – ESAME COLTURALE DOPO CENTRIFUGAZIONE	IZSLT	15/12/2021
RV 01/207	0	REPORT DI VALIDAZIONE METODO DI PROVA NORMATO PER LA RICERCA DI Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis DA FECI - ESAME COLTURALE DOPO CENTRIFUGAZIONE	IZSLT	15/12/2021
MP 01/207A	2	DOCUMENTO CORRELATO AL METODO DI PROVA NORMATO PER LA RICERCA DI Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis DA FECI - ESAME COLTURALE DOPO CENTRIFUGAZIONE	IZSLT	23/12/2021
PSV 01/207	0	PROTOCOLLO DI STUDIO E VALIDAZIONE METODO DI PROVA INTERNO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI NEI CONFRONTI DI Mycobacterium avium subsp.	IZSLT	23/12/2021

		paratuberculosis DA SANGUE E LATTE TRAMITE ELISA INDIRETTA – KIT IDVET		
RV 01/207	0	REPORT DI VALIDAZIONE METODO DI PROVA NORMATO PER LA RICERCA DI <i>Mycobacterium avium</i> subsp. paratuberculosis DA FECCI - ESAME COLTURALE DOPO CENTRIFUGAZIONE	IZSLT	23/12/2021

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

2) Produzione e distribuzione di reagenti

All'interno della Biobanca centralizzata IZSLER sono stoccati:

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

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

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

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

3) Attività analitica

La paratuberculosis non è una malattia per la quale è prevista la conferma da parte del C.R.N..

Nel periodo considerato, il C.R.N. ha ricevuto, da IZSLT, n.1 conferimento di siero bovino per conferma diagnostica sierologica.

Nel periodo considerato sono stati eseguiti complessivamente 39.265 esami, di cui:

	Non ufficiali	Ufficiali	Totale
Coltura	10	14	24
Sierologia	25.392	13.303	38.695
PCR	131	415	546
Totale	25.533	13.732	39.265

L'intera attività analitica, nel periodo di riferimento, è in leggero calo (-7% rispetto al medesimo periodo di riferimento dell'anno precedente 2020-2021), con particolare riferimento all'attività di diagnosi sierologica, sia su campioni ufficiali che su campioni conferiti da privati.

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

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

E' stato organizzato dal C.R.N. un circuito inter-laboratorio per la diagnosi indiretta di paratubercolosi mediante campioni di siero e latte; il pannello era costituito da:

- 8 campioni di siero di sangue bovino liofilizzato;
- 8 campioni di latte bovino liofilizzato;
- 8 campioni di siero di sangue bufalino liofilizzato;
- 8 campioni di siero di sangue caprino liofilizzato.

L'adesione, per almeno un panel, è pervenuta da 38 laboratori (incluso il laboratorio organizzatore), appartenenti a tutti e 10 gli Istituti Zooprofilattici presenti sul territorio nazionale. I campioni sono stati inviati il giorno 28.3.2022, con scadenza prevista per la restituzione dei risultati fissata al 30.4.2022.

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 7 giorni dopo la chiusura del ring test, al fine di poter identificare e risolvere rapidamente eventuali non conformità;
- report completo entro 30 giorni dalla scadenza.

Tutti i laboratori hanno utilizzato il medesimo kit commerciale (Kit IDvet) ed i risultati del proficiency test sono stati ottimi ed in linea con i risultati dei precedenti proficiency test.

In particolare:

- per le matrici siero bovino, latte bovino e siero caprino l'accuratezza è risultata pari a 1 (tutti i risultati corretti);
- per la matrice siero bufalino l'accuratezza è risultata 0,992 (IC95%: 0,973-0,999), con un solo laboratorio che ha fornito risultati non conformi per entrambe le aliquote di un campione positivo;
- dall'analisi dei dati quantitativi, non sono stati rilevati valori non soddisfacenti di Z-score (<-3 o >+3).

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

Il C.R.N. ha partecipato a:

- 1 prova inter-laboratorio (aprile 2022), organizzata a livello europeo, per esame sierologico su siero di sangue (8 campioni) e latte individuale bovino (8 campioni)

mediante ELISA (Ente organizzatore: GD Animal Health – Deventer, NE). I risultati sono stati corretti nel 100% dei casi.

- 1 prova inter-laboratorio (agosto 2021), organizzata a livello europeo, per coltura e PCR su feci (Ente organizzatore: QA Veterinary Laboratory Agency – UK, distribuzione 14677/BA del PT0127). I risultati sono risultati conformi agli attesi nel 100% dei casi.

Epidemiologia

1) Creazione banca dati

Il C.R.N. ha scelto di non attivare proprie Banche Dati, e di utilizzare il Sistema informativo Veterinario Nazionale (Vetinfo) per la raccolta dei dati relativi al patrimonio delle specie suscettibili, alle qualifiche sanitarie e ai focolai di malattia segnalati dalle ASL. A tale proposito si segnala come apparentemente non vi sia congruenza, nel periodo di interesse, tra il numero di aziende con qualifica “Allevamento con casi clinici (PTC)” (n=18) ed il numero di focolai di malattia registrati in SIMAN (n=2).

2) Sviluppo e gestione di sistemi informativi

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

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

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

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

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

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

Di seguito viene riportato lo stato di applicazione delle Linee Guida a livello Nazionale, ove risulta il recepimento formale da parte di tutte le Regioni.

Viene inoltre riportato il riferimento al relativo documento di recepimento.

Regione	Riferimento
Abruzzo	Determinazione n. DG 21/206 del 21.11.2013
Basilicata	Deliberazione della Giunta Regionale 17 novembre 2015, n. 1476
Calabria	Decreto del Commissario ad Acta n.47 del 21/05/2015

<i>Campania</i>	<i>Deliberazione della Giunta Regionale n. 657 del 30/12/2013</i>
<i>Emilia-Romagna</i>	<i>Deliberazione della Giunta Regionale N. 2100 del 30/12/2013</i>
<i>Friuli Venezia Giulia</i>	<i>Deliberazione della Giunta regionale N. 916 del 15/05/2015</i>
<i>Lazio</i>	<i>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.</i>
<i>Liguria</i>	<i>Deliberazione della Giunta Regionale n. 644 del 30/05/2014</i>
<i>Lombardia</i>	<i>DDGN N°6845 del 18/07/2013 Piano regionale di controllo e certificazione nei confronti della paratubercolosi bovina</i>
<i>Piemonte</i>	<i>Deliberazione della Giunta Regionale n. 15-7093 del 10/02/2014</i>
<i>Marche</i>	<i>Deliberazione della Giunta Regionale n. 116 del 3/10/2016</i>
<i>Molise</i>	<i>Decreto della Giunta regionale n.66 del 5.12.2016</i>
<i>Puglia</i>	<i>Deliberazione della Giunta Regionale n. 2567 del 30/12/2013</i>
<i>Sardegna</i>	<i>Deliberazione della Giunta Regionale N. 27/10 del 15.7.2014</i>
<i>Sicilia</i>	<i>Decreto Assessoriale 23/02/2015</i>
<i>Toscana</i>	<i>Deliberazione della Giunta Regionale n. 1103 del 16/12/2013</i>
<i>Trentino-Alto Adige</i>	<i>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.</i>
<i>Umbria</i>	<i>Deliberazione della Giunta Regionale n. 819 del 7 luglio 2014</i>
<i>Valle d'Aosta</i>	<i>Deliberazione della Giunta Regionale n. 14 del 10/1/2014</i>
<i>Veneto</i>	<i>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.</i>

Da rilevare che:

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

A distanza di oltre 8 anni dalla emanazione delle Linee guida nazionali per l'adozione di Piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria degli allevamenti nei confronti della paratubercolosi bovina, il C.R.N. ha ritenuto opportuno proporre al Ministero della Salute (ultimo invio protocollato, prot. 15580 del 12.7.2022) alcune modifiche ed integrazioni, che tengano conto, oltre alle criticità emerse, della introduzione della paratubercolosi nell'elenco delle malattie inserite in categoria e) ai sensi del Regolamento (UE) 2016/429 e relativo Regolamento di esecuzione 2018/1882 e pertanto soggette a sorveglianza.

Le principali modifiche vengono di seguito illustrate:

- il campo di applicazione del piano è stato esteso a tutte le principali specie ruminanti domestiche (bovini, bufalini, caprini, ovini)
- è stata eliminata la possibilità di utilizzare campioni di latte per l'attribuzione della qualifica sanitaria, data la minore robustezza del singolo test sul latte rispetto al test sul sangue. Il test sierologico sul latte è infatti influenzato dalla fase di lattazione, dimostrandosi meno sensibile e robusto rispetto ai dati ottenuti dalle analisi del sangue. Tuttavia, è confermata la possibilità di utilizzare il latte per l'applicazione di piani di controllo interni da parte dell'allevatore.

- è stata introdotta la raccomandazione di non eseguire i prelievi per le analisi sierologiche nei tre mesi successivi all'esecuzione della prova intradermica per la profilassi della tubercolosi, che potrebbe essere causa di reazioni falsamente positive.
- vista l'evidenza di una sotto-segnalazione dei casi clinici:
 - è stata rafforzata la raccomandazione agli operatori di comunicare al veterinario aziendale eventuali modifiche dei parametri di produzione dei propri animali e la presenza di diarree croniche e/o perdite ponderali significative.
 - è stata raccomandata la definizione da parte delle Regioni di una frequenza minima di visite periodiche di sanità animale da parte dei veterinari aziendali, tenendo conto del livello di rischio e delle altre attività pianificate negli stabilimenti.
 - è stata rafforzata la sorveglianza da parte dei veterinari incaricati di svolgere le visite periodiche di sanità animale negli stabilimenti da riproduzione di bovini, bufalini, ovini e caprini, di cui all'art. 25 del Reg. UE 2016/429, attraverso accertamenti per identificare sintomi compatibili con la paratubercolosi ed eventuali accertamenti diagnostici.
- relativamente ai criteri e modalità di attribuzione delle qualifiche sanitarie:
 - per l'attribuzione della qualifica si è ritenuto di sostituire il prelievo campionario (S1) con il prelievo di tutti i capi di età superiore a 36 mesi (S2). L'approccio secondo il protocollo S1 era stato introdotto inizialmente per limitare gli oneri a carico degli aderenti, ma si ritiene che l'applicazione del protocollo S2, già peraltro applicato volontariamente dalla maggior parte degli allevamenti, essendo più sensibile, eviti la comparsa di positività inattese in fasi successive, che potrebbero demotivare l'allevatore, causando la perdita della qualifica e l'uscita dal piano.
 - per il mantenimento della qualifica è stato mantenuto il protocollo S1, ad eccezione degli allevamenti con qualifica PT1 per i quali è necessario applicare il protocollo S2 per una gestione più efficace degli animali infetti.
 - per tutte le qualifiche (invece che per i soli livelli PT3-PT5 come previsto da versione originale delle Linee guida) è stata prevista la possibilità per l'allevatore di richiedere una conferma diagnostica dei capi sieropositivi mediante PCR dalle feci, purché la sieroprevalenza risulti inferiore al 3%. Questo ha lo scopo di chiarire e approfondire i casi di sospette false positività dei test sierologici (comparsa di sieropositività in allevamenti ripetutamente negativi o a bassa prevalenza). La comparsa di positività in allevamenti precedentemente ripetutamente negativi ha infatti costituito una causa di abbandono del piano da parte di alcuni allevamenti. La conferma mediante PCR di almeno un campione comporta la conferma della presenza di infezione in allevamento; in questo caso tutti i capi sieropositivi sono considerati infetti anche se negativi alla PCR. La possibilità di conferma mediante PCR è prevista solo in caso di applicazione del protocollo S2, sia per acquisizione che per mantenimento qualifica.
- è stata inserita la possibilità di vaccinazione nella specie caprina, con prodotti attualmente non registrati in Italia, pur con le dovute limitazioni (allevamenti caprini non in compresenza di bovini, alta prevalenza di infezione e/o ad alta incidenza annua di casi clinici), previa richiesta di autorizzazione al Ministero della Salute ed approvazione da

parte dei Servizi Veterinari territorialmente competenti. Lo stato vaccinale del singolo capo deve essere riportato all'interno della Banca Dati Nazionale.

Le modifiche alla versione originale delle Linee Guida sono state discusse e approvate da tutte le Regioni italiane e sono state restituite al Ministero della Salute per l'approvazione finale.

Relativamente alla situazione delle qualifiche previste dalle Linee Guida, si riportano di seguito i dati relativi alle qualifiche degli **allevamenti bovini** presenti in BDN al 30.09.2022 per le singole Regioni (numero di allevamenti e relativa qualifica).

Complessivamente i dati sono stabili rispetto all'anno precedente (2020-2021), mostrando un leggero aumento degli allevamenti con qualifica nel corso degli anni: la percentuale di allevamenti con qualifica era risultata essere il 33,6% negli anni 19-20; 34,7% negli anni 20-21, mentre nell'anno in corso è risultata 35,2%.

Regione	Con casi clinici	Senza casi clinici	A basso rischio	Negativo	Allevamento certificato			Senza Qualifica	Totale complessivo	% con qualifica
	PTC	PT0	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5			
ABRUZZO								3.990	3.990	-
BASILICATA		28	4					2.663	2.695	1,2
CALABRIA		2	12	14	3	1		8.389	8.421	0,4
CAMPANIA		383						9.550	9.933	3,9
EMILIA ROMAGNA	5	5.211	35	38	12	8	17	869	6.195	86,0
FRIULI VENEZIA GIULIA			2					1.913	1.915	0,1
LAZIO		1	20	12	2	1		11.866	11.902	0,3
LIGURIA	1	554	15	4				466	1.040	55,2
LOMBARDIA		4.156	646	907	146	117	191	8.904	15.067	40,9
MARCHE	1	541	20	12	11	4	1	2.533	3.123	18,9
MOLISE								2.061	2.061	-
PIEMONTE	4	8.563	327	253	124	164	296	1.977	11.708	83,1
PUGLIA		168	1					3.737	3.906	4,3
SARDEGNA	3	8.150		48				1.194	9.395	87,3
SICILIA	2	3.085	289					7.172	10.548	32,0
TOSCANA		4	4	3				3.514	3.525	0,3
TRENTINO - ALTO ADIGE (BZ)	2	7.868	1					29	7.900	99,6
TRENTINO - ALTO ADIGE (TN)		155	931	97	131	25	44	231	1.614	85,7
UMBRIA			2					3.191	3.193	0,1
VALLE D'AOSTA		1	1.501					394	1.896	79,2
VENETO		925	441					11.475	12.841	10,6
Totale complessivo	18	39.795	4.251	1.388	429	320	549	86.118	132.868	35,2

Di seguito si riportano i dati relativi alle qualifiche degli **allevamenti bufalini** presenti in BDN al 30.09.2022 per le singole Regioni (numero di allevamenti e relativa qualifica).

Complessivamente i dati sono stabili rispetto all'anno precedente (2020-2021) dove la percentuale di allevamenti con qualifica era risultata essere il 6,9%, mentre nell'anno in corso è risultata il 7,05 %.

Regione	Con casi clinici	Senza casi clinici	A basso rischio	Negativo	Allevamento certificato					
	PTC	PT0	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5	Senza Qualifica	Totale complessivo	% con qualifica
ABRUZZO								17	17	-
BASILICATA		2						26	28	7,14
CALABRIA						1		16	17	5,88
CAMPANIA		85						1146	1231	6,90
EMILIA ROMAGNA		10						7	17	58,82
FRIULI VENEZIA GIULIA								24	24	-
LAZIO				2				721	723	0,28
LIGURIA		1						2	3	33,33
LOMBARDIA		20	1	7				63	91	30,77
MARCHE		15						72	87	17,24
MOLISE								11	11	-
PIEMONTE		18	2					14	34	58,82
PUGLIA		2						70	72	2,78
SARDEGNA		4						1	5	80,00
SICILIA		4						11	15	26,67
TOSCANA								18	18	-
TRENTINO - ALTO ADIGE (BZ)		2							2	100,00
UMBRIA			1					33	34	2,94
VENETO		3						122	125	2,40
Totale complessivo	0	166	4	9	0	1	0	2374	2554	7,05

Di seguito viene riportato lo stato di applicazione e le relative problematiche rilevate nelle quattro regioni a maggiore vocazione zootecnica (Lombardia, Emilia-Romagna, Piemonte, Veneto) e nella provincia autonoma di Trento.

3.b. Piano regionale di controllo e certificazione nei confronti della Paratubercolosi bovina in Regione Lombardia

La Regione Lombardia ha anticipato la pubblicazione delle *Linee guida nazionali* con l'approvazione di un Piano Regionale, pubblicato sul Bollettino Ufficiale Regione Lombardia del 24 luglio 2013.

Il "Piano regionale di controllo e certificazione nei confronti della Paratubercolosi bovina" (D.d.g.s 6845/2013) è rivolto a fornire indicazioni circa le modalità di certificazione del latte i cui derivati siano destinati all'esportazione verso paesi terzi ed è stato redatto secondo le indicazioni delle Linee guida Nazionali.

L'assegnazione della qualifica sanitaria agli allevamenti avviene su richiesta dell'allevatore (richiesta di adesione al piano). Ricevuta la richiesta, i servizi veterinari della ASL effettuano

una visita clinica in allevamento con cadenza annuale, in base alla quale viene assegnata la qualifica PTC o PTEX del piano lombardo. La qualifica PTEX corrisponde alla qualifica PT0 delle linee guida nazionali con l'azione aggiuntiva della visita clinica. La visita clinica non solo permette di individuare eventuali casi clinici non ancora notificati, ma rappresenta anche un'occasione di formazione e sensibilizzazione dell'allevatore.

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

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

Di seguito vengono riportati i dati aggiornati della situazione sanitaria di Regione Lombardia relativamente alla paratubercolosi, dopo 8 anni di applicazione delle linee guida (2014-2021), sulla base dei seguenti indicatori:

- % di allevamenti aderenti al piano;
- % di allevamenti testati;
- % di animali testati;
- % di allevamenti infetti;
- % di allevamenti con Prevalenza apparente (AP) >5%;
- qualifica sanitaria degli allevamenti

Tutti gli indicatori mostrano un miglioramento generale della situazione relativa alla paratubercolosi. In particolare si osserva una diminuzione costante (dal 28,8% al 4,2%) degli allevamenti ad alto rischio (prevalenza apparente all'interno dell'allevamento >5%) e della prevalenza apparente degli animali infetti (dal 4,2% all'1,3%).

Gli allevamenti che hanno aderito al piano sono aumentati dal 56,0% (2014) all'81,4% (2021) del totale degli allevamenti da latte.

Dal 2014 al 2021 abbiamo osservato un aumento del numero di allevamenti testati (dal 7,2% al 30,6% del totale degli allevamenti da latte) e una riduzione sia degli allevamenti infetti (dal 74,2% al 52,4% degli allevamenti testati) sia degli animali positivi (dal 4,2% all'1,3% delle vacche testate) (tabelle 1 e 2, figure 1 e 2).

La prevalenza di allevamenti con AP intra-aziendale >5% è diminuita dal 28,8% nel 2014, al 4,2% nel 2021.

Questo miglioramento è evidente anche considerando le variazioni verificatesi nella distribuzione di frequenza della sieroprevalenza apparente intra-aziendale dal 2014 al 2021 (tabella 3 e figura 3).

Nella figura 3, che mostra le variazioni della AP intra-aziendale dal 2014 al 2021, è evidente che le classi "negativa" (AP 0%) e "a bassa prevalenza" (AP 1-3%) sono diventate più rappresentate dal 2014 al 2021, in contrasto con la frequenza di distribuzione delle classi a più alta prevalenza, che mostra una graduale diminuzione.

Tabella 1: Prevalenza apparente (PA) di allevamenti infetti in Lombardia dal 2014 al 2021

Anno	Totale allevamenti	Allevamenti aderenti al piano	Allevamenti testati	PA Allevamenti infetti	% allevamenti con AP>5%
2014	6.445	3.608 (56,0%)	466 (7,2%)	346 (74,2%)	28,8
2015	6.336	4.001 (63,1%)	881 (13,9%)	629 (71,4%)	18,8
2016	6.022	4.230 (70,2%)	1.052 (17,5%)	815 (77,5%)	23,0
2017	5.781	4.061 (70,2%)	1.266 (21,9%)	652 (51,5%)	7,9
2018	5.640	4.307 (76,4%)	1.443 (25,6%)	753 (52,2%)	9,6
2019	5.402	4.098 (75,9%)	1.544 (28,6%)	809 (52,4%)	8,4
2020	5.223	4.064 (77,8%)	1.546 (29,6%)	788 (51,0%)	5,0
2021	5.054	4.114 (81,4%)	1.549(30,6%)	812 (52,4%)	4,2

Tabella 2: Prevalenza apparente (PA) di animali infetti in Lombardia dal 2014 al 2021

Anno	Animali testati (ELISA screening)	Animali positivi (ELISA conferma)	% animali positivi
2014	52,963	2,230	4.2
2015	105,466	3,363	3.2
2016	124,750	4,170	3.3
2017	147,125	2,631	1.8
2018	163,684	3,093	1.9
2019	177,243	2,984	1.7
2020	172,696	2,431	1.4
2021	173,040	2,225	1.3

Figura 1: Numero di allevamenti totali, allevamenti che aderiscono al piano e allevamenti testati in Lombardia dal 2014 al 2021.

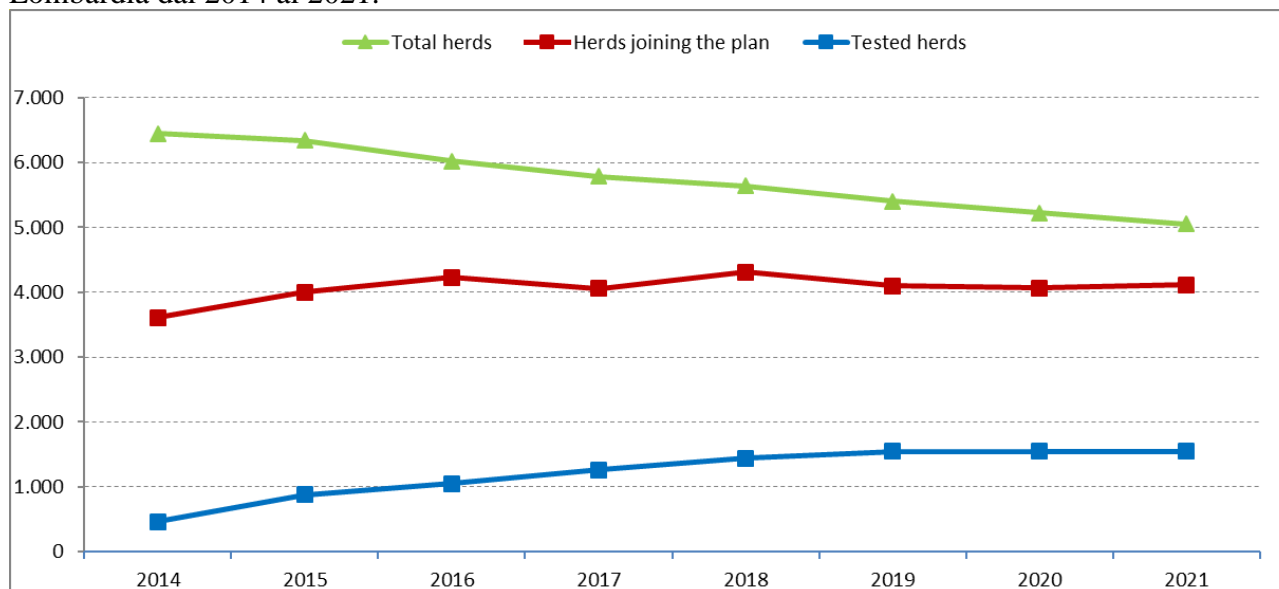


Figura 2: Percentuale di allevamenti che aderiscono al piano, di allevamenti testati e di allevamenti infetti in Lombardia dal 2014 al 2021.

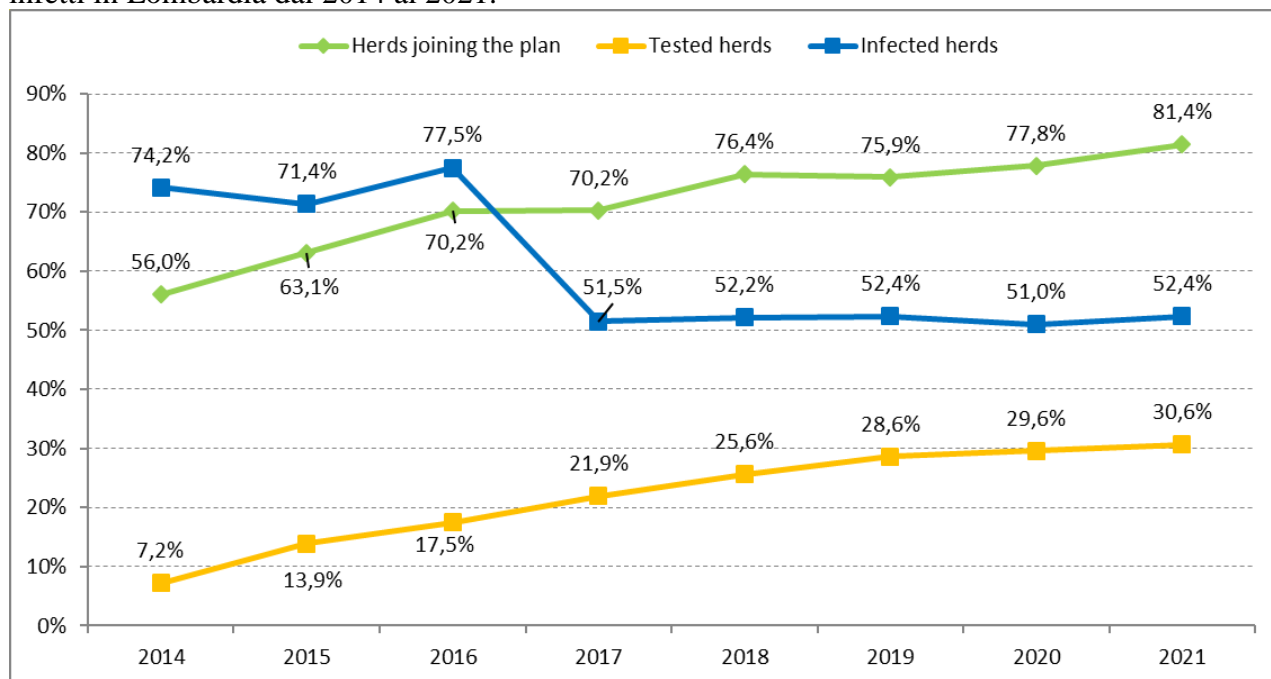
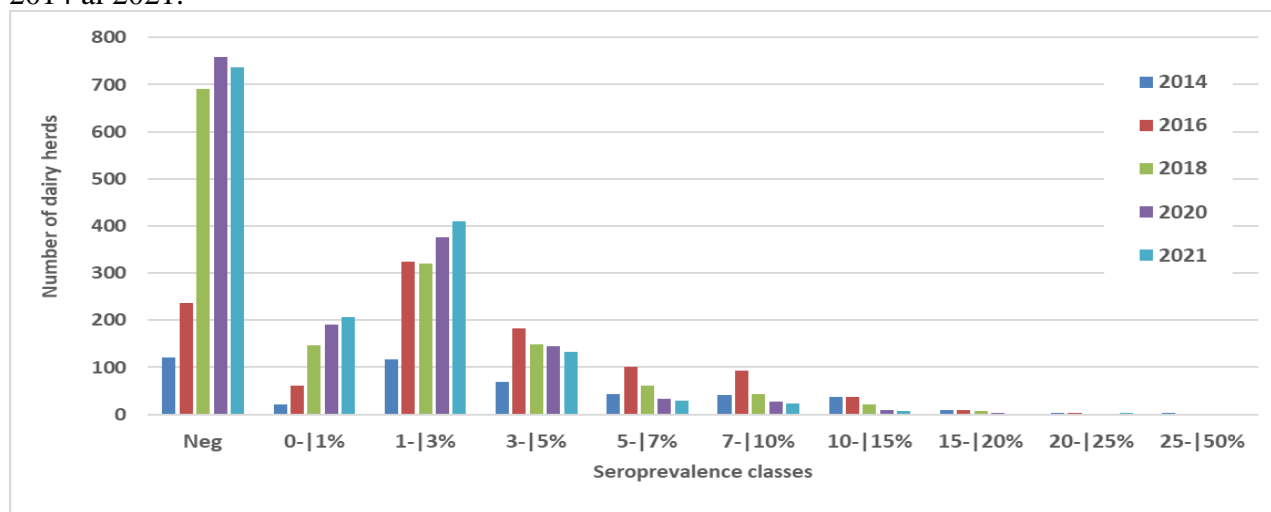


Tabella 3. Variazione della AP intra-aziendale di paratubercolosi negli allevamenti in Lombardia dal 2014 al 2021.

Anno	Neg	0-1%	1-3%	3-5%	5-7%	7-10%	10-15%	15-20%	20-25%	25-50%	Totale
2014	120	21	117	69	44	42	37	9	3	4	466
2016	237	62	324	183	101	93	37	10	3	2	1,052
2018	690	147	320	149	61	44	21	8	1	2	1,443
2020	758	191	375	145	33	28	10	3	1	2	1,546
2021	737	206	409	133	29	24	7	0	3	1	1,549

Figura 3. Variazione della AP intra-aziendale della paratubercolosi negli allevamenti lombardi dal 2014 al 2021.



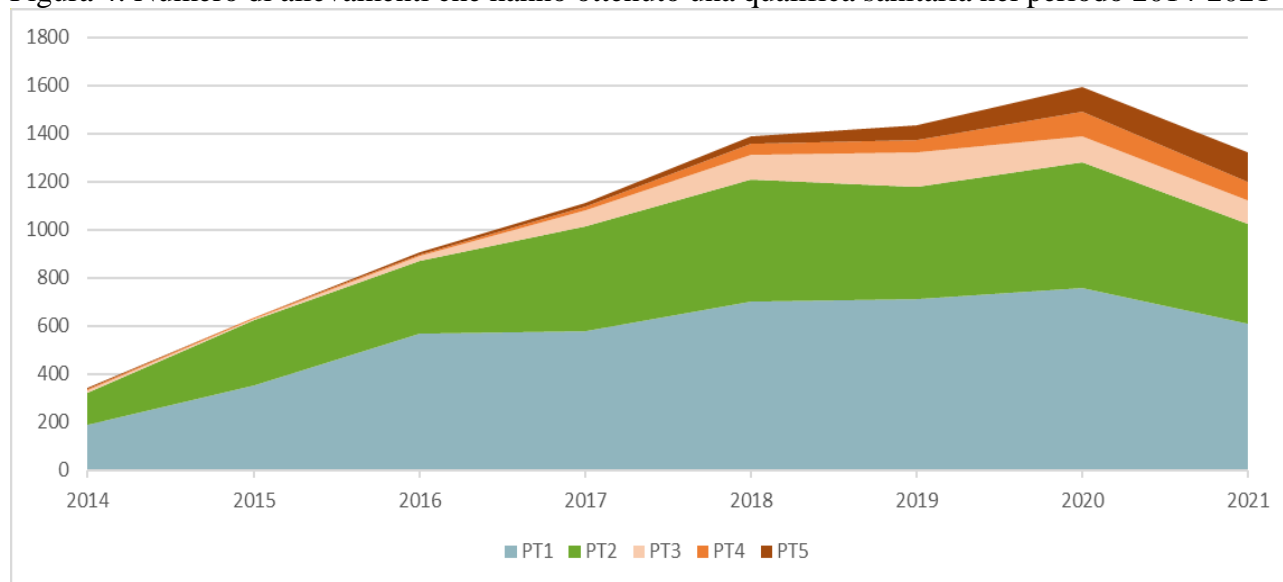
Per quanto riguarda le qualifiche sanitarie, abbiamo registrato un aumento generale del numero totale di allevamenti con qualifica da PT1 a PT5 fino al 2020, mentre nell'ultimo anno è stata osservata una leggera diminuzione del numero di allevamenti con qualifica sanitaria da PT1 a PT4. Al contrario, il numero di allevamenti PT5 ha mostrato un aumento costante (tabella 4, figura 4).

Le possibili motivazioni dell'andamento negativo degli indicatori nell'ultimo anno comprendono: la mancanza di compensazioni economiche, sia per gli animali abbattuti che per i test ELISA, i cui costi sono sostenuti esclusivamente dagli allevatori e il rallentamento delle attività di assistenza durante il periodo pandemico.

Table 4: Paratubercolosi in Lombardia: numero di allevamenti con qualifica sanitaria

Anno	Qualifica sanitaria					Totale PT1-PT5
	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5	
2014	187	137	10	2	4	340
2015	354	268	6	4	4	636
2016	567	303	22	5	7	904
2017	578	434	67	19	11	1.109
2018	700	507	102	49	31	1.389
2019	712	467	142	51	64	1.436
2020	760	518	108	106	99	1.591
2021	611	414	99	72	128	1.324

Figura 4: Numero di allevamenti che hanno ottenuto una qualifica sanitaria nel periodo 2014-2021



In generale, i risultati del piano di controllo e certificazione della Paratubercolosi in Lombardia confermano la possibilità di migliorare lo stato sanitario degli allevamenti; tuttavia, a causa della natura cronica dell'infezione, per ottenere risultati duraturi è necessario l'impegno degli allevatori nel lungo periodo. Il mantenimento nel tempo della motivazione degli allevatori è particolarmente difficile da ottenere, in particolare quando si raggiungono situazioni di bassa prevalenza, nelle fasi avanzate del programma di controllo.

La collaborazione tra i Servizi Veterinari Ufficiali, i laboratori, gli operatori e gli allevatori, attraverso la creazione specifica di gruppi di supporto, è strategica per sostenere l'adesione e la partecipazione al programma, così come la comunicazione, l'educazione e le iniziative di sensibilizzazione delle parti interessate, che vede costantemente impegnato il C.R.N.

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

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

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

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

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

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

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

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

http://www.izsvenezie.it/images/stories/Pdf/Temi/LG_in_VET2_paratuberculosis.pdf

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

Con la D.G.R. n. 15-7093 del 10/02/2014, la Regione Piemonte ha recepito le linee guida del Ministero della Salute, e successivamente, in data 17/04/2014 ha trasmesso alle ASL le relative istruzioni operative.

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

- il prelievo di conferma su sospetto clinico rilevato al macello

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

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

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

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

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

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

Sono previsti inoltre:

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

3.g Manuali per il Controllo della Paratubercolosi

Sono a disposizione sul sito del C.R.N. tre ***Manuali per il Controllo per la Paratubercolosi:***

1. per allevamenti di vacche e bufale da latte.

https://gestione.izsler.it/izs_bs/allegati/5704/Allegato%201%20A_MANUALE%20bovine_bufale%20latte_Rev_2.pdf

2. per allevamenti di vacche da carne.

https://gestione.izsler.it/izs_bs/allegati/5704/Allegato%201_B_MANUALE_bovini_carne_Rev_2.pdf

3. per allevamenti di pecore e capre da latte.

https://gestione.izsler.it/izs_bs/allegati/5704/Allegato%201%20C_MANUALE%20capre%20e%20pecore_latte%20Rev_0.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

Il nuovo Regolamento (UE) 2016/429 ("Animal Health Law"), il relativo Regolamento di Esecuzione (UE) 2018/1882, e il Decr. Lgs. 2022/136 definiscono che la Paratubercolosi sia annoverata tra le malattie di categoria E, per le quali è necessario da parte degli Stati Membri attivare un sistema di sorveglianza. A tale scopo è stata inviata al Ministero una proposta di adeguamento delle Linee Guida nazionali (vedi Epidemiologia, punto 3).

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

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

E' da rilevare che le indagini eseguite mediante test ELISA su sangue individuale mostrano una prevalenza di allevamenti infetti superiore rispetto a quelle che hanno utilizzato il test ELISA su latte di massa, perché la sensibilità della prima metodica di rilevazione adottata è decisamente superiore rispetto alla seconda, che consente la rilevazione solo degli allevamenti a prevalenza intra-aziendale medio-alta.

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

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

Regione	Anno	Prevalenza apparente aziende	Prevalenza apparente animali	Test	Riferimento bibliografico
Marche	2011	73,7% ovini	6,29%	ELISA	Attili (2011)
Sicilia	2015	64,2% ovini 56,9% caprino	3,6%	ELISA individuale	Fiasconaro (comunicazione personale)
Piemonte	2017	40,0% caprini	3,0%		Gennero (comunicazione personale)
Puglia	2019	Capra 82,2% Pecora 44,8% Capra-Pecora 73,9% Pecora – capra 61,2%	Capra 15,7% Pecora 2,8% Capra-Pecora 9,9% Pecora – capra 3,7%		Iarussi (2019)
Provincia Trento	2019	Caprini 19,7%	Caprini 4,0%		Dellamaria (comunicazione personale)

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

Relativamente al **patrimonio bufalino**, si riportano di seguito i dati che sono stati oggetto di un Progetto di Ricerca Corrente:

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

4.b Dati sui focolai

Le Linee Guida nazionali hanno definito che i casi clinici di Paratubercolosi bovina debbano essere registrati in SIMAN. I dati relativi ai casi clinici registrati in SIMAN sono i seguenti:

Regione	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	TOTALE
Emilia-Romagna	1	1	1			2	1			6
Lombardia									1	1
Liguria						1				1
Marche				2						2
Piemonte	7	7	2				3	1		20
Sardegna	2	2	2	2			1		1	10
Toscana	1									1
Trento	6	4	2							12
ITALIA	17	14	7	4	0	3	5	1	2	53

Allevamenti con qualifica PTC assegnata nell'anno (Fonte: SIMAN: Dati aggiornati al 30/09/2022)

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

Gli allevamenti con qualifica PTC nel periodo considerato sono infatti 18, a fronte di 2 focolai registrato in SIMAN. Tutte le segnalazioni riguardano allevamenti bovini, mentre non si sono registrate segnalazioni per l'allevamento bufalino.

Ricerca e sperimentazione

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

Ricerca Corrente come Capofila

Progetto di ricerca corrente IZS LE 2018/011: “Studio sulla sopravvivenza di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* al processo di produzione della mozzarella ottenuta da latte vaccino e bufalino” (Responsabile scientifico M. Ricchi).

Il progetto ha avuto inizio il 31.10.2019 ed è terminato il 31.05.2022 (Progetto prorogato). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) è sospettato di essere coinvolto nell'eziopatogenesi del morbo di Crohn, del diabete di tipo I, della sarcoidosi, della sclerosi multipla e della tiroidite di Hashimoto. Pur non essendo stato provato definitivamente il suo ruolo zoonotico, questo non è mai stato escluso (EFSA Scientific opinion: Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) N. 2016/429): paratuberculosis). Il consumo di latte e prodotti lattiero-caseari è considerato la principale via di esposizione umana a MAP e molti studi hanno rilevato la presenza sia di DNA che del batterio vitale nei formaggi venduti al dettaglio. Poiché MAP non è in grado di moltiplicarsi al di fuori dell'ospite, la sua concentrazione nel prodotto trasformato può solo diminuire. Lo studio è rivolto a verificare l'efficacia delle fasi di produzione e conservazione del formaggio nella inattivazione di MAP. Si ritiene che il punto critico nel processo di produzione della mozzarella sia la fase di riscaldamento e filatura della cagliata in acqua ad alta temperatura (da 65 a 80 °C), come precedentemente osservato per altri patogeni (ad es. *E. coli*, *A. butzleri* e *L. monocytogenes*). Per questo motivo, in un primo momento, è stato valutato l'impatto di questa fase sulla sopravvivenza di MAP. La sperimentazione, ripresa dopo il lockdown nazionale, ha permesso di determinare i valori di D-value e Z-value. Per la determinazione di questi valori è stato deciso di utilizzare un cocktail di ceppi (ceppi di campo e ceppo di riferimento ATCC 19698), in modo da considerare la variabilità relativa ad ogni singolo ceppo. I risultati ottenuti sono stati presentati al Congresso internazionale sulla Paratubercolosi che si è tenuto nel giugno 2022 a Dublino sotto forma di comunicazione orale e al congresso Nazionale SIDILV tenutosi ad Ischia nel mese di settembre 2022 sotto forma di poster. Inoltre i dati relativi allo studio della sola cagliata sono stati sottomessi alla rivista *Frontiers in Microbiology* come pubblicazione scientifica e il lavoro è in corso di revisione da parte degli autori e dei revisori. E' stato inoltre studiato l'intero processo di produzione della mozzarella, valutando la sopravvivenza di MAP a tre temperature (65, 75 e 80°C), una permissiva, una intermedia e una meno permissiva (temperatura di 80°C). Tali dati saranno oggetto di una futura pubblicazione. Infine, si è chiusa l'indagine sulla presenza di MAP su prodotti in commercio. Tale studio di sorveglianza, ancorché il campionamento sia stato piuttosto limitato (circa 70 campioni analizzati), non ha permesso né di rilevare campioni positivi in PCR (presenza di DNA di MAP), né di isolare alcun ceppo. Questo suggerisce come effettivamente il processo di produzione della mozzarella sia ragionevolmente efficace nell'abbattere una contaminazione da MAP presente nel latte.

Progetto di ricerca corrente IZS LE 2020/009: “Automazione delle metodiche per la rilevazione degli acidi nucleici di *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (MAP) in campioni diagnostici. (Responsabile scientifico M. Ricchi).

Il progetto ha avuto inizio il 31.12.2020 e terminerà il 30.12.2022 (Proroga richiesta, in attesa di ricevere conferma dal Ministero della Salute).

Tale progetto ha visto nel primo anno la messa a punto di un protocollo di estrazione di DNA da feci da sottoporre a metodica qPCR per la rilevazione di MAP. Nell'ambito del progetto è stata messa a punto una formulazione idonea del buffer di lisi e dei buffer di lavaggio, impiegando, come reattivo chiave, il tiocianato di guanidina, composto in grado di rimuovere molte delle sostanze inibitrici la reazione di PCR. L'utilizzo di tale reattivo ha infatti permesso di eliminare molti dei composti inibitori la reazione di PCR (es acido umico, Sali biliari etc etc), normalmente presenti nelle feci. Tali reattivi sono stati utilizzati per la creazione di un kit di estrazione su piattaforma Nimbus 400 (Hamilton). Repliche del DNA così estratto sono state saggiate mediante la qPCR già validata per la ricerca di MAP dalle feci. La sensibilità analitica e la ripetibilità sono risultate sovrapponibili a quelle del metodo validato non automatizzato in uso. Nelle prossime fasi verrà completato lo sviluppo di un kit che sarà montato su piattaforma in modo da consentire la fase di estrazione del DNA in maniera automatica e senza l'ausilio dell'operatore, se non per caricare i reattivi e svolgere la parte preanalitica del metodo. Inoltre, in questo progetto sono stati inclusi lo sviluppo e la validazione della metodica digital PCR per la rilevazione di MAP dalle feci. Gli esperimenti sono ancora in corso ma si prevede di validare la metodica sviluppata in accordo con la ISO 20395:2019, documento dedicato a questo tipo di metodiche.

Progetto di ricerca corrente IZS LE 2019/010: "Rischio di infezione da paratubercolosi al pascolo: contributo di ruminanti domestici e selvatici" (Responsabile Scientifico C. Garbarino).

Il progetto ha avuto inizio il 20.12.2019 ed è terminato il 19.05.2022 (Progetto prorogato). Gli animali selvatici e quelli domestici, nelle fasi cliniche e subcliniche dell'infezione, diffondono MAP nell'ambiente principalmente attraverso le feci; essendo MAP caratterizzato da elevata resistenza ambientale, la trasmissione al pascolo attraverso ingestione di alimenti contaminati da feci infette costituisce il fattore di rischio centrale per la diffusione della malattia. Di conseguenza, il pascolo, quando condiviso da diverse popolazioni, può costituire un anello debole nell'ambito dei piani di contenimento della malattia. I risultati di una precedente ricerca (2011-2015) nell'area lombarda del Parco Nazionale dello Stelvio (SO) avevano rilevato una prevalenza del 20% di MAP nella popolazione di cervo a vita libera. I ceppi di MAP isolati erano tutti di Tipo II, con un profilo allelico riscontrato coincidente a quelli più diffusi anche nel bovino. Inoltre, ogni anno vengono monticati animali domestici nel Parco, ma la loro situazione sanitaria nei confronti della paratubercolosi non è sempre nota, non essendo obbligatoria l'adozione di programmi di controllo della malattia. Obiettivo dello studio era definire il contributo dei ruminanti domestici e selvatici, bovini e cervi in particolare, nella contaminazione da MAP del pascolo, attraverso l'analisi di feci prelevate dal suolo, con l'intento di fornire indicazioni utili per la gestione dei ruminanti domestici e selvatici (cervi in particolare) nel Parco. Il campionamento ambientale ha il vantaggio di non richiedere la cattura e il

contenimento degli animali e di essere applicabile anche in periodi in cui questi non sono presenti sul pascolo. Nel corso delle stagioni 2020 e 2021 sono state raccolte direttamente dal pascolo feci di cervo (2020 N= 470 ; 2021 N= 1338) e bovino (2020 N= 287; 2021 N= 662) con differenti disegni di campionamento (distance sampling, randomizzato ecc). I campioni sono stati analizzati mediante Real-time PCR per la presenza di MAP. I campioni positivi sono stati analizzati mediante digitalPCR, per quantificare la presenza di MAP, e quindi sottoposti a coltura. I ceppi di MAP isolati sono stati sottoposti a tipizzazione mediante analisi di loci mini- e micro-satelliti. Per quanto riguarda il primo anno, la percentuale di positività per MAP appare molto contenuta, ma distribuita su numerose aree campionate: in 6 aree su 12 campionate è stata rilevata la presenza di MAP nelle feci di cervo, mentre in 3 aree su 9 MAP è stata rilevato nelle feci di bovino. Nel corso del secondo anno la positività dei campioni di cervo si è ulteriormente ridotta (0,82%) e tutti i campioni di bovino sono risultati negativi. Confrontando le aree campionate nei due anni si rileva come le aree con maggiore positività coincidano. In particolare, la Val Furva (Area 4/ 2021), che comprende l'area Pastori Sobretta (Area 15 dell'anno 2020), insieme alla contigua Val Zebrù (area 5/2021), risultano le aree con maggiore positività. Quest'ultima area rappresenta un'area di svernamento dei cervi, dove le concentrazioni di questa specie risultano elevate, per le condizioni favorevoli (buona esposizione al sole, minor perdurare della neve al suolo, più elevata probabilità di reperire cibo), contribuendo potenzialmente alla diffusione di questa patologia densità-dipendente. Relativamente alla concentrazione di MAP, tutti i campioni esaminati con qPCR e dPCR e che sono risultati positivi hanno mostrato valori bassi, tipici degli animali basso-escretori (da 1-100 UFC/g). E' stato possibile isolare in coltura ceppi di MAP solo da campioni fecali di cervo; lo scarso numero di campioni coltivabili potrebbe dipendere dalla concentrazione molto bassa di MAP nelle feci e dalla possibile riduzione della vitalità legata alla permanenza delle feci sul pascolo in condizioni ambientali sfavorevoli. In relazione a questo aspetto, la specie cervo sembrerebbe contribuire maggiormente al grado di infezione del pascolo. D'altro canto, considerando i dati relativi alle masse fecali che sono maggiori nel caso del bovino, e che le cariche batteriche su grammo di feci sono analoghe, la specie bovina potrebbe essere identificata come la maggiore fonte ambientale di MAP. I campioni positivi sottoposti a coltura e tipizzati hanno mostrato lo stesso genotipo INMV1, già descritto nel cervo da lavori precedenti (Galiero et al., 2018) e fra i più diffusi nei bovini a livello mondiale. I risultati dell'indagine confermano il rischio di infezione al pascolo per le specie sensibili, ma i livelli contenuti di positività per MAP, notevolmente ridotti rispetto alle indagini precedenti, risultano incoraggianti dal punto di vista sanitario. Per quanto riguarda il cervo anche l'ulteriore campionamento per la ricerca di MAP sulle valvole ileo-ciecali dei cervi abbattuti nel corso della stagione 2021-2022, ha confermato una drastica riduzione di prevalenza. I piani di contenimento della popolazione di cervo reiterati negli anni potrebbero aver giocato un ruolo chiave, diminuendo la popolazione sensibile. Anche per quanto riguarda la specie bovino, i dati delle analisi effettuate sugli animali ed anche quelli relativi a esami retrospettivi sono in linea con quanto osservato tramite il

campionamento ambientale, che indica una prevalenza molto limitata. L'indagine ottempera alle indicazioni del recente Regolamento (UE) 2016/429, "Animal Health Law", che include la paratubercolosi nelle malattie per le quali è prevista la sorveglianza in bovini, ovini, caprini e cervidi. I dati ottenuti appaiono incoraggianti dal punto di vista sanitario e consentono agli allevatori di iniziare un percorso indirizzato ad ottenere una qualifica sanitaria, prevista dalle linee guida nazionali per il controllo della paratubercolosi e importante anche dal punto di vista commerciale per i prodotti lattiero-caseari locali. I risultati ottenuti sono stati presentati al Congresso internazionale sulla Paratubercolosi che si è tenuto nel giugno 2022 a Dublino ed al Convegno: "Conservation Medicine and Wildlife health International Seminar", che si è tenuto a Teramo sempre nel giugno 2022, sotto forma di comunicazione orale.

Ricerca Corrente come Unità Operativa

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

- Progetto di ricerca corrente IZS 2018/106 (PLV): "Valutazione del profilo immunitario delle cellule T nella diagnosi precoce della malattia di Johne's" (Responsabile scientifico: M.S. Gennero). Il progetto è iniziato il 20.12.2018 ed è terminato il 20.05.2022 (progetto prorogato).
- Progetto di ricerca corrente IZS 2018/104 (PLV): "L'interpretazione dei dati di sequenziamento dell'intero genoma nello studio delle dinamiche d'infezione di *M. bovis* e *M. paratuberculosis*: quanto si adatta l'approccio matrice SNPs?" (Responsabile scientifico: M. Goria). Il progetto è iniziato il 20.12.2018 ed è terminato il 20.05.2022. Il C.R.N. è stato coinvolto per valutare l'utilizzo di dati ottenuti con whole genome sequencing al fine di verificare l'origine e il possibile percorso epidemiologico di alcuni isolati di MAP provenienti da capre allevate per la produzione di formaggi tipici locali.
- Progetto di ricerca corrente IZS LE 2018/005: "Analisi di parametri produttivi e loro correlazione con lo stato di benessere in allevamenti di capra da latte" (Responsabile scientifico A.Gaffuri). Il progetto è iniziato il 31.12.2018 ed è terminato il 29.11.2021 (progetto prorogato).
- Progetto di ricerca corrente IZS 2019/101 (UM): "Studio dei pathways immunopatogenetici del bovino in corso di infezione da *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* per comprendere i meccanismi di resistenza alla Paratubercolosi bovina". (Responsabile scientifico P.Mazzone) Il progetto è iniziato il 16.12.2019 e terminerà il 16.05.2023.
- Progetto di ricerca corrente IZS LE PRC 2021/110 (UM): "Valutazione dei livelli di espressione dei microRNA e il loro impiego come biomarkers nella Paratubercolosi bovina (MycomiRNA)" (Responsabile scientifico P.Mazzone). Il progetto è iniziato 16.12.2021 e terminerà il 16.12.2023.

Ricerca Finalizzata

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

Nulla da segnalare.

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

- Material Transfer Agreement con l'Istituto Spallanzani di Roma (data avvio 16.11.2016; data scadenza 15.11.2021). L'obiettivo del progetto è valutare l'uso della tecnologia MALDI-TOF per l'identificazione di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) e un suo eventuale impiego nella sub-tipizzazione dei ceppi.
- Accordo di collaborazione scientifica (data avvio 20.12.2018; data scadenza 19.12.2021) con Università di Milano, Dipartimento di Medicina veterinaria, Centro clinico veterinario e zootecnico sperimentale (Lodi), finalizzato allo studio delle Micobatteriosi negli animali.
- Accordo di collaborazione scientifica (data avvio 05.08.2022; data scadenza 04.08.2027) con Università degli Studi della Tuscia, Dipartimento per l'innovazione dei Sistemi Biologici, agroalimentari e forestali, Viterbo, per una ricerca sull'epidemiologia e sull'evoluzione dei ceppi di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e Micobatteri appartenenti al gruppo MAC, isolati da diverse fonti e specie animali, attraverso analisi di dati ottenuti mediante sequenziamento di nuova generazione.

Aggiornamento e formazione professionale

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

Il C.R.N. (C.Garbarino) ha organizzato per i mesi di ottobre e novembre 2021 la realizzazione di un corso FAD relativo a "Paratubercolosi nell'allevamento caprino e aspetti di benessere e biosicurezza" sul portale FAD dell'IZSLER.

- **Convegni/congressi che il C.R.N. ha organizzato o a cui ha partecipato**

Il C.R.N. ha partecipato:

- alla Giornata delle ricerche (A.Filippi, F.Barsi, S.Russo) organizzata da IZSLER in data 11.11.2021, con presentazione dei risultati preliminari dei Progetti di Ricerca Corrente PRC 2019/010 e PRC 2018/011 (presentazione orale di A.Filippi e F.Barsi);
- all'ottavo Paratuberculosis Forum 2022, Dublino 12.6.2022 (N. Arrigoni, C.Garbarino, M.Ricchi);
- al 15th International Colloquium on Paratuberculosis, Dublino, dal 14 al 18 giugno 2022 (N. Arrigoni, C. Garbarino, M.Ricchi, S.Russo, F.Barsi), presentando i seguenti lavori scientifici:
 1. "Heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: inactivation kinetics during the production process of Mozzarella cheese." F.Barsi, E.Cosciani-Cunico, S.Russo, E.Dalzini, A.Filippi, G.Cammi, N.Arrigoni, P.Daminelli, N.Losio, C.Garbarino, M.Ricchi (comunicazione orale di F. Barsi).

2. "Exposure to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Alpine pastures (Northern Italy): evaluation of cattle and red deer (*Cervus elaphus*) contribution through environmental faecal samples." A.Filippi, C.Luzzago, M.Nava, A.Forti, S.Russo, F.Barsi, L.Corlatti, L.Pedrotti, A.Bianchi, M.Ricchi, N.Arrigoni, C.Garbarino (comunicazione orale di M.Ricchi).
 3. "Validation of a IS900-qPCR assay for the detection of paratuberculosis in faeces according to the OIE - Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious disease". S.Russo, G.Galletti, A.Filippi, N.Arrigoni, C.Garbarino, M.Ricchi (poster).
- al Convegno: "Conservation Medicine and Wildlife health International Seminar", Teramo 16-17.06.2022 (C.Garbarino) con una presentazione dal titolo: "Exposure to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on Alpine pastures (Northern Italy): evaluation of cattle and red deer (*Cervus elaphus*) contribution through environmental faecal samples". A.Filippi, C.Luzzago, M.Nava, A.Forti, S.Russo, F.Barsi, L.Corlatti, L.Pedrotti, A.Bianchi, M.Ricchi, N.Arrigoni, C.Garbarino (comunicazione orale di C.Garbarino).
 - al XXI congresso Nazionale della Società di Diagnostica di laboratorio Veterinaria (SIDILV), Ischia, 7-9 settembre 2022 (M.Ricchi, F. Barsi, C.Cortimiglia), presentando i seguenti lavori:
 1. "Studio sulla sopravvivenza di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* al processo di produzione della mozzarella". Barsi F., Cosciani-Cunico E., Russo S., Dalzini E., Filippi A., Cortimiglia C., Cammi G., Arrigoni N., Daminelli P., Losio M.N., Garbarino C., Ricchi M. (poster)
 2. "Validazione di un metodo SI900-qPCR per la ricerca di *Mycobacterium avium* subs. *Paratuberculosis*". Russo S., Galletti G., Garbarino C., Cortimiglia C., Arrigoni N., Ricchi M. (poster)
 3. "Studio per la validazione di un metodo di quantificazione assoluta di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mediante Digital PCR". Russo S., Cavalli C., Cortimiglia C., Garbarino C., Arrigoni N., Barsi F., Ricchi M. (poster).
 - Il C.R.N ha organizzato, in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico del Mezzogiorno, un convegno nazionale dal titolo "Paratubercolosi bovina e bufalina: l'importanza di una visione interdisciplinare", il giorno 15.11.2021 in modalità webinar (Responsabili Scientifici: Esterina De Carlo, Chiara Anna Garbarino, Alessandra Martucciello).

Programma:

- 14:00 - Saluti Autorità
- 14:30 - Stato sulle conoscenze e novità legislative - Norma Arrigoni (CRN Paratubercolosi)
- 15:00 - Indagine di siero prevalenza in Regione Campania nella specie bufalina e applicabilità del Piano Nazionale - Esterina De Carlo (CRENBUF)
- 15:30 - Esperienze sul territorio campano - Carlo Ferrara (ASL CE)

- 16:00 - Diagnostica della paratubercolosi nei ruminanti - Matteo Ricchi (CRN Paratubercolosi)
 - 16:20 - Valutazione dei profili di resistenza genetica alla paratubercolosi - Piera Mazzone (IZSUM)
 - 16.40 - Analisi del microbiota intestinale. Può avere un ruolo nel controllo della paratubercolosi? - Luigi Orrù (CREA)
 - 17.00 - L'importanza della motivazione degli allevatori nella gestione della malattia in allevamento - Chiara Anna Garbarino (CRN Paratubercolosi)
 - 17:30 - Progress towards developing vaccines against mycobacterial pathogens – Prof. William Davis (Dipartimento di Microbiologia e Patologia Veterinaria, College of Veterinary Medicine, Washington State University).
- Il C.R.N. ha organizzato la riunione annuale dei referenti degli Istituti Zooprofilattici, il giorno 14.12.2021 in modalità webinar, a cui ha partecipato il Ministero della Salute (dott. R.Lomolino), con il seguente programma:
 - 8:30 - Introduzione lavori - N. Arrigoni
 - 9:00 - Novità relative alle linee guida nazionali - C. Garbarino
 - 9:30 - Situazione epidemiologica nelle specie sensibili - M. Tamba
 - 10:00 - Dati di diffusione nella specie bufalina - A. Martucciello
 - 10:30 - PTBC nella capra: esperienze e PGS - A. Gaffuri
 - 11:00 - Aggiornamento attività del Centro di referenza - A. Filippi, S. Russo, F. Barsi
 - 11:30 - Diagnostica (risultati dei ring test sierologico e diagnosi diretta) - M. Ricchi
 - 12:00 - Discussione
 - **Comitati scientifici e gruppi di lavoro a cui ha partecipato il personale del C.R.N.**
 - Il C.R.N. (N. Arrigoni) è stato incluso nel comitato tecnico scientifico del 15th International Association for Paratuberculosis Colloquium 2022, come valutatore dei lavori scientifici presentati.

Consulenze, attività di docenza, collaborazioni nazionali

1) Consulenze richieste ad esterni

Nulla da segnalare

2) Consulenze e pareri tecnici forniti ad esterni

Nel periodo considerato sono stati formulati dal C.N.R i seguenti pareri:

- Proposta di modifica delle *“Linee guida per l'adozione dei piani di controllo e certificazione nei confronti della paratubercolosi: aggiornamento”, per adeguamento al Regolamento (UE) 2016/429 e al relativo Regolamento di esecuzione 2018/1882”,* inviato al Ministero della Salute per la presentazione in Conferenza Stato Regioni in data 13.10.2021 e successivo protocollo 15580 del 17/07/2022.
- Parere fornito da parte del C.R.N. (Dott.M.Ricchi) come esperto WOAHA, al Dr. Saimre, Veterinarian Head of the Department, Tallin Zoological Garden (Estonia),

relativamente alla gestione dei casi di paratubercolosi negli animali allevati presso parchi zoologici. Oltre a fornire risposta ai quesiti relativi alla epidemiologia, alla gestione e all'appropriato utilizzo dei test diagnostici, veniva fornita documentazione a sostegno comprendente pubblicazioni scientifiche e linee guida internazionali.

- Nel periodo considerato presso il C.R.N. è stata effettuata, nei giorni 12 e 13.10.2021, una visita presso il C.R.N. del dott. Soares Felipe Joel Fernando, del Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli studi di Milano, per un approfondimento relativo alle metodiche diagnostiche per la paratubercolosi.

Il CRN è stato coinvolto in:

- tesi di laurea dal titolo "Rischio di infezione da paratubercolosi al pascolo in ambiente condiviso da ruminanti domestici e selvatici", di Alessia Bortoloni, Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Medicina Veterinaria, Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie delle Produzioni Animali (relatrice Camilla Luzzago, correlatrice Chiara Garbarino), discussa in data 16.12.2021;
- tesi di laurea dal titolo "Paratubercolosi nel bovino in alta Valtellina: indagine in allevamento e al pascolo", di Deldot Chiara, Università degli Studi di Milano, Facoltà di Medicina Veterinaria, Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in Medicina Veterinaria (relatrice Camilla Luzzago, correlatrice Chiara Garbarino) discussa in data 21.02.2022;
- tesi di Specializzazione dal titolo "Paratubercolosi nei cervidi: importanza della sorveglianza" di Filippo Barsi, Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Scuola di Specializzazione in Sanità animale, Allevamento e Produzioni Zootecniche. (relatrice Silvia Piva, correlatrice Chiara Garbarino), discussa in data 20.07.2022.

Attività di docenza

- Il C.R.N. (C. Garbarino) ha svolto attività di docenza il giorno 3.12.2021 in modalità webinar, al Corso di Laurea Magistrale in Scienze delle Tecnologie delle Produzioni Animali, Corso di gestione dei Piani di Profilassi, presso la Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, con una relazione dal titolo: "Paratubercolosi: linee guida per l'adozione di piani di controllo e assegnazione della qualifica sanitaria agli allevamenti e piano di gestione sanitaria".
- Il C.R.N. (N. Arrigoni) ha svolto attività di docenza il giorno 7.3.2022 in modalità webinar, al Corso di Laurea in Medicina Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, con una relazione dal titolo: "Paratubercolosi: aggiornamento".

Consulenze e collaborazioni europee

- E' attivo un accordo di collaborazione scientifica con il Centro di Referenza OIE Veterinary Research Institut di Brno (CZ), referente Dr. Petr Kralik, della durata di 5 anni (data di avvio: 25.6.2019; data di scadenza: 24.6.2024), che prevede lo scambio di

materiali e conoscenze tecniche, attraverso reciproci stage formativi, per la realizzazione di ricerche e pubblicazioni congiunte.

Consulenze e collaborazioni internazionali

- N.Arrigoni è stato membro del Board of Directors in rappresentanza dell'Italia nell'International Association for paratuberculosis, associazione scientifica mondiale dedicata allo studio della paratubercolosi fino a giugno 2022. A partire dalla stessa data (giugno 2022) il dott.M.Ricchi è stato eletto rappresentante dell'Italia nell'International Association for paratuberculosis;
- E' stato stipulato un Material Transfer Agreement con U.S. Department of Agriculture (Agricultural Research Service, Midwest area, Infectious Bacterial Diseases, Dott. Bannantine), per una collaborazione relativa allo scambio di ceppi di *Mycobacterium avium* subsp. *hominisuis*, da utilizzare in prove di tipizzazione comparativa con MAP mediante metodiche PCR e MALDI-TOF (scadenza novembre 2021).

Pubblicazioni scientifiche e divulgative

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

Su riviste con Impact factor:

1. Bolzoni L, Scaltriti E, Russo S*, Pongolini S, Garbarino C*, Leo S*, Arrigoni N*, Ricchi M*. Transmission patterns of a *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis clone within a single herd investigated by Whole Genome Sequencing. *Vet Microbiol.* 2021 Dec;263:109272. (IF **3,327**)
2. Hosseiniporgham S, Rebechesu L, Pintore P, Lollai S, Dattena M, Russo S*, Ruiu A, Sechi LA. A rapid phage assay for detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in milk. *Sci Rep.* 2022 Jan 10;12(1):475. (IF **4,379**)
3. Russo S*, Galletti G, Leo S*, Arrigoni N*, Garbarino C*, Ricchi M*. Validation of IS900- qPCR assay to assess the presence of *Mycobacterium avium* subs. paratuberculosis in faecal samples according to the OIE procedure. *Prev Vet Med.* 2022 Aug 6;208:105732. (IF **2,67**)

Su atti di congressi o riviste senza Impact Factor:

4. Russo S*, Galletti G, Filippi A*, Arrigoni N*, Garbarino C*, Ricchi M*. Validation of a IS900-qPCR assay for the detection of paratuberculosis in faeces according to the OIE "Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious disease". 15th International Colloquium on Paratuberculosis, Dublin, 12-16 June 2022.
5. Barsi F*, Cosciani-Cunico E, Russo S*, Dalzini E, Filippi A*, Cammi G*, Arrigoni N*, Daminelli P, Losio N, Garbarino C*, Ricchi M*. Heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: inactivation kinetics during the production process

- of Mozzarella cheese. 15th International Colloquium on Paratuberculosis, Dublin, 12-16 June 2022.
6. Filippi A*, Luzzago C, Nava M, Forti A, Russo S*, Barsi F*, Corlatti L, Pedrotti L, Bianchi A, Ricchi M*, Arrigoni N*, Garbarino C*. Exposure to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis on Alpine pastures (Northern Italy): evaluation of cattle and red deer (*Cervus elaphus*) contribution through environmental faecal samples. 15th International Colloquium on Paratuberculosis, Dublin, 12-16 June 2022.
 7. Barsi F*, Cosciani-cunico E, Russo S*, Dalzini E, Filippi A*, Cortimiglia C*, Cammi G*, Arrigoni N*, Daminelli P, Losio MN, Garbarino C*, Ricchi M* "Studio sulla sopravvivenza di *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis al processo di produzione della mozzarella". XXI Congresso Nazionale SIDILV, Ischia 7-9 Settembre 2022.
 8. Russo S*, Galletti G, Garbarino C*, Cortimiglia C*, Arrigoni N*, Ricchi M* "Validazione di un metodo SI900-qPCR per la ricerca di *Mycobacterium avium* subs. Paratuberculosis". XXI Congresso Nazionale SIDILV, Ischia 7-9 Settembre 2022.
 9. Russo S*, Cavalli C*, Cortimiglia C*, Garbarino C*, Arrigoni N*, Barsi F., Ricchi M* "Studio per la validazione di un metodo di quantificazione assoluta di *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis mediante Digital PCR". XXI Congresso Nazionale SIDILV, Ischia 7-9 Settembre 2022.
 10. Filippi A*, Luzzago C, Nava M, Forti A, Russo S*, Barsi F*, Corlatti L, Pedrotti L, Bianchi A, Ricchi M*, Arrigoni N*, Garbarino C*. "Exposure to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis on Alpine pastures (Northern Italy): evaluation of cattle and red deer (*Cervus elaphus*) contribution through environmental faecal samples". Conservation Medicine and Wildlife health International Seminar, Teramo 16-17/06/2022.
 11. Nava M, Garbarino C*, Ricchi M*, Epis S, Bianchi A, Ferrari N, Corlatti L, Barsi F*, Cortimiglia C *, Luzzago C: "Paratuberculosis in wild red deer (*Cervus elaphus*): ecological correlations to the probability of infection and contribution to pasture contamination. "Congresso Nazionale di Ecopatologia della fauna (SIEF)", 14-17 Settembre 2022, Udine.

Attività di referaggio:

Nel periodo considerato sono stati effettuati:

- 3 referaggi (N.Arrigoni) sulle materie di interesse del Centro di Referenza per riviste impattate (Animals, Frontiers, BMC Veterinary Research)
- 7 referaggi (M.Ricchi) sulle materie di interesse del Centro di Referenza per riviste impattate (Microorganisms, Plos One, Journal of Applied Microbiology (2), Tuberculosis, Animal health Research Review, Brazilian journal of microbiology)
- 1 referaggio (C.Garbarino) sulle materie di interesse del Centro di Referenza per rivista impattata (Veterinary Sciences).

Sito Web

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

Sul sito sono disponibili:

- una brochure informativa/divulgativa dal titolo "Paratubercolosi nell'allevamento della bovina da latte", destinato ad allevatori e veterinari, aggiornata con i criteri delle Linee guida nazionali.
(http://www.izsler.it/izs_bs/allegati/450/brochure17_12_13B.pdf).
- una brochure informativa/divulgativa dal titolo "Paratubercolosi nell'allevamento della capra da latte", destinato ad allevatori e veterinari.
http://archive.izsler.it/pls/izs_bs/v3_s2ew_consultazione.mostra_pagina?id_pagina=5710
- la versione italiana di un filmato divulgativo per allevatori, in cui sono illustrate le modalità di diffusione e di controllo dell'infezione. Il filmato è disponibile al link <https://www.youtube.com/watch?v=PNWmho9XMxQ>, come "tutorial paratubercolosi".
- una App per la valutazione del rischio in allevamento (iRAMP, Italian Risk Assessment and Management Planning), per tablet (Android, iOS, Windows), realizzata dal C.R.N. per la valutazione del rischio di ingresso e diffusione della paratubercolosi nelle aziende bovine e per l'individuazione delle misure gestionali idonee a ridurre i fattori di rischio, a disposizione dei veterinari pubblici e liberi professionisti. Lo schema di valutazione è stato ripreso dal "Manuale per il controllo della paratubercolosi negli allevamenti di bovine da latte", rielaborato ed adattato allo strumento informatico, in modo da renderlo facilmente leggibile e compilabile su tablet, direttamente in azienda.

Centro di Referenza Nazionale (C.R.N.) Paratubercolosi **Programmazione attività per il periodo 1.10.2022 – 30.09.2023**

Obiettivi strategici

Sviluppare maggiormente i rapporti nazionali ed internazionali.

A livello nazionale:

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

INDICATORI

- Realizzazione di un ring test per la diagnosi diretta (PCR e isolamento in coltura) che coinvolgerà i laboratori di tutti gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali;
- Partecipazione del Centro di Referenza a Progetti di Ricerca Corrente e/o Finalizzata, anche in collaborazione con altri IIZZSS;
- Organizzazione di un congresso nazionale;
- Organizzazione di una riunione con i referenti dei vari IIZZSS;
- Realizzazione di accordi di collaborazione scientifica e/o Material Transfer Agreement con vari IIZZSS.

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

INDICATORI

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

A livello internazionale:

- Acquisire maggiore visibilità in campo internazionale.

INDICATORI

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

Attività diagnostica

1. Standardizzazione e validazione di metodiche analitiche

Invio dei MMPP disponibili agli IIZZSS che ne faranno richiesta.

2. Produzione e distribuzione di reagenti

- Produzione e distribuzione di ceppi, sieri, DNA e standard biomolecolari per la diagnostica di MAP;

- Implementazione della “banca” dei materiali di riferimento (sieri, ceppi batterici).

3. Attività analitica

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

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

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

E' in previsione, per i primi mesi del 2021, la realizzazione di un *ring test* per la diagnosi diretta mediante PCR ed esame colturale da feci di bovino.

Al precedente ring test per la diagnosi diretta avevano aderito 22 laboratori appartenenti a 10 IZZSS.

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

E' in previsione:

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

6. Altre attività

E' in previsione la stesura di due brochure informative/divulgative, la prima destinata ad allevatori e veterinari:

- “Paratubercolosi nella bufala: conoscerla per combatterla”
- “Paratubercolosi nei cervidi”.

Epidemiologia

1. Creazione banca dati

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

2. Sviluppo e gestione di sistemi informativi

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

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

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

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

4. Aggiornamenti epidemiologici sulle materie di competenza

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

Ricerca e sperimentazione

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

Ricerca Corrente come Capofila

- Progetto di ricerca corrente IZS LE 2020/009: "Automazione delle metodiche per la rilevazione degli acidi nucleici di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) in campioni diagnostici" (Responsabile scientifico: M. Ricchi). Il progetto è stato avviato il 31.12.2020 e terminerà il 30.12.2022, ma è stata richiesta proroga per poter svolgere ulteriori analisi in modo da conferire maggior robustezza ai dati già ottenuti.

Ricerca Corrente come Unità Operativa

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

- Progetto di ricerca corrente IZS LE PRC 2021/110 (IZSUM): "Valutazione dei livelli di espressione dei microRNA e il loro impiego come biomarkers nella

Paratuberculosis bovina (MycomiRNA)” (Responsabile scientifico P.Mazzone). Il progetto è iniziato 16/12/2021 e terminerà il 16.12.2023.

- Progetto di ricerca corrente in collaborazione con IZSME: “Valutazione di differenti biomarkers d’infezione da micobatteri nella bufala mediterranea (*Bubalus bubalis*) e nel bovino (*Bos taurus*)”. (Responsabile scientifico Alessandra Martucciello). Il progetto verrà attivato presumibilmente entro la fine del 2022.

Ricerca finalizzata

Nulla da segnalare.

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

Nulla da segnalare.

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

E’ in corso di definizione un accordo di collaborazione scientifica con il Centro di Genomica e Bioinformatica del Consiglio Regionale per la ricerca in agricoltura e l’analisi dell’economia agricola (CREA) di Fiorenzuola (PC), per uno studio relativo al genoma di ceppi di *Mycobacterium avium* subsp.*paratuberculosis* e ulteriori analisi bioinformatiche volte alla ricostruzione e caratterizzazione dei genomi o dei metagenomi sequenziati nonché a tutte le analisi che possono risultare utili a sostenere le indagini epidemiologiche relative alla diffusione della paratuberculosis.

Aggiornamento e formazione professionale

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

- Nulla in previsione

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

- E’ in previsione la partecipazione alla 30° Conferenza della Commissione Regionale WOAHA per l’Europa, Catania, dal 3 al 7.10.2022 (M.Ricchi), con la presentazione di un poster dal titolo: “Paratuberculosis: building infrastructures for an effective control and risk assessment in Italy”. Ricchi M, Garbarino C, Massella E, Arrigoni N.
- E’ in previsione l’organizzazione parte del C.R.N del “IX “Congresso nazionale sulla paratuberculosis”, in collaborazione con Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali, Università degli Studi di Milano, in data 27.01.2022. (Evento ECM in presenza. Responsabile scientifico: N.Arrigoni)
Programma:
 - 8:30: Saluti e introduzione al Convegno (Ministero, CRN, Unimi)
 - 9:00: Piani per la paratuberculosis nel mondo, punti di forza e criticità (D.Kelton/University of Guelph, Canada)

- 10:00: Linee guida Nazionali: novità alla luce di AHL e decreti attuativi (CA Garbarino, CRN Paratubercolosi).
- 10:40: Paratubercolosi in Lombardia: facciamo il punto (M.Boldini, IZSLER)
- 11:10: Paratubercolosi, benessere e biosicurezza nella capra da latte: indagine in allevamenti del Nord Italia (A. Gaffuri, IZSLER)
- 11:40: Paratubercolosi nella fauna selvatica: l'esperienza nel Parco dello Stelvio (C.Luzzago, UNIMI)
- 12:10: MAP e Sicurezza Alimentare: focus (M.Ricchi, CRN Paratubercolosi)
- 12:40: Ruolo del veterinario aziendale nella gestione della paratbc (D.Kelton/University of Guelph, Canada)
- 13:10: Discussione, compilazione dei questionari e chiusura dei lavori

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

- Nel mese di dicembre 2022 il C.R.N. organizzerà una riunione dei referenti degli Istituti Zooprofilattici, con il seguente programma:
 - 8.30: Introduzione lavori (N. Arrigoni)
 - 9.00: Novità relative alle linee guida nazionali (C. Garbarino)
 - 10.00: Diagnostica (Risultati dei ring test sierologico) (N.Arrigoni)
 - 10.30: Diagnostica (Nuove attività del C.R.N: la Digital PCR) (C.Cortimiglia)
 - 11.00: Diagnostica (Nuove attività del C.R.N: Validazione metodiche PCR) (M.Ricchi)
 - 11.30-12.30: Discussione e presentazione contributi
- E' in programma inoltre che il C.R.N. partecipi ai seguenti gruppi di lavoro:
 - Gruppo di lavoro con Ministero della Salute, Regioni e IZZSS per il coordinamento del piano di intervento nazionale nei confronti della Paratubercolosi;
 - Board of Directors, International Association of Paratuberculosis (Rappresentante italiano: Dr. M.Ricchi).

Consulenze, attività di docenza, collaborazioni nazionali

1. Consulenze richieste ad esterni

Nulla da segnalare.

2. Consulenze e pareri tecnici forniti ad esterni

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

3. Attività di docenza

- Il personale del C.R.N. parteciperà in qualità di docente a giornate di aggiornamento per allevatori e veterinari in varie province italiane, organizzati da Facoltà Universitarie, ASL, Ordini professionali.
- E' in previsione per il giorno 4.11.2022 una docenza del C.R.N. (N.Arrigoni) al Corso di Laurea Magistrale in Scienze delle Tecnologie delle Produzioni Animali, gestione dei Piani di Profilassi, presso la Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, con una relazione dal titolo: "Paratubercolosi: linee guida per l'adozione di piani di controllo e assegnazione della qualifica sanitaria agli allevamenti e piano di gestione sanitaria".
- E' in previsione per il giorno 1.12.2022 una docenza del C.R.N. (C. Garbarino) in modalità webinar, al Corso di Laurea Magistrale in Scienze delle Tecnologie delle Produzioni Animali, Corso di gestione dei Piani di Profilassi, presso la Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, con una relazione dal titolo: "Paratubercolosi: linee guida per l'adozione di piani di controllo e assegnazione della qualifica sanitaria agli allevamenti e piano di gestione sanitaria".

Consulenze e collaborazioni europee

Nulla da segnalare

Consulenze e collaborazioni internazionali

Nulla da segnalare

Pubblicazioni scientifiche e divulgative

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

Su riviste con Impact factor:

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

- Isothermal inactivation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in curd simulating the stretching of Mozzarella cheese (in corso di valutazione da parte di una rivista impattata);
- Valutazione della sopravvivenza di MAP nel processo di produzione della mozzarella e survey nelle mozzarelle del commercio (risultati del PRC 2018/011, articolo in fase di stesura).
- Bovine paratuberculosis: results of a control plan in 64 dairy farms in a 4-year period, in collaborazione con l'Università degli Studi di Bologna (in corso di valutazione da parte di una rivista impattata);
- Welfare, biosecurity and paratuberculosis: a survey in 33 northern Italy dairy goat herds (risultati del PRC 2018/005);
- Diffusione della paratubercolosi nei cervi del Parco Nazionale dello Stelvio (risultati del PRC 2019/010).

Su atti di congressi o riviste senza Impact factor

- Nulla in previsione

Sito Web

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

Verranno pubblicate una brochure sulla paratubercolosi nell'allevamento bufalino e una scheda informativa sulla paratubercolosi nei cervi.

Verrà inoltre arricchita la sezione relativa alla documentazione fotografica.

Il Responsabile del Centro di Referenza Nazionale per la Paratubercolosi

Dott. Chiara Garbarino