



## **RELAZIONE ANNUALE**

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

(Periodo: dal 01.10.2023 al 30.09.2024)

## Sommario

<b>Parte A. Relazione sulla attività svolta dal 01.10.2023 al 30.09.2024 .....</b>	<b>5</b>
1. Premessa.....	5
2. Attività Diagnostica .....	5
2.1 Standardizzazione e validazione di metodiche analitiche.....	5
2.2 Produzione e distribuzione di reagenti.....	5
2.3 Attività analitica.....	6
2.4 Circuiti interlaboratorio organizzati dal C.R.N.....	7
2.5 Ring test a cui ha partecipato il personale del C.R.N. ....	8
3. Epidemiologia .....	8
3.1 Creazione banca dati .....	8
3.2 Sviluppo e gestione di sistemi informativi.....	8
3.3 Studio, sviluppo e gestione di sistemi di sorveglianza, verifica e controllo .....	8
3.3.1 Linee guida e qualifiche allevamenti in Banca Dati Nazionale .....	8
3.3.2 Piano regionale di controllo e certificazione nei confronti della Paratubercolosi bovina in Regione Emilia Romagna – anno 2023.....	13
3.3.3 Piano regionale di controllo e certificazione nei confronti della Paratubercolosi bovina in Regione Lombardia.....	15
3.3.4 Manuali per il Controllo della Paratubercolosi .....	18
4. Aggiornamenti epidemiologici sulle materie di competenza.....	18
4.1 Raccolta di dati di diffusione di infezione sul territorio italiano .....	18
4.2 Dati sui focolai .....	21
5. Ricerca e sperimentazione .....	22
6. Aggiornamento e formazione professionale .....	25
7. Comitati scientifici e gruppi di lavoro a cui ha partecipato il personale del C.R.N. ....	26
8. Consulenze, attività di docenza, collaborazioni nazionali .....	27
8.1 Consulenze richieste ad esterni .....	27
8.2 Consulenze e pareri tecnici forniti ad esterni.....	27
9. Attività di docenza .....	28
10. Collaborazioni europee .....	28
11. Collaborazioni internazionali .....	28
12. Pubblicazioni scientifiche e divulgative .....	29
12.1 Su riviste con Impact factor: .....	29
12.2 Su atti di congressi o riviste senza Impact Factor:.....	29
13. Attività di referaggio:.....	29
14. Sito Web.....	30

<b>Parte B. Programmazione attività per il periodo 1.10.2024 – 30.09.2025.....</b>	<b>31</b>
1. Obiettivi strategici.....	<b>31</b>
1.1 A livello nazionale: .....	31
1.2 A livello internazionale:.....	31
2. Attività diagnostica .....	<b>31</b>
2.1 Standardizzazione e validazione di metodiche analitiche .....	31
2.2 Produzione e distribuzione di reagenti .....	32
2.3 Attività analitica.....	32
2.4 Circuiti interlaboratorio organizzati dal C.R.N.....	32
2.5 Circuiti interlaboratorio a cui parteciperà il personale del C.R.N. ....	32
2.6 Altre attività .....	32
3. Epidemiologia .....	<b>33</b>
3.1 Creazione banca dati .....	33
3.2 Sviluppo e gestione di sistemi informativi.....	33
3.3 Studio, sviluppo e gestione di sistemi di sorveglianza, verifica e controllo .....	33
3.4 Aggiornamenti epidemiologici sulle materie di competenza.....	33
4. Ricerca e sperimentazione .....	<b>33</b>
4.1 Progetti di ricerca finanziati dal Ministero della Salute (titolo, stato dell'arte dei lavori, ecc.) .....	33
4.1.1 Ricerca Corrente come Capofila .....	33
4.1.2 Ricerca Corrente come Unità Operativa .....	34
4.1.3 Ricerca finalizzata.....	34
4.2 Progetti di ricerca finanziati da altri Enti (titolo, stato dell'arte dei lavori, ecc.) .....	34
4.3 Altre ricerche (titolo, stato dell'arte dei lavori, ecc.) .....	34
5. Aggiornamento e formazione professionale .....	<b>36</b>
5.1 Corsi che il C.R.N. organizzerà o a cui parteciperà;.....	36
5.2 Convegni/congressi che il C.R.N. organizzerà o a cui parteciperà;.....	36
6. Comitati scientifici e gruppi di lavoro a cui parteciperà il personale del C.R.N. ....	<b>37</b>
7. Consulenze, attività di docenza, collaborazioni nazionali .....	<b>37</b>
7.1 Consulenze richieste ad esterni .....	37
7.2 Consulenze e pareri tecnici forniti ad esterni.....	37
7.3 Attività di docenza .....	38
7.4 Consulenze e collaborazioni europee.....	38
7.5 Consulenze e collaborazioni internazionali .....	38
8. Pubblicazioni scientifiche e divulgative .....	<b>38</b>
8.1 Su riviste con Impact factor: .....	38

8.2 Su atti di congressi o riviste senza Impact factor.....	38
9. Sito Web.....	39

**Consuntivo 2023-2024: periodo 1. 10.23 – 30.09.24.....40**

**Risorse ritenute necessarie per la realizzazione delle iniziative di intervento nel periodo 1.10.24-30.09.25.....43**

Allegato: Frontespizi delle 5 pubblicazioni elencate a pag 29

# Centro di Referenza Nazionale (C.R.N.) Paratubercolosi

## Parte A. Relazione sulla attività svolta dal 01.10.2023 al 30.09.2024

### 1. 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.

### 2. Attività Diagnostica

#### 2.1 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 II.ZZ.SS., a seguito di richieste specifiche.

IDENTIFICATIVO (documento inviato)	REV (documento inviato)	TITOLO (documento inviato)	IZS O ALTRI ESTERNI (cui è stato inviato il documento)	RINTRACCIABILITÀ SAQ-DOC	DATA INVIO
MP 09/078	6	METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DI MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS TRAMITE REAL TIME PCR IN FECI, LATTE E TESSUTI	IZSUM	151 E/2023	16/10/2023
MP 04/022	8	METODO DI PROVA INTERNO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI NEI CONFRONTI DI MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS DA SANGUE E LATTE TRAMITE ELISA INDIRETTA – KIT ID VET	IZSME	015E/2024	14/02/2024
MP 09/078	6	METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DI MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS TRAMITE REAL TIME PCR IN FECI, LATTE E TESSUTI	IZSSA	026E/2024	19/03/204
RV 09/078	3	REPORT DI VALIDAZIONE METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DI Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis TRAMITE REAL TIME PCR IN FECI, LATTE E TESSUTI REV. 5	IZSSA	026E/2024	19/03/204
MP 04/022	9	METODO DI PROVA NORMATO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI NEI CONFRONTI DI Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis DA SANGUE E LATTE TRAMITE ELISA INDIRETTA – KIT ID VET	IZSPLV (Torino)	072E/2024	28/06/2024
MP 04/022 A	0	DOCUMENTO CORRELATO AL METODO DI PROVA NORMATO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI NEI CONFRONTI DI Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis DA SANGUE E LATTE TRAMITE ELISA INDIRETTA – KIT ID VET	IZSPLV (Torino)	072E/2024	28/06/2024
PSV 04/022	3	PROTOCOLLO DI STUDIO E VALIDAZIONE METODO DI PROVA NORMATO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI NEI CONFRONTI DI Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis DA SANGUE E LATTE TRAMITE ELISA INDIRETTA – KIT ID VET	IZSPLV (Torino)	072E/2024	28/06/2024
RV 04/022	3	REPORT DI VALIDAZIONE METODO DI PROVA NORMATO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI NEI CONFRONTI DI Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis DA SANGUE E LATTE TRAMITE ELISA INDIRETTA – KIT ID VET –	IZSPLV (Torino)	072E/2024	28/06/2024

È frequente la richiesta di consulenza su problemi specifici riguardanti gli aspetti diagnostici, l'applicazione e l'interpretazione dei metodi di prova, nonché la consulenza relativa all'interpretazione del regolamento (EU) 2016/429 nei confronti della paratubercolosi.

#### 2.2 Produzione e distribuzione di reagenti

All'interno della Biobanca centralizzata IZSLER sono stoccati:

- campioni di siero liofilizzati, positivi e negativi per la presenza di anticorpi (test ELISA) nei confronti di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP);
- campioni di latte liofilizzati, positivi e negativi per la presenza di anticorpi nei confronti di MAP (test ELISA);
- ceppi batterici tipizzati mediante metodica molecolare, appartenenti alle specie:
  - 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 (positivi) e negativi per MAP;
- DNA di ceppi batterici (MAP);
- standard biomolecolari per qPCR.

Nel periodo considerato sono stati richiesti i seguenti materiali da parte di altri II.ZZ.SS.:

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sede di Sassari: 1 siero bovino positivo per paratubercolosi.
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Sede di Salerno: 1 siero positivo ed uno negativo per paratubercolosi di bovino, bufalo e capra.
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana, Sede di Roma: DNA estratto da ceppo di riferimento di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, da utilizzare come controllo positivo di reazione PCR.

## 2.3 Attività analitica

La paratubercolosi non è una malattia per la quale è prevista la conferma da parte del C.R.N. Nel periodo considerato sono stati eseguiti complessivamente 42.536 esami, di cui:

	<b>Non ufficiali</b>	<b>Ufficiali</b>	<b>Totale</b>
Coltura	7	7	14
Sierologia	26.805	14.434	41.239
PCR	186	1093	1279
<b>Totale</b>	<b>27.002</b>	<b>15.534</b>	<b>42.536</b>

L'intera attività analitica, nel periodo di riferimento (dal 01.10.2023 al 30.09.2024), è in leggera diminuzione (con una riduzione del 7% rispetto al medesimo periodo di riferimento dell'anno precedente 2022-2023), sia su campioni ufficiali che su campioni conferiti da privati.

I risultati dell'attività analitica soprariportata non permettono valutazioni di tipo epidemiologico, in quanto i campioni ricevuti dal laboratorio sono stati inviati dall'utenza 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) che influenzano il dato ottenuto.

In relazione alla emanazione delle nuove Linee Guida ed all'inserimento della paratubercolosi nella lista delle malattie previste dal Regolamento (UE) 2016/429, all'interno della categoria (e) da sottoporre a sorveglianza, era stato previsto un aumento dell'attività diagnostica, mentre invece come riportato si è osservata una leggera diminuzione della stessa. L'analisi delle cause porta a considerare che il calo possa essere ascrivibile al fatto che l'Associazione Regionale Allevatori Emilia Romagna (ARAER), regione dove il C.R.N. risiede e che costituisce il maggiore bacino di utenza per quanto riguarda l'attività analitica, ha accreditato un Laboratorio per le analisi sierologiche della paratubercolosi e pertanto le analisi in autocontrollo per le quali effettua il prelievo il personale dell'Associazione, che tradizionalmente venivano effettuate da IZSLER, vengono ora effettuate presso il Laboratorio ARAER.

Si sottolinea che, come indicato nelle Linee guida, le analisi effettuate nell'ambito dei piani di gestione sanitaria possono essere effettuate presso un laboratorio accreditato diverso da IZS e i relativi esiti devono essere resi disponibili al servizio veterinario AUSL competente ai fini dell'aggiornamento annuale delle qualifiche. Devono essere svolte dall'Istituto zooprofilattico sperimentale competente per territorio:  
le prove diagnostiche per l'ottenimento ed il mantenimento della qualifica sanitaria  
le prove diagnostiche per la conferma di caso sospetto.

#### **2.4 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 le metodiche ELISA utilizzate da ogni laboratorio partecipante nella routine per la diagnosi di paratubercolosi; il pannello è costituito da:

- 3 campioni di siero bovino (1 negativo e 2 positivi) in doppio cieco, per un totale di 6 campioni;
- 3 campioni di latte bovino (1 negativo e 2 positivi) in doppio cieco, per un totale di 6 campioni;
- 2 campioni di siero bufalino (1 negativo e 1 positivo) in doppio cieco, per un totale di 4 campioni;
- 2 campioni di siero ovino (1 negativo e 1 positivo) in doppio cieco, per un totale di 4 campioni;
- 2 campioni di siero caprino (1 negativo e 1 positivo) in doppio cieco, per un totale di 4 campioni.

Al circuito hanno aderito 33 laboratori appartenenti ai 10 II.ZZ.SS presenti sul territorio nazionale. I campioni sono stati inviati ai diversi laboratori iscritti al circuito interlaboratorio, il giorno 1 ottobre 2024. La scadenza prevista per la restituzione dei risultati è stata fissata per il giorno 31 ottobre 2024.

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

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

Il C.R.N. ha partecipato a:

- 1 prova inter-laboratorio (aprile 2024), organizzata a livello europeo da GD Animal Health (Deventer, The Netherlands), per esame sierologico su siero di sangue (8 campioni) e latte individuale bovino (8 campioni) mediante test ELISA. I risultati ottenuti dal C.R.N. sono risultati corretti nel 100% dei casi.
- 1 prova inter-laboratorio (agosto 2023), organizzata a livello europeo da QA Veterinary Laboratory Agency (UK), distribuzione 15692BA del PT0127, per coltura e PCR su feci. Anche in questo caso i risultati ottenuti sono risultati conformi agli attesi nel 100% dei casi.

## **3. Epidemiologia**

### **3.1 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 non vi sia congruenza, nel periodo di interesse, tra:

- il numero di aziende bovine con qualifica “Allevamento con casi clinici (PTC)” (n = 35) ed il numero di focolai di malattia registrati in SIMAN (focolai bovini n= 1);
- il numero di aziende caprine con qualifica “Allevamento con casi clinici (PTC)” (n = 0) ed il numero di focolai di malattia registrati in SIMAN (focolai caprini n= 3).

Si segnala inoltre che non sono stati registrati né in BDN né in SIMAN casi clinici/focolai relativi agli allevamenti ovini.

### **3.2 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 stesse, 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 nelle aziende da cui provengono i prodotti esportati;
- qualifica sanitaria assegnata all'allevamento nella Anagrafe Bovina, Ovina e Caprina in Banca Dati Nazionale (BDN).

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

### **3.3.1 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 tengono conto delle criticità emerse, di seguito riportate, e dell'inserimento della paratubercolosi nell'elenco delle malattie di categoria e) ai sensi del Regolamento (UE) 2016/429 e relativo Regolamento di esecuzione 2018/1882 e pertanto soggette a sorveglianza.

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

L'Accordo, ai sensi dell'articolo 4, comma 1, del decreto legislativo 28 agosto 1997, n. 281, tra il Governo, le regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano concernente: «*Linee guida per l'adozione dei Piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria agli allevamenti di specie sensibili (bovini, bufalini, ovini, caprini) nei confronti della paratubercolosi*», sancito dalla Conferenza Stato Regioni il 30 novembre 2022, è stato pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale Serie Generale n.10 del 13.01.2023.

Le principali modifiche, rispetto alle precedenti Linee guida, 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 attraverso 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, nonché eventuali accertamenti diagnostici in caso di sintomi compatibili con la paratubercolosi.
- 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, in questa fase, 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, 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 approvazione da parte dei Servizi Veterinari territorialmente competenti. Lo stato vaccinale del singolo capo deve essere riportato all'interno della Banca Dati Nazionale.

Le linee guida contengono due allegati portanti:

- i requisiti minimi per la stesura di un piano aziendale di controllo nei confronti della paratubercolosi negli stabilimenti infetti;
- i requisiti per l'ottenimento delle qualifiche sanitarie nei confronti della paratubercolosi.

Al momento attuale le nuove Linee guida sono state adottate da:

- Provincia autonoma di Bolzano (Bollettino Ufficiale della Regione Autonoma Trentino Alto Adige 23 febbraio 2023). Le Linee Guida vengono quindi integrate come segue:
  - Sono esclusi dall'applicazione del piano gli stabilimenti in cui vengono detenuti animali di specie sensibili alla paratubercolosi (bovini, bufalini, ovini e caprini) solo ed esclusivamente per la produzione di carne, senza che venga svolta alcuna attività di riproduzione.

- Negli stabilimenti da riproduzione che detengono bovini, bufalini, ovini e caprini, le visite di sanità animale in regime di autocontrollo da parte del veterinario/a aziendale o da altro veterinario/a incaricato/a dall'operatore devono essere svolte con cadenza almeno annuale.
- La macellazione di animali accertati come casi confermati o, se ritenuta necessaria, di quelli sospetti, viene disposta dal Servizio veterinario provinciale e deve essere eseguita entro 10 giorni dalla comunicazione. Per la macellazione, il proprietario o la proprietaria può richiedere l'indennizzo fissato dalla Giunta provinciale.
- Provincia autonoma di Trento (Reg. delib. n. 516, 24.03.2023). Le Linee guida sono state integrate come da Allegato A alla delibera, indicante in particolare disposizioni relative alla conduzione degli animali in alpeggio.
- Regione Emilia-Romagna, con deliberazione della Giunta Regionale 20.04.2023, N.592, pubblicata su BUR 10.05.2023.
- Regione Veneto, con deliberazione della Giunta Regionale N. 593 del 19.05. 2023, pubblicata su BUR del 16.06.2023.
- Regione Piemonte con deliberazione della Giunta Regionale N. 5 6591 del 13.03.2023.
- Regione Marche con deliberazione n. 1983 del 18.12.2023.
- Regione Campania
- Regione Toscana con Delibera n.345 del 03.04.2023

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 30.09.2024 per le singole Regioni (numero di allevamenti e relativa qualifica).

Complessivamente i dati mostrano un leggero aumento degli allevamenti con qualifica nel corso degli anni: la percentuale di allevamenti con qualifica era risultata essere 34,7% nel 2020-21; 35,2% nel 2021-22; 37,2% nel 2022-23, mentre nell'anno in corso è risultata pari al 38,5%.

Regione	ALLEVAMENTO CON CASI CLINICI	ALLEVAMENTO SENZA CASI CLINICI	ALLEVAMENTO A BASSO RISCHIO	ALLEVAMENTO NEGATIVO	ALLEVAMENTO CERTIFICATO	ALLEVAMENTO CERTIFICATO	ALLEVAMENTO CERTIFICATO	SENZA QUALIFICA	Totale complessivo	% CON QUALIFICA
	PTC	PT0	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5			
ABRUZZO		1						4.030	4.031	0,02%
BASILICATA		25			4			2.598	2.627	1,10%
CALABRIA		2	14		10	8	1	7.976	8.012	0,45%
CAMPANIA		774	3		1			8.380	9.158	8,50%
EMILIA ROMAGNA	10	5.047	20		39	6	14	545	5.707	90,45%
FRIULI VENEZIA GIULIA					2			1.591	1.593	0,13%
LAZIO		2	13		17	1	1	10.102	10.137	0,35%
LIGURIA		500	1		12			424	937	54,75%
LOMBARDIA		4.058	947		560	141	100	8.358	14.410	42,00%
MARCHE	2	469	12		18	10	4	1.906	2.424	21,37%
MOLISE	1	473	1		1			1.532	2.007	23,67%
PIEMONTE	6	8.119	234		257	118	102	1.836	11.146	83,53%
PUGLIA	2	783						3.005	3.790	20,71%
SARDEGNA	3	8.143	21		4			919	9.090	89,89%
SICILIA	6	2.981			256			7.080	10.323	31,42%
TOSCANA	1	668	2		14			2.425	3.110	22,03%
TRENTINO - ALTO ADIGE (BZ)	3	7.414						231	7.648	96,98%
TRENTINO - ALTO ADIGE (TN)		123	90		1.049	32	27	174	1.556	88,82%
UMBRIA	1				2			2.757	2.760	0,11%
VALLE D'AOSTA		1			1.451			352	1.804	80,49%
VENETO		884			430			9.378	10.692	12,29%
<b>Totale complessivo</b>	<b>35</b>	<b>40.467</b>	<b>1.358</b>	<b>4.126</b>	<b>316</b>	<b>249</b>	<b>812</b>	<b>75.599</b>	<b>122.962</b>	<b>38,52%</b>

Di seguito si riportano i dati relativi alle qualifiche degli **allevamenti bufalini** presenti in BDN al 30.09.2024 per le singole Regioni (numero di allevamenti e relativa qualifica). Complessivamente i dati sono in lieve aumento rispetto agli anni precedenti dove la percentuale di allevamenti con qualifica era risultata essere: 7,05% nell'anno 2021-2022; nell'anno 2022-2023 il 7,6 %; nell'anno in corso è risultata essere pari al 7,9%.

Regione	ALLEVAMENTO CON CASI CLINICI	ALLEVAMENTO SENZA CASI CLINICI	ALLEVAMENTO A BASSO RISCHIO	ALLEVAMENTO NEGATIVO	ALLEVAMENTO CERTIFICATO	ALLEVAMENTO CERTIFICATO	ALLEVAMENTO CERTIFICATO	SENZA QUALIFICA	Totale complessivo	% CON QUALIFICA
	PTC	PT0	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5			
ABRUZZO								19	19	0,0%
BASILICATA		1						24	25	4,0%
CALABRIA							1	16	17	5,9%
CAMPANIA		93						1112	1205	7,7%
EMILIA ROMAGNA		12						6	18	66,7%
FRIULI VENEZIA GIULIA								6	6	0,0%
LAZIO			2					699	701	0,3%
LIGURIA								2	2	0,0%
LOMBARDIA		18	5				2	49	74	33,8%
MARCHE		8						33	41	19,5%
MOLISE		2						8	10	20,0%
PIEMONTE		21				1		13	35	62,9%
PUGLIA		4						59	63	6,3%
SARDEGNA		2						2	2	100,0%
SICILIA		5						10	15	33,3%
TOSCANA		1						14	15	6,7%
TRENTINO - ALTO ADIGE (BZ)		4						4	4	100,0%
TRENTINO - ALTO ADIGE (TN)					1			1	1	100,0%
UMBRIA					1			26	27	3,7%
VENETO		3						88	91	3,3%
<b>Totale complessivo</b>		<b>174</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2184</b>	<b>2371</b>	<b>7,9%</b>

Come sopra riportato non sono stati registrati in BDN allevamenti con casi clinici, né di ovini né caprini.

Di seguito viene riportato lo stato di applicazione delle Linee Guida in regione Emilia Romagna e in Regione Lombardia, dove viene prodotto il 40% della produzione nazionale di latte. I dati sono stati forniti dagli Osservatori Epidemiologici (Sorveglianza Epidemiologica Emilia Romagna e Sorveglianza Epidemiologica Lombardia).

### 3.3.2 Piano regionale di controllo e certificazione nei confronti della paratubercolosi bovina in Regione Emilia Romagna - anno 2023

La Regione Emilia Romagna aveva adottato le Linee guida nazionali già nel 2013 ed ha recepito senza modifiche le più recenti Linee guida del 2023 con Delibera di Giunta RER 592/2023.

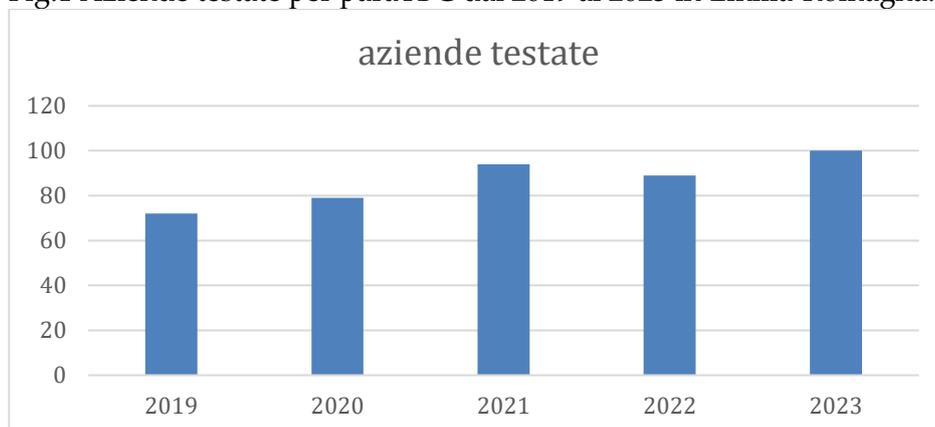
Dal 2014 i casi clinici di PTB sono soggetti a segnalazione obbligatoria. Alcuni monitoraggi effettuati nei primi anni stimavano la presenza dell'infezione in circa la metà degli allevamenti bovini, ma l'adesione al piano di controllo volontario da parte degli allevatori è ancora molto bassa (Tab. 1).

Tab. 1 Aziende aderenti al Piano dal 2019 al 2023 in Emilia Romagna

Anno	Aziende totali	Aziende aderenti al piano
2019	4789	63
2020	4627	60
2021	4419	32
2022	4144	60
2023	3930	76

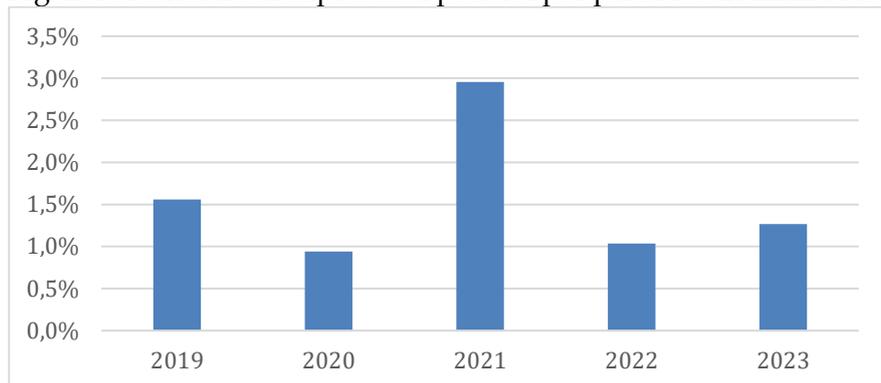
Anche se si tratta di numero piuttosto bassi, il numero di aziende controllate è aumentato nel corso degli anni (figura 1).

Fig.1 Aziende testate per paraTBC dal 2019 al 2023 in Emilia-Romagna.



La percentuale di animali risultati positivi rispetto al totale di quelli controllati si mantiene costante, pur con un lieve aumento nell'anno 2021 (Fig. 2).

Fig. 2. Percentuale di capi testati positivi per paraTBC in Emilia Romagna dal 2019 al 2023.



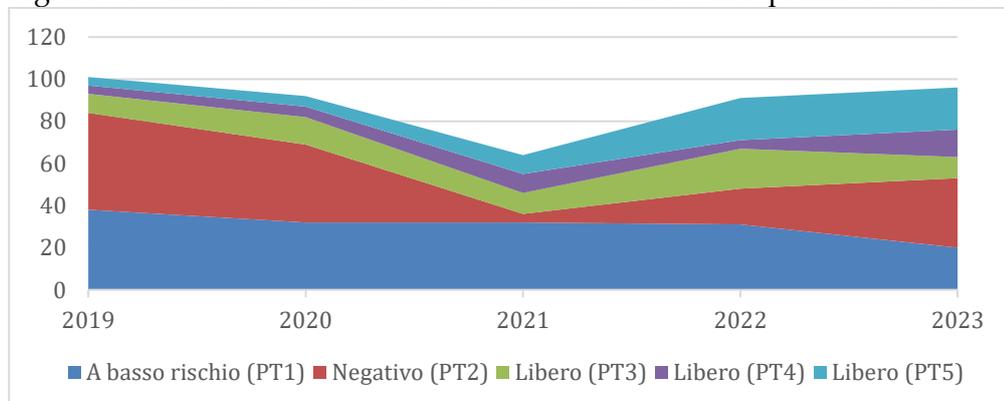
A fine 2023, solamente un centinaio di allevamenti regionali risultano avere iniziato il processo di certificazione di indennità dalla malattia (Qualifica sanitaria PT1 o superiore). Di questi, 43 possono fregiarsi della qualifica di allevamento libero da infezione (Tab. 2).

Tabella 2: Numero di allevamenti con qualifica sanitaria nel periodo 2019-2023.

Anno	A basso rischio (PT1)	Negativo (PT2)	Libero (PT3)	Libero (PT4)	Libero (PT5)
2019	38	46	9	4	4
2020	32	37	13	5	5
2021	32	4	10	9	9
2022	31	17	19	4	20
2023	20	33	10	13	20

Per quanto riguarda le qualifiche sanitarie, nel 2021-2022 è stata osservata una leggera diminuzione del numero di allevamenti con qualifica sanitaria da PT1 a PT5, questo è probabilmente dovuto agli effetti della pandemia da Covid, che ha ostacolato l'esecuzione di tutte le attività non prioritarie e rallentato anche l'esecuzione dei controlli per il raggiungimento/mantenimento della qualifica (Figura 3), mentre nei due anni successivi i numeri hanno ripreso a crescere.

Figura 3: Numero di allevamenti che hanno ottenuto una qualifica sanitaria nel periodo 2014-2022.



### 3.3.3 Piano regionale di controllo e certificazione nei confronti della paratubercolosi bovina in Regione Lombardia

La Regione Lombardia non ha ancora recepito le nuove Linee guida (gennaio 2023).

La stessa Regione aveva 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), tuttora in vigore, è rivolto principalmente a fornire indicazioni circa le modalità di certificazione del latte i cui derivati siano destinati all'esportazione verso paesi terzi. Sulla base del piano regionale lombardo, 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. 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 10 anni di applicazione delle Linee guida (2014-2023).

Il numero e la percentuale di aziende testate è aumentato nel corso degli anni (figure 1 e 2).

Figura 1: Numero di allevamenti totali, aderenti piano e testati in Lombardia dal 2014 al 2023.

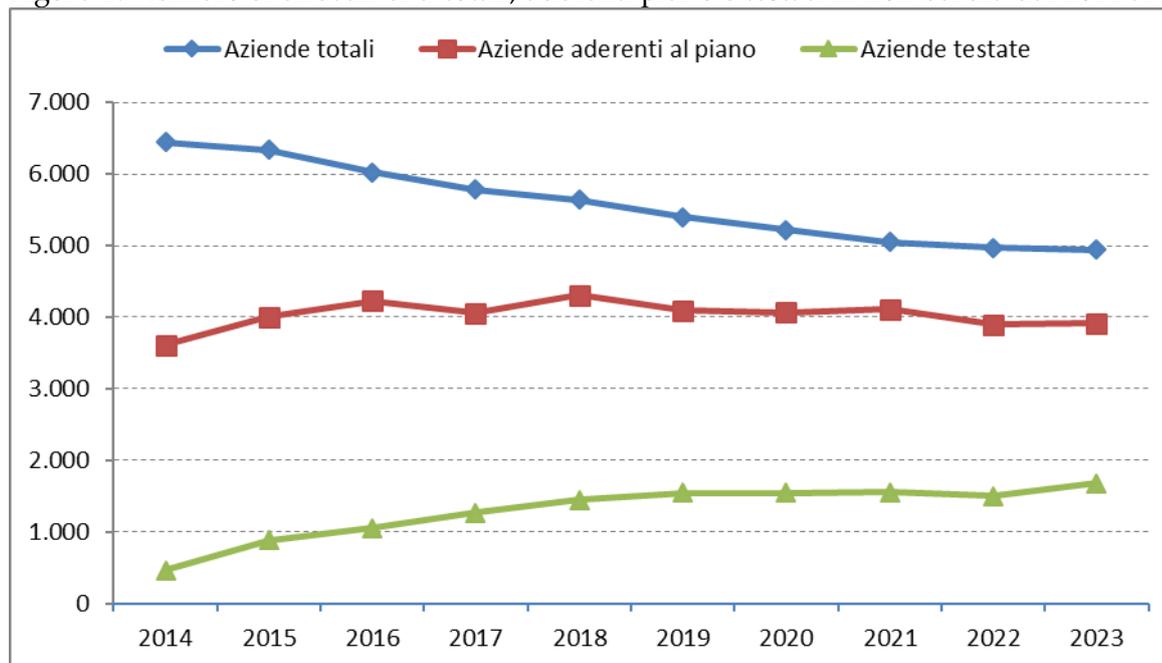
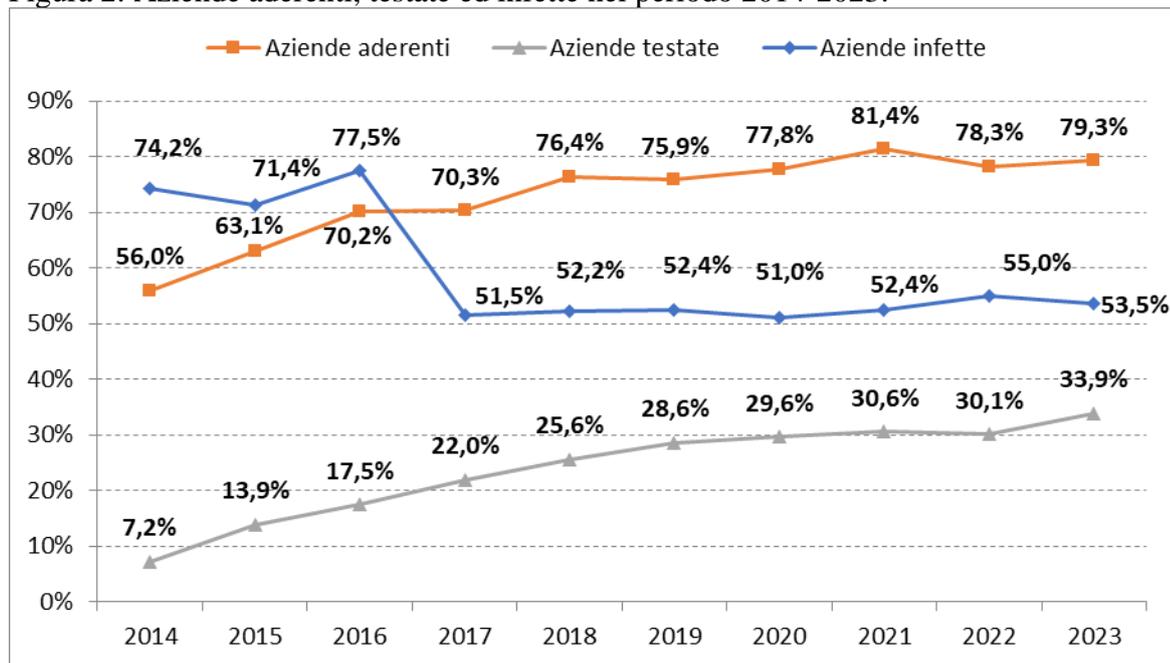
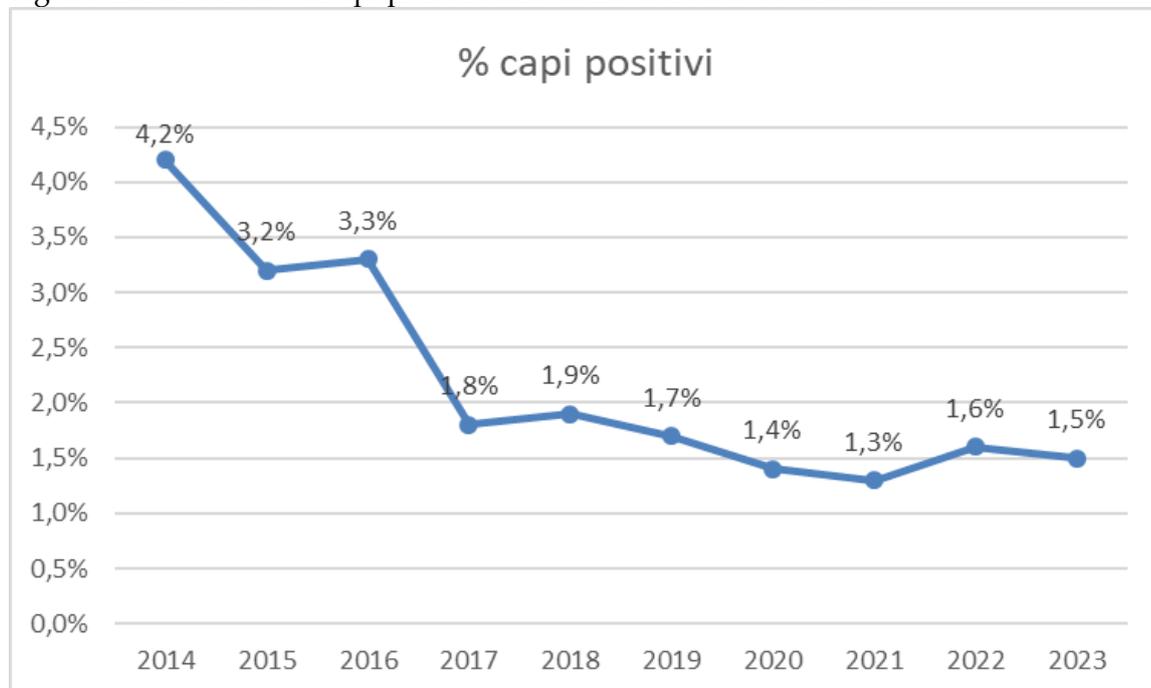


Figura 2: Aziende aderenti, testate ed infette nel periodo 2014-2023.



Nei 10 anni di applicazione, si osserva una riduzione delle aziende positive (dal 74,2% al 53,5%)(Figura 2) e degli animali positivi (dal 4,2% all' 1,5%)(Figura 3), nonostante una sostanziale stabilità negli ultimi anni.

Figura 3: Percentuale di capi positivi in Lombardia dal 2014 al 2023



Per quanto riguarda le qualifiche sanitarie, si registra un aumento graduale del numero totale di allevamenti con qualifica da PT1 a PT5 fino al 2020.

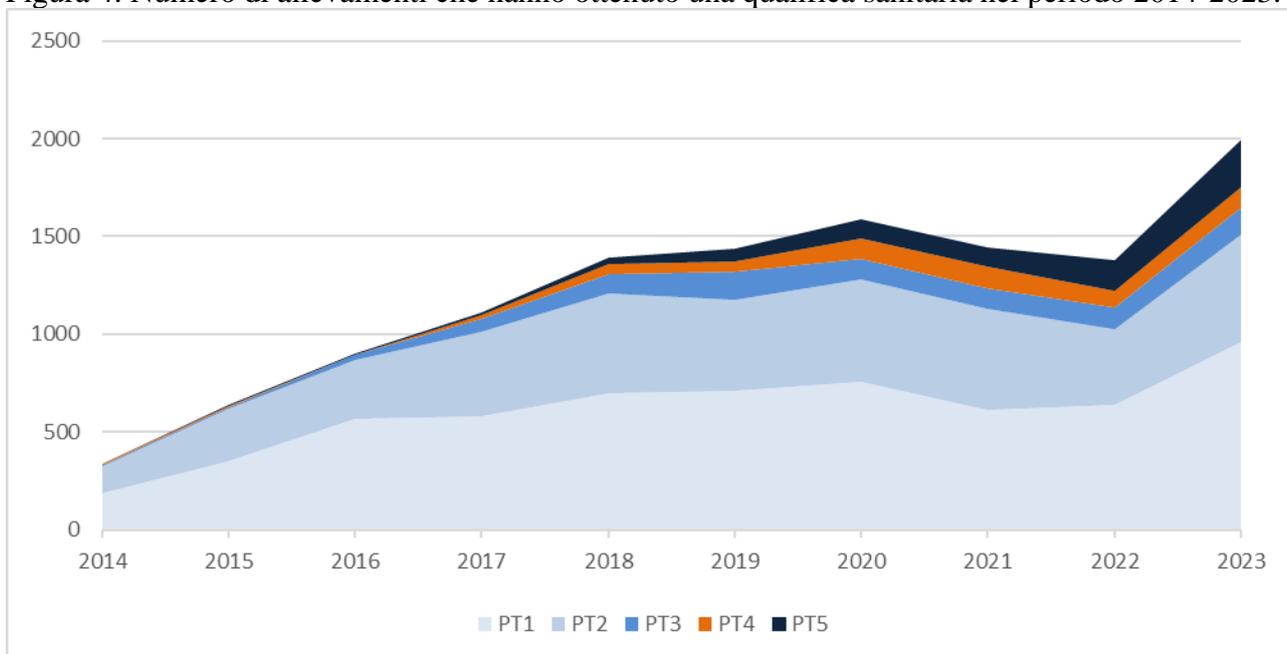
Nel 2021-2022 è stata osservata una leggera diminuzione del numero di allevamenti con qualifica sanitaria, per possibili contingenze negative (rallentamento delle attività di assistenza durante il periodo pandemico Covid, mancanza di compensazioni economiche, sia per gli animali abbattuti che per i test ELISA).

Questa lieve flessione è stata successivamente compensata da un incremento significativo del numero di allevamenti con qualifica nel 2023 (tabella 1, Figura 4).

Tabella 1: Numero di allevamenti con qualifica sanitaria nel periodo 2014-2023

Anno	Qualifiche sanitarie				
	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5
2014	187	137	10	2	4
2015	354	268	6	4	4
2016	567	303	22	5	7
2017	578	434	67	19	11
2018	700	507	102	49	31
2019	712	467	142	51	64
2020	760	518	108	106	99
2021	611	518	108	106	99
2022	638	390	106	86	156
2023	957	554	139	102	243

Figura 4: Numero di allevamenti che hanno ottenuto una qualifica sanitaria nel periodo 2014-2023.



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, 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, attività in cui è costantemente impegnato il C.R.N.

### 3.3.4 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](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](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](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 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 inquadrano la paratubercolosi tra le malattie di categoria E, per le quali è necessario da parte degli Stati Membri attivare un sistema di sorveglianza. Le nuove Linee guida sono state adeguate in tal senso.

### 4.1 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**.

Si segnala come le indagini eseguite mediante test ELISA su sangue individuale mostrino una prevalenza di allevamenti infetti superiore rispetto al dato ottenuto testando tramite test ELISA il latte di massa. Questo risultato è influenzato dalla strategia analitica adottata, considerando che l'impiego della metodica ELISA sul latte di massa mostra sensibilità inferiore al suo impiego su campione di sangue individuale e consente la rilevazione solo degli allevamenti a prevalenza intra-aziendale medio-alta.

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

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	2021	52,4%	1,3%	ELISA individuale siero	Arrigoni et al., 2023
Provincia Trento	2019	18,7%	2,0%	ELISA individuale siero	Dellamaria (comunicazione personale)

Relativamente al **patrimonio ovino e 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 individuale siero	Attili (2011)
Sicilia		Pecora 71,8% Capra 60,85%	4,5% 5,1%	ELISA individuale siero	Di Marco Lo Presti et al, 2024
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)
Piemonte, Trentino Alto Adige, Emilia Romagna, Lombardia	2019	capra 58%	7,4% (0,4%-17,4%)	ELISA individuale siero	Gaffuri et al, 2023

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 raccolti nell'ambito di un Progetto di Ricerca (IZS LE 2015/002)

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

Per quanto riguarda **gli ungulati selvatici**, si riportano di seguito i dati disponibili ottenuti, oltre che dai dati bibliografici, dalle attività previste dai Piani di monitoraggio regionali della fauna selvatica.

Regione	Anno	Specie	Esaminati in PCR	Prevalenza apparente	Riferimento bibliografico
Lombardia	2018-2022	Cervo	390	5.9%	Filippi et al, 2024
Trentino alto-adige	2015-2018	Cervo	102	18.63%	Galiero et al, 2018
Piemonte	1999-2004	Cervo	77	39%	Robino et al., 2008
		Capriolo	39	23%	
Piemonte	1998	Stambecco	Rilevati 2 animali positivi	/	Ferroglio et al. 2000

Per quanto riguarda la Regione Emilia Romagna, nell'ambito del Piano regionale di monitoraggio e controllo sanitario della fauna selvatica, nel corso del 2023 sono stati conferiti e analizzati in PCR per paratubercolosi 313 campioni di feci/valvole ileociecali da ruminanti selvatici.

Di questi è risultato positivo un solo campione\*, appartenente ad un capriolo in provincia di Reggio Emilia (vedi Tabella 1).

Tabella 1. Regione Emilia Romagna, 2023: Esami effettuati per ricerca MAP su feci/valvole ileociecali di ruminanti selvatici.

Provincia	Caprioli esaminati	Daini esaminati	Cervi esaminati
Piacenza	6	0	0
Parma	43	4	2
Reggio Emilia	39 (1 positivo)*	6	6
Modena	64	1	3
Bologna	30	0	0
Ferrara	7	9	0
Ravenna	21	10	0
Forlì Cesena	49	3	0
Rimini	10	0	0
<b>Tutte le province</b>	<b>269</b>	<b>33</b>	<b>11</b>

Per quanto riguarda la Regione Lombardia, nel corso del 2023, nell'ambito del Piano di monitoraggio fauna selvatica, sono stati conferiti e analizzati in PCR 11 campioni di feci/valvole ileo-ciecali da ruminanti selvatici (1 camoscio, 7 caprioli, 2 cervi, 1 daino).

E' stato rilevato un solo cervo positivo in provincia di Sondrio.

Relativamente all'anno 2024, i dati della Regione Lombardia sono disponibili online ed in continuo aggiornamento; alla data del 30/09/2024 sono stati conferiti e analizzati in PCR per Paratubercolosi 17 campioni da ruminanti selvatici (4 camosci, 8 caprioli, 4 cervi, 1 stambecco). E' stato rilevato un solo cervo positivo in provincia di Sondrio.

In Regione Umbria non esiste un piano di monitoraggio fauna strutturato, ma sono stati effettuati controlli relativamente alla paratubercolosi negli ungulati selvatici. In particolare sono state analizzate le valvole ciecali dei seguenti animali nel 2023: 13 caprioli, 1 daino, 1 cervo e sono risultati tutti negativi. Nel 2024 sono stati analizzati 2 caprioli, risultati negativi.

In Regione Campania è presente un Piano monitoraggio della fauna selvatica in cui non si parla espressamente di paratubercolosi, ma viene eseguita la ricerca di MAP in caso di segni suggestivi di malattia. Nel periodo di riferimento non sono state effettuate diagnosi.

#### 4.2 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:

Allevamenti con qualifica PTC assegnata nell'anno (Fonte: SIMAN: Dati aggiornati al 30/09/2024)

REGIONE	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	Totale
Campania										1		1
Emilia-Romagna	1	1	1			2	1					6
Lazio										2	1	3
Liguria									1	2		3
Lombardia						1						1
Marche				2								2
Piemonte	7	7	2				3	1			1	21
Puglia										2	2	4
Sardegna	2	2	2	2			1		1	1		11
Toscana	1											1
Trento	6	4	2									12
Umbria										1		1
ITALIA	17	14	7	4	0	3	5	1	2	7	4	65

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 nel Sistema Informativo SIMAN.

Gli allevamenti con qualifica PTC in BDN nel periodo considerato sono infatti 35 per quanto riguarda i bovini, a fronte di un solo focolaio registrato in SIMAN. Le notifiche in SIMAN,

che riguardavano in passato solo allevamenti bovini, nel 2024 includono a tre allevamenti caprini oltre a quello bovino. Questi dati non sono in linea con quanto registrato in BDN dove non risultando registrati allevamenti caprini con casi clinici.

## 5. 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 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 ed era previsto il termine il 30.12.2022 (Prorogato al 30.12.2023).

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 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (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. I buffer di lisi sono ora a disposizione e possono essere montati su piattaforma Nimbus 400, 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, che è stata sviluppata e validata in accordo con la ISO 20395:2019, documento dedicato a questo tipo di metodiche. Tale metodica è stata altresì inserita nel sistema qualità IZSLER e l'analisi è stata messa a disposizione dei richiedenti. Il progetto ha portato alla pubblicazione su rivista scientifica con *impact factor* della metodica di rilevazione del DNA di MAP a partire da feci bovine, validata in accordo con la procedura descritta nel capitolo 1.1.6 "*Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases*" del manuale WOAHA dedicato agli animali terrestri (Edizione 2021).

### ***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 II.ZZ.SS consulenza sulle metodiche analitiche ed eventuale attività di conferma:

- Progetto di Ricerca Corrente IZSLE 2023/007: "Indagine sulla presenza e circolazione dei micobatteri non tubercolari (NTM) negli allevamenti bovini in relazione al problema delle false positività sierologiche alla paratuberculosis bovina." (Responsabile scientifico: M.Gradassi) Il progetto è iniziato il 30.12.2023 e terminerà il 29/12/2025.
- Progetto di ricerca corrente IZSUM 2021/06 – IZS LE 2021/110: "Valutazione dei livelli di espressione dei microRNA e il loro impiego come biomarkers nella paratuberculosis bovina" (Responsabile scientifico P. Mazzone). Il progetto è iniziato 16.12.2021 ed è terminato il 16.12.2023.
- Progetto di Ricerca corrente IZS ME 2022/014 – IZS LE 2022/108: "Valutazione di differenti biomarkers d'infezione da micobatteri nella bufala mediterranea (*Bubalus bubalis*) e nel bovino (*Bos taurus*)" (Responsabile scientifico A. Martucciello). Il progetto è iniziato il 30.12.2022 e terminerà il 30.12.2024.

### ***Ricerca Finalizzata***

Nulla da segnalare.

- **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.)**

- Ricerca autofinanziata, Codice del Progetto AUTOFIN TESTDIAGNOST. "Quantificazione assoluta delle cellule di *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in campioni fecali bovini mediante lo sviluppo di un saggio digital PCR" (Responsabile scientifico C. Garbarino). Data avvio 01.03.2023; data di scadenza 01.03.2025.

Il Progetto si propone, tramite la quantificazione di MAP eliminato attraverso le feci dagli animali infetti, di definire le priorità degli interventi in allevamento (rimozione dei *super-shedders*), gestendo gli animali in relazione al loro potenziale di biocontaminazione ambientale ed evitando la riforma di possibili *passive-shedders*. A tale scopo viene proposto l'utilizzo della metodica digital PCR (dPCR), che consente in tempi rapidi la quantificazione diretta del numero di cellule batteriche presenti nelle feci, fornendo informazioni utili all'applicazione di piani di gestione sanitaria efficaci e sostenibili negli allevamenti bovini da latte, e riducendo nel contempo la contaminazione della catena alimentare. Dopo la validazione della metodica, si è dato avvio alle attività di campo e di laboratorio, e sulla base dei risultati sono state fornite indicazioni gestionali. Sono stati effettuati successivi campionamenti. Nel corso dei primi due campionamenti sono stati effettuati campioni di siero e di feci da tutti gli

animali con età superiori o uguali a 24 mesi. Sono stati effettuati esami sierologici mediante metodica ELISA che fornisce, oltre ad un risultato qualitativo (positivo/negativo), anche un valore semi quantitativo (espresso come valore S/P), che consente di categorizzare gli animali con diversi valori di positività.

Le feci sono state analizzate con metodica qPCR ed i campioni risultati positivi sono stati analizzati con dPCR al fine di quantificare l'escrezione di MAP e individuare gli animali a più elevata escrezione, da segregare prioritariamente. Gli animali risultati siero-negativi e con bassa escrezione di MAP sono stati identificati come potenziali *passive-shedder* quindi non da riformare, ma da tenere sotto controllo e rivalutare in base all'esito del campionamento successivo.

Nel corso del primo campionamento sono stati effettuati prelievi di sangue e feci da 1019 vacche ed è risultata una siero-prevalenza apparente del 7,3% ed una prevalenza apparente fecale del 6,5%; sono stati individuati 5 *Super Shedders* e 6 *High Shedders*. Nel corso del secondo campionamento sono stati effettuati prelievi di sangue e feci da 974 vacche e la siero-prevalenza apparente è risultata del 4,6%, mentre quella delle feci del 2,8%. Sono stati individuati 2 animali *Super Shedders* e 5 *High Shedders*.

Le indicazioni date all'allevatore sono state quelle di riformare con massima priorità gli animali *Super Shedders* seguiti dagli *High Shedder* e dagli animali sieropositivi con i valori S/P più elevati. Oltre a fornire una serie di indicazioni gestionali specifiche e imprescindibili per poter ottenere dei risultati (prima fra tutti l'allontanamento della rimonta dagli adulti) è stata sottolineata l'importanza di applicare stringenti misure di biosicurezza.

L'utilizzo della dPCR ha consentito di individuare in tempi rapidi gli animali da riformare con massima urgenza. La prevalenza aziendale è diminuita nel corso del periodo di studio, portando gli animali da una sieroprevalenza del 7,3% osservata nel corso del primo campionamento ad una sieroprevalenza del 4,4% nell'ultimo campionamento. Inoltre, si segnala come anche il numero di campioni a basso titolo o comunque non conclusivi si sia abbassato tra i due prelievi, suggerendo come la rimozione dei super shedders abbia portato ad un miglioramento generale della situazione sanitaria nei confronti della paratubercolosi. La dPCR si è dimostrata una metodica molto utile per fornire risultati quantitativi ed in tempi rapidi; rimane il problema della scarsa sensibilità della metodica (che pertanto non può essere utilizzata come metodica "di screening") e dei costi elevati. Infine, è in corso una valutazione genomica di tutti i ceppi circolanti all'interno dell'allevamento (sia isolati da animali che da campioni ambientali). Lo scopo finale è quello di valutare la presenza di differenti *lineages* all'interno dell'allevamento e verificare quali di questi sia quello più diffuso all'interno dell'allevamento stesso.

- 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.

- Accordo di collaborazione scientifica (data avvio 26.04.2023; data scadenza 25.04.2028) con Consiglio Regionale per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agricola (CREA), per una ricerca sull'epidemiologia e sull'evoluzione dei ceppi di *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* isolati da diverse fonti e specie animali, attraverso analisi di dati ottenuti mediante sequenziamento di nuova generazione.
- Accordo di collaborazione scientifica (data avvio 28.08.2023; data scadenza 28.08.2025) con Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali, per effettuare le attività di monitoraggio dello stato sanitario nei confronti della Paratubercolosi della popolazione di cervi a vita libera nel Parco Nazionale dello Stelvio e in aree limitrofe.
- Material Transfer Agreement con "National Service of Animal Health and Agrifood Quality, Buenos Aires, Argentina" (data avvio 19.06.2023; data scadenza 18.06.2028). L'obiettivo del MTA è scambiare materiale di riferimento per la diagnostica della paratubercolosi.
- Material Transfer Agreement con "Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail - Laboratoire de Ploufragan-Plouzanet-Niorte Francia" (data avvio 12.06.2023; data scadenza 11.06.2028). L'obiettivo del MTA è scambiare materiale di riferimento per la diagnostica della paratubercolosi.

## 6. Aggiornamento e formazione professionale

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

- Nell'ambito del XXII Congresso Nazionale della Società di Diagnostica di laboratorio Veterinaria (SIDILV), a Brescia, 11-13 ottobre 2023, il C.R.N. (M. Ricchi) ha partecipato all'organizzazione del Corso ECM per tecnici "Tubercolosi e paratubercolosi: diagnosi di laboratorio".

Il corso ha visto impegnato il personale del C.R.N. con le seguenti relazioni:

- Paratubercolosi: eziopatogenesi, epidemiologia e test disponibili (C. Garbarino)
  - Test diretti: coltura e PCR (M. Ricchi)
  - Test indiretti: ELISA (M. Ricchi)
  - Parte interattiva pratica (A. Filippi, S. Russo).
- In data 02.10.2023 nell'ambito del corso "Professione Veterinaria e One Health: aggiornamenti su Condizionalità, Classyfarm, Biosicurezza e controllo delle malattie infettive negli allevamenti" organizzato dall'Ordine dei Medici Veterinari di Lodi sono stati effettuati ad opera del personale del C.R.N., rispettivamente l'intervento dal titolo "Paratubercolosi: non abbassiamo la guardia!" da parte di C. Garbarino e l'intervento dal titolo "Paratubercolosi e sicurezza alimentare" da parte di M. Ricchi.

- In data 15.11.2023 è stata organizzata una visita presso il C.R.N. di un gruppo di studenti del corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie delle Produzioni Animali, Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali dell'Università degli studi di Milano, accompagnati dalla Professoressa R. Piccinini, nel corso della quale è stata presentata l'attività del C.R.N. inerente l'attività diagnostica sulla fauna selvatica da parte del personale del C.R.N. (A. Filippi, C. Garbarino).
- In data 04.03.2024 è stato organizzato un corso ECM per medici veterinari, in collaborazione con l'Ordine dei Medici Veterinari di Piacenza (Codice: 5981), dal titolo: "Paratubercolosi. La malattia e le linee guida per l'adozione dei piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria agli allevamenti bovini" - 1<sup>a</sup> Edizione.  
Lo stesso corso ECM è stato ripetuto in una seconda edizione in data 21.03.2024, sempre per medici veterinari, in collaborazione con l'Ordine dei Medici Veterinari di Reggio Emilia.  
Nell'ambito delle due edizioni del corso sono stati effettuati tre interventi da parte del personale del C.R.N. dal titolo:
  - "Paratubercolosi nel bovino aspetti patogenetici e clinico-patologici" (A. Luppi)
  - "Paratubercolosi: non abbassiamo la guardia!" (C. Garbarino)
  - "MAP e sicurezza alimentare" (M. Ricchi).

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

- Il C.R.N. ha partecipato (M.Ricchi, S.Russo) al XXII Congresso Nazionale della Società di Diagnostica di laboratorio Veterinaria (SIDILV), Brescia, 11-13 ottobre 2023. In tale occasione è stato presentato il seguente lavoro scientifico: "Riduzione logaritmica di *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* durante la produzione di mozzarella: confronto tra dato predetto e osservato" (E. Cosciani-Cunico, Dalzini E., Barsi F.\*, Ducoli S., Russo S.\*, Monastero P., Abdul ME., Arnaboldi S., Losio M.N., Ricchi M.\*)
- Il C.R.N. ha partecipato (A.Filippi) alla Giornata delle ricerche organizzata da IZSLER il 07.12.2023, con una comunicazione orale dal titolo: "Rischio di infezione da paratubercolosi al pascolo: contributo di ruminanti domestici e selvatici".
- Il C.R.N. ha partecipato (A.Filippi, C.Garbarino) al convegno "Annual ECSRHM Conference", Torino, 4-5 luglio 2024 con un lavoro (poster) presentato da A.Filippi dal titolo: "Minisatellites analysis of MAP field isolates from goats in Northern Italy" (Filippi A.\*, Barsi F., Prospero A., Russo S. \*, Ricchi M.\* Garbarino C.\*).

## **7. Comitati scientifici e gruppi di lavoro a cui ha partecipato il personale del C.R.N.**

Il C.R.N.:

- ha partecipato al Board of Directors, International Association of Paratuberculosis (Rappresentante italiano: Dr. M.Ricchi).
- ha partecipato (M.Ricchi) al Comitato Organizzatore del XXII congresso Nazionale della Società di Diagnostica di laboratorio Veterinaria (SIDILV).
- ha organizzato (C.Garbarino), in data 15.12.2023, una riunione dei referenti degli Istituti Zooprofilattici, con il seguente programma:
  - Introduzione ai lavori (C. Garbarino): Paratubercolosi: non abbassiamo la guardia!
  - Diagnostica (M. Ricchi): Risultati dei ring test di diagnosi diretta.
  - Diagnostica (C.Garbarino): “Anatomia” della gara per la fornitura di kit sierologici.
  - Diagnostica/Ricerca (M. Ricchi/C.Garbarino): Applicazione della Digital PCR, utilizzo in campo, risultati preliminari.
  - Diagnostica/Ricerca (A.Filippi): Sorveglianza attiva nei confronti della paratubercolosi nel cervo (*Cervus elaphus*) nel Parco Nazionale dello Stelvio.
  - Ricerca (P.Mazzone) - *Pathways* immunopatogenetici correlati ai meccanismi di resistenza alla paratubercolosi bovina nella razza Marchigiana.
  - Presentazione risultati PRC 2020/009 “Automazione delle metodiche per la rilevazione degli acidi nucleici di *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (MAP) in campioni diagnostici (ACRONIMO AUTOMAP)” (M.Ricchi) -
  - Discussione: la parola ai referenti e chiusura dei lavori.

## 8. Consulenze, attività di docenza, collaborazioni nazionali

### 8.1 Consulenze richieste ad esterni

Nulla da segnalare.

### 8.2 Consulenze e pareri tecnici forniti ad esterni

Nel periodo considerato non sono stati formulati pareri dal C.N.R.

Sono stati realizzati stage formativi e tirocini curriculari ed extra-curriculari per laureati e studenti di Medicina Veterinaria, per l’approfondimento delle metodiche diagnostiche sulla Paratubercolosi.

In particolare:

- tirocinio di A.Giuliani nell’ambito della Scuola di Specializzazione in sanità animale, allevamento, produzioni zootecniche. Scuola di Agraria e Medicina Veterinaria, Università di Torino (tutor C.R.N. C. Garbarino) (inizio 01.10.2023, fine 31.05.2024). Nel Corso del tirocinio è stata realizzata la tesi sperimentale dal titolo: “Gestione della paratubercolosi in un allevamento intensivo di vacche da latte ad alta prevalenza” (Relatore A.Mannelli, Correlatrice C. Garbarino, discussa a Torino in data 05.07.2024).
- tirocinio dello studente R.Frontoni nell’ambito del Corso di Laurea in Medicina Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bologna (inizio 11.10.2023, fine 30.09.2023) (tutor C.R.N. C.Garbarino).

- Tesi sperimentale di Lucia Fantasia per il Master di II Livello in Medicina della Conservazione e Gestione Sanitaria della Fauna Selvatica, Organizzato dal Dipartimento di Medicina Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria di Teramo, dal titolo: “Ricerca di *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* nei cervidi del Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi”. (Relatore: Nadia Cappai; Correlatore C. Garbarino, discussa in data 09.02.2024, Teramo).

Il C.R.N. (C.Garbarino, A.Luppi), in collaborazione con IZS Piemonte Liguria e Val d’Aosta, ha partecipato in ottobre 2023 alla commissione di gara nazionale per la fornitura di kit ELISA per la ricerca di anticorpi nei confronti di *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* ed all’allestimento delle prove previste dal capitolato (sensibilità diagnostica, specificità diagnostica, sensibilità analitica, prove di ripetibilità e riproducibilità).

## 9. Attività di docenza

- In data 01.12.2023 il C.R.N. (C. Garbarino) ha effettuato una docenza in modalità webinar, al Corso di Laurea Magistrale in Scienze delle Tecnologie delle Produzioni Animali, Corso di gestione dei Piani di Profilassi, 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*”.

## 10. 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. La collaborazione ha portato alla stesura di una pubblicazione scientifica relativa alla creazione di standard di riferimento per la ricerca diretta del *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.

## 11. Collaborazioni internazionali

- Vedi pag. 24 della presente relazione, ultimi due punti di “Altre Ricerche”.

## 12. Pubblicazioni scientifiche e divulgative

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

### 12.1 Su riviste con Impact factor:

- Russo S\*, Cortimiglia C\*, Filippi A\*, Palladini G\*, Garbarino C\*, Massella E\*, Ricchi M\*. Validation of digital PCR assay for the quantification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bovine faeces according to the ISO 20395:2019J Microbiol Methods 213 (2023). - Article no. 106825. (<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2023.106825>)
- Filippi A\*, Garbarino C\*, Nava M, Russo S\*, Soares Filipe JF, Bianchi A, Corlatti L, Gugiatti A, Buccheri Pederzoli C, Pigoli C, Pedrotti L, Arrigoni N\*, Ricchi M\*, Bertoletti I, Luzzago C (2024). Active surveillance of paratuberculosis in Alpine-dwelling red deer (*Cervus elaphus*) Front Vet Sci 11 (2024). - Article no.1303096. (8 p). (<https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1303096>)
- Turco S., Russo S\*, Pietrucci D., Filippi A\*, Milanese M., Luzzago C., Garbarino C\*, Palladini G\*, Chillemi G., Ricchi M.\* "High clonality of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis field isolates from red deer revealed by two different methodological approaches of comparative genomic analysis" Front Vet Sci 11 (2024) . - Article no. 1301667. (<https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1301667>)

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

- E. Cosciani-Cunico, Dalzini E., Barsi F.\*, Ducoli S., Russo S.\*, Monastero P., Abdul ME., Arnaboldi S., Losio M.N., Ricchi M.\*. "Riduzione logaritmica di *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis durante la produzione di mozzarella: confronto tra dato predetto e osservato" Atti Convegno SIDILV, Brescia, 11-13 ottobre 2023.
- Filippi A. \*, Barsi F., Prosperi A., Russo S. \*, Ricchi M. \*, Garbarino C. \*, "Minisatellites analysis of MAP field isolates from goats in Northern Italy", Atti Annual ECSRHM Conference, Torino, 4-5 luglio 2024

## 13. Attività di referaggio

Nel periodo considerato sono stati effettuati:

- 3 referaggi (C.Garbarino) sulle materie di interesse del Centro di Referenza per rivista impattata (Animals).
- 4 referaggi (M.Ricchi) sulle materie di interesse del Centro di Referenza per riviste impattate (Frontiers in Microbiology, Journal of Applied Animal Research, Frontiers in Veterinary Science, Journal of applied microbiology).

## 14. 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), è stato completamente aggiornato secondo un format IZSLER comune a tutti i centri di referenza.

Sul sito sono disponibili:

- brochure informativa/divulgativa dal titolo “Paratubercolosi nell’allevamento della bovina da latte”, destinato ad allevatori e veterinari, aggiornata con i criteri delle Linee guida nazionali.  
([http://www.izsler.it/izs\\_bs/allegati/450/brochure17\\_12\\_13B.pdf](http://www.izsler.it/izs_bs/allegati/450/brochure17_12_13B.pdf)).
- 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](http://archive.izsler.it/pls/izs_bs/v3_s2ew_consultazione.mostra_pagina?id_pagina=5710)
- 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*”.

## Centro di Referenza Nazionale (C.R.N.) Paratubercolosi

### **Parte B. Programmazione attività per il periodo 1.10.2024 – 30.09.2025**

#### **1. Obiettivi strategici**

Sviluppare maggiormente i rapporti nazionali ed internazionali.

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

- Intensificare la collaborazione con i vari II.ZZ.SS e con il Servizio Sanitario nazionale.

###### **INDICATORI**

- Realizzazione di un ring test per la diagnosi diretta (Coltura e PCR) che coinvolgerà i laboratori di tutti gli II.ZZ.SS;
- Partecipazione del Centro di Referenza a Progetti di Ricerca Corrente e/o Finalizzata, anche in collaborazione con altri II.ZZ.SS;
- Organizzazione di una riunione con i referenti dei vari II.ZZ.SS;
- Realizzazione di accordi di collaborazione scientifica e/o *Material Transfer Agreement* con vari II.ZZ.SS.

- 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.

##### **1.2 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.

#### **2. Attività diagnostica**

##### **2.1 Standardizzazione e validazione di metodiche analitiche**

Invio dei MMPP disponibili agli IIZZSS che ne faranno richiesta.

## 2.2 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).

## 2.3 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.

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

È in previsione, per il 2025, la realizzazione di un *ring test* per la diagnosi diretta mediante metodica colturale e PCR

Al precedente *ring test* per la diagnosi diretta avevano aderito 21 laboratori (incluso il laboratorio organizzatore), appartenenti ai 10 II.ZZ.SS.

## 2.5 Circuiti interlaboratorio a cui parteciperà il personale del C.R.N.

È 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 uno o più *ring test* annuali 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).

## 2.6 Altre attività

È 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”. Quest'ultima sarà realizzata nell'ambito del PRC IZS LE 02/2024 "Sorveglianza e gestione della paratubercolosi nell'interfaccia tra animali domestici e selvatici nel quadro della legislazione dell'Unione Europea sulla salute degli animali. ALPIMAP"

## **3. Epidemiologia**

### **3.1 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 dei Piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria agli allevamenti di specie sensibili (bovini, bufalini, ovini, caprini) nei confronti della paratubercolosi*» 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.

### **3.2 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/>).

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

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 e delle criticità rilevate negli 8 anni di applicazione, le Linee guida per la paratubercolosi sono state revisionate: è stato pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale Serie Generale n.10 del 13-01-2023 l'«*Accordo, ai sensi dell'articolo 4, comma 1, del decreto legislativo 28 agosto 1997, n. 281, tra il Governo, le regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano concernente: «Linee guida per l'adozione dei Piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria agli allevamenti di specie sensibili (bovini, bufalini, ovini, caprini) nei confronti della paratubercolosi*»» sancito dalla Conferenza Stato Regioni il 30 novembre 2022.

### **3.4 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.

## **4. Ricerca e sperimentazione**

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

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

Progetto di ricerca corrente IZSLER 02/2024: "Sorveglianza e gestione della paratubercolosi nell'interfaccia tra animali domestici e selvatici nel quadro della legislazione dell'Unione Europea sulla salute degli animali. ALPIMAP" (Responsabile scientifico A.Filippi).

Il progetto inizierà il 30.12.2024 e terminerà il 30.12.2026.

#### 4.1.2 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 IZSLE 2023/007: "Indagine sulla presenza e circolazione dei micobatteri non tubercolari (NTM) negli allevamenti bovini in relazione al problema delle false positività sierologiche alla paratubercolosi bovina". MICOCROSSREA, approvato 2023 (Responsabile scientifico M.Gradassi, Il progetto è iniziato il 30.12.2023 e terminerà il 29.12.2025
- Progetto di Ricerca corrente IZS ME 2022/14 – IZS LE 2022/108: "Valutazione di differenti biomarkers d'infezione da micobatteri nella bufala mediterranea (*Bubalus bubalis*) e nel bovino (*Bos taurus*)" (Responsabile scientifico A. Martucciello). Il progetto è iniziato il 30.12.2022 e terminerà 30.12.2024.
- Progetto di Ricerca corrente IZS UM 2024/04: "Studio in vitro dell'interazione tra *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* e macrofagi come metodo alternativo per la caratterizzazione di fenotipi immunotolleranti alla paratubercolosi bovina mediante indagini genomiche "MacrOmics".

#### 4.1.3 Ricerca finalizzata

Nulla da segnalare.

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

Nulla da segnalare.

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

- Ricerca autofinanziata (Codice del Progetto: COMM\_MYCO\_PARA). "Quantificazione assoluta delle cellule di *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in campioni fecali bovini mediante lo sviluppo di un saggio digital PCR" (Responsabile scientifico: C.Garbarino; data avvio 01.03.2023; data di scadenza 01.03.2025).
- 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.

- Accordo di collaborazione scientifica (data avvio 26.04.2023; data scadenza 25.04.2028) con Consiglio Regionale per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agricola (CREA), per una ricerca sull'epidemiologia e sull'evoluzione dei ceppi di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolati da diverse fonti e specie animali, attraverso analisi di dati ottenuti mediante sequenziamento di nuova generazione. Frutto dell'accordo sarà il lavoro che verrà presentato come comunicazione orale al 16 th International Colloquium on of Paratuberculosis (ICP.2024) che si terrà a Virndavan, Uttar Pradesh, India dal 21 al 25 ottobre 2024, dal titolo "Signature of selection in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* reveal candidate genes for host preferences." Autori: Lamontanara A. e Orru L. (CREA), Garbarino C.\*, Filippi A.\*, Russo S.\* e Ricchi M\*. Inoltre, per l'anno 2025, si prevede la pubblicazione di questi dati su rivista con impact factor.
- Accordo di collaborazione scientifica (data avvio 28.08.2023; data scadenza 28.08.2025) con Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali, per effettuare le attività di monitoraggio dello stato sanitario nei confronti della Paratubercolosi della popolazione di cervi a vita libera nel Parco Nazionale dello Stelvio e in aree limitrofe. Frutto dell'accordo sarà il lavoro che verrà presentato come poster al 16 th International Colloquium on Paratuberculosis che si terrà a Virndavan, Uttar Pradesh, India dal 21 al 25 ottobre 2024 , dal titolo "Paratuberculosis in Alpine-dwelling red deer (*Cervus elaphus*) in the Stelvio National Park (Northern Italy)". Autori: Garbarino C.\*, Nava M., Filipe J., Bianchi A., Corlatti L., Gugliatti A., Pedrotti L., Ricchi M.\*, Bertolotti I., Luzzago C., Filippi A.\*.
- Material Transfer Agreement (data avvio 19.06.2023; data scadenza 18.06.2028) con National Service of Animal Health and Agrifood Quality, Buenos Aires, Argentina. L'obiettivo del MTA è scambiare materiale di riferimento per la diagnostica della paratubercolosi. In occasione dell'allestimento del RT sierologico, nell'ambito del MTA, verrà inviato (11.10.2024) un pannello di sieri a esito noto.
- Material Transfer Agreement (data avvio 12.06.2023; data scadenza 11.06.2028) con Agencie Nationale de Securità Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail - Laboratoire de Ploufragan-Plouzanet-Niorte, Francia. L'obiettivo del MTA è scambiare materiale di riferimento per la diagnostica della paratubercolosi. In occasione dell'allestimento del RT sierologico, nell'ambito del MTA, verrà inviato (11.10.2024) un pannello di sieri a esito noto.

## 5. Aggiornamento e formazione professionale

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

E' prevista l'organizzazione da parte del C.R.N. per la paratubercolosi, in collaborazione con il C.R.N. per la tubercolosi, di un Congresso Nazionale ECM, nel terzo trimestre 2025.

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

- È in previsione la partecipazione del C.R.N. (C. Garbarino e M.Ricchi) al 16<sup>th</sup> International Colloquium on Paratuberculosis (Virndavan, Uttar Pradesh, India, 21-25 ottobre 2024), in cui saranno presentati i seguenti contributi:

Come comunicazione orale:

- "Signature of selection in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* reveal candidate genes for host preferences." (Lamontanara A., Orru L., Garbarino C.\*, Filippi A.\*, Russo S.\* e Ricchi M.\*).

Come poster:

- "Surveillance of paratuberculosis in Alpine red deer (*Cervus elaphus*) in Northern Italy" (Garbarino C.\*, Nava M., Bianchi A., Corlatti L., Gugiatti A., Pedrotti L., Ricchi M.\*, Bertoletti I., Luzzago C., Filippi A.\*)
- "Digital PCR (dPCR) to quantify the load of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) present in feces as a "tool" to define priorities of interventions in an infected cattle herd". (Garbarino C.\*, Filippi A.\*, Ventura G., Boldini M., Ostanello F., Giuliani A., Russo S.\*, Ricchi M.\*).
- "miRNA in stool as Paratuberculosis prognostic biomarkers in beef cattle: extraction methods comparison" (Torricelli M., Sebastiani C., Fratto A., Madeo L., Petrucci L., Ciullo M., Biagetti M., Ricchi M.\*, Garbarino CA\*, Mazzone P.)

Inoltre, in occasione del medesimo Congresso, il Dr. M.Ricchi presenterà, in qualità di invited speaker, una lecture intitolata: "Omics and Diagnostic".

- È in previsione la partecipazione del C.R.N. (A. Filippi) al 7<sup>th</sup> Congress of the European Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (EAVLD) che si terrà a Padova, dal 21 al 23 ottobre 2024, in cui verrà presentato il seguente lavoro scientifico in formato poster:

- "Digital PCR (dPCR) to quantify the load of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) present in feces as a "tool" to define priorities of interventions in an infected cattle herd."

- E' in previsione la partecipazione alla Giornata delle Ricerche, Brescia 05.12.2024 con la presentazione del Poster dal titolo:
  - "Automazione delle metodiche per la rilevazione degli acidi nucleici di *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (MAP) in campioni diagnostici" (M. Ricchi).

- “Digital PCR (dPCR) to quantify the load of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP) present in feces as a “tool” to define priorities of interventions in an infected cattle herd” (A. Filippi).

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

- Nel mese di dicembre 2024 il C.R.N. organizzerà una riunione dei referenti degli Istituti Zooprofilattici, con il seguente programma:
  - Introduzione ai lavori (C. Garbarino)
  - Risultati dei ring test di diagnosi indiretta (G. Galletti)
  - Nuove attività del C.R.N.: applicazione della Digital PCR, utilizzo in campo, risultati (C. Garbarino)
  - Diagnostica nell’era degli OMICS (M. Ricchi)
  - Discussione e presentazione di contributi da parte dei referenti degli altri Istituti Zooprofilattici
- E’ in programma che il C.R.N. (M. Ricchi) partecipi ai seguenti gruppi di lavoro: DISCONTTOOLS expert group member on paratuberculosis.

## 7. Consulenze, attività di docenza, collaborazioni nazionali

### 7.1 Consulenze richieste ad esterni

Nulla da segnalare.

### 7.2 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 II.ZZ.SS, Veterinari appartenenti alle AUSL e liberi professionisti, allevatori.

- Tesi sperimentale a seguito del tirocinio di R. Frontoni, studente nell’ambito del Corso di Laurea in Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bologna (Correlatore: C. Garbarino).
- Tesi sperimentale dal titolo: “*Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis: sieroprevalenza, controllo e gestione sanitaria in un allevamento di bovine da latte”, nell’ambito della Scuola di specializzazione in sanità animale, allevamento e produzioni zootecniche, Facoltà di Medicina Veterinaria di Teramo, da discutere in data 25.10.2024 (Relatore: A. Luppi, Correlatore C. Garbarino).
- Tirocinio di 300 ore (inizio previsto marzo 2025) con stesura di una tesi sperimentale inerente gli argomenti del C.R.N., della studentessa Khula Farooq, che frequenta presso l’Università degli studi di Bologna il Corso Universitario di “Food animal metabolism and management in circular economy”.
- Revisione esterna di tesi di dottorato di ricerca dal titolo “Early diagnosis, genomic resistance to bovine Paratuberculosis and regulation of the host response against

infection”, del candidato Gerard Badia Bringue, presso Universidad del Pais Vasco, Barrio Sarriena Leica University of the Basque Country (UPV-EHU), Spagna (Revisore: M.Ricchi).

### **7.3 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.

In particolare è in previsione nel mese di novembre 2024 una docenza del C.R.N. (C. Garbarino) 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: *“Paratuberculosis: linee guida per l’adozione di piani di controllo e assegnazione della qualifica sanitaria agli allevamenti e piano di gestione sanitaria”*.

### **7.4 Consulenze e collaborazioni europee**

Nulla da segnalare.

### **7.5 Consulenze e collaborazioni internazionali**

Nulla da segnalare

## **8. Pubblicazioni scientifiche e divulgative**

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

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

È in previsione la pubblicazione su Veterinary Microbiology del seguente lavoro scientifico:

- Garbarino C. \*, Nava M., Filippi A. \*, Forti A., Russo S. \*, Barsi F., Bianchi A., Filipe J., Arrigoni N. \*, Pedrotti L., Corlatti L., Ricchi M\*, Luzzago C. *“Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis contamination in alpine pastures: evaluation of cattle and red deer contribution through environmental fecal samples”*.

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

E’ in previsione la pubblicazione dei seguenti contributi:

- “miRNA in stool as Paratuberculosis prognostic biomarkers in beef cattle: extraction methods comparison. (Torricelli M., Sebastiani C., Fratto A., Madeo L., Petrucci L., Ciullo M., Biagetti M., Ricchi M.\*, Garbarino CA.\*, Mazzone P). Proc. 16th International Colloquium on Paratuberculosis, Virndavan, Uttar Pradesh, India, 21-25 ottobre 2024).
- “Surveillance of paratuberculosis in Alpine red deer (Cervus elaphus) in Northern Italy” (Garbarino C.\*, Nava M., Bianchi A., Corlatti L., Gugiatti A., Pedrotti L., Ricchi M.\*, Bertoletti I., Luzzago C., Filippi A.\*). Proc. 16th International Colloquium on Paratuberculosis, Virndavan, Uttar Pradesh, India, 21-25 ottobre 2024).

- “Digital PCR (dPCR) to quantify the load of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) present in feces as a “tool” to define priorities of interventions in an infected cattle herd.” (Garbarino C.\*, Filippi A.\*, Ventura G., Boldini M., Ostanello F., Giuliani A., Russo S.\*, Ricchi M.\*) Proc. 16th International Colloquium on Paratuberculosis, Virndavan, Uttar Pradesh, India, 21-25 ottobre 2024.
- Signature of selection in Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis reveal candidate genes for host preferences. (Lamontanara A, Orru L, Garbarino C\*., Filippi A\*., Russo S. \*, Ricchi M.\*). Proc. 16th International Colloquium on Paratuberculosis, Virndavan, Uttar Pradesh, India, 21-25 ottobre 2024.
- “Digital PCR (dPCR) to quantify the load of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) present in feces as a “tool” to define priorities of interventions in an infected cattle herd.” (Filippi A.\*, Garbarino C.\*, Ventura G., Gradassi M., Frontoni R., Tuccia E., Giuliani A., Russo S.\*, Luppi A. \*, Ricchi M.\*). 7th Congress of the European Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (EAVLD), Padova, 21-23 ottobre 2024.

## 9. Sito Web

Il sito web, con funzioni interattive funzionali alla realizzazione e alla gestione di ring test per la diagnosi indiretta, 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 arricchita la sezione relativa alla documentazione fotografica.

Il Responsabile del Centro di Referenza Nazionale per la Paratubercolosi

Dott. Chiara Garbarino