

SEDE CENTRALE

LEGNARO (PD)
Viale dell'Università, 10
35020 Legnaro (PD)
tel. +39 049 8084211
tel. +39 049 8830380
fax dir. +39 049 8830046
fax dir. san. +39 049 8830539
fax amm. e prot. +39 049 8830178
C.F. e P. IVA, MWSL,
VAT, TVA 00206200289
e-mail: comunicazione@izsvenezie.it
PEC: izsvenezie@legalmail.it
www.izsvenezie.it

ROVIGO

Adria
Via L. da Vinci, 39
45011 Adria (RO)
tel. +39 0426 21841
fax +39 0426 901411
e-mail: garcangeli@izsvenezie.it

BELLUNO

Via Cappellari, 44/A
32100 Belluno
tel. +39 0437 944746
fax +39 0437 942178
e-mail: at2bl@izsvenezie.it

BOLZANO (BOZEN)

Via Laura Conti, 4
39100 Bolzano/Bozen
tel. +39 0471 633062
fax +39 0471 633580
e-mail: at6bz@izsvenezie.it

PADOVA

Legnaro
Viale dell'Università, 10
35020 Legnaro (PD)
tel. +39 049 8084290
fax +39 049 8830277
e-mail: liob@izsvenezie.it

PORDENONE

Cordenons
Via Bassa del Cuc, 4
33084 Cordenons (PN)
tel. +39 0434 41405
fax +39 0434 41201
e-mail: segr.pn@izsvenezie.it

VENEZIA

San Donà di Piave
Via Calvecchia, 10
30027 San Donà di Piave (VE)
tel. +39 0421 41361
fax +39 0421 221453
e-mail: at2sd@izsvenezie.it

TRENTO

Via Lavisotto, 129
38121 Trento
tel. +39 0461 822458
fax +39 0461 829065
e-mail: sct5.trento@izsvenezie.it

UDINE

Basaldella di Campotomido
Via della Roggia, 100
33030 Basaldella di C. (UD)
tel. +39 0432 561529
fax +39 0432 562676
e-mail: at4ud@izsvenezie.it

VERONA

Via San Giacomo, 5
37135 Verona
tel. +39 045 500285
fax +39 045 582811
e-mail: at1vr@izsvenezie.it

VICENZA

Viale Fiume, 78
36100 Vicenza
tel. +39 0444 305457
fax +39 0444 506165
e-mail: at1vi@izsvenezie.it

TREVISO

Fontane di Villorba
Vicolo Mazzini, 4 int. 5/6
31020 Fontane di Villorba (TV)
tel. +39 0422 302302
fax +39 0422 421154
e-mail: at2tv@izsvenezie.it

Istituto Zooprofilattico
Sperimentale delle Venezie
Protocollo Generale



Uscita - 0007984/2019
del 27/06/2019
Class.: 7.1

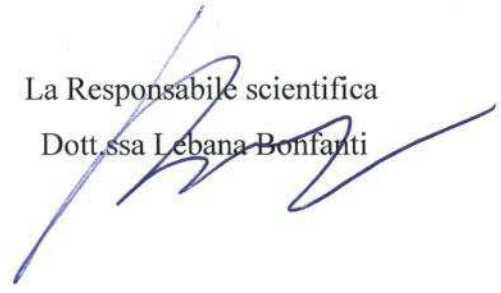
Spett.le Dott. Daniele Vicario
Direttore ANAPRI
via Ippolito Nievo, 19
33100 Udine
PEC anapri@pec.it

Oggetto: PSRN 2014/2020 - Sottomisura 10.2. Sostegno per la conservazione, l'uso e lo sviluppo sostenibili delle risorse genetiche in agricoltura - attività di caratterizzazione delle risorse genetiche animali di interesse zootecnico e salvaguardia della biodiversità. **Relazione intermedia - giugno 2019.**

Si ritrasmette in allegato la relazione tecnica intermedia-giugno 2019 delle attività svolte dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), come servizio di consulenza tecnico-scientifico nell'ambito del PSRN 2014-2020 Sottomisura 10.2 - Progetto "*Il determinismo genetico nella resistenza alla Paratuberculosis (PTB)*".

Distinti Saluti

La Responsabile scientifica
Dott.ssa Lebana Bonfanti



Allegati: 1

Lebana Bonfanti
SCS4 - Laboratorio sorveglianza epidemiologica,
legislazione veterinaria e benessere animale
tel. 049 8084298; e-mail: lbonfanti@izsvenezie.it
PEC: izsvenezie@legalmail.it

Progetto DUALBREEDING

Titolo del progetto:

Il determinismo genetico nella resistenza alla
Paratubercolosi

Relazione intermedia

DATA INIZIO ATTIVITA':

DATA FINE PROGETTO:

DATA STAMPA RELAZIONE: 21/06/2019

Responsabile Scientifico UO IZSVe: Dr.ssa Lebana Bonfanti

lbolfanti@izsvenezie.it

049 8084298

Sommario	
INTRODUZIONE	3
SCOPO DEL LAVORO	4
MATERIALI E METODI	4
RACCOLTA CAMPIONI	4
ESAMI DI LABORATORIO.....	5
ATTIVITA' IN ALLEVAMENTO PRIMA FASE	6
QUESTIONARIO PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO	7
RECLUTAMENTO DELLE AZIENDE.....	9
RISULTATI DEL CAMPIONAMENTO	13
➤ PRIMA FASE	13
RISULTATI SIEROLOGICI.....	13
RISULTATI QUESTIONARIO.....	17
IL FATTORE PASCOLO	20
➤ SECONDA FASE	21
RISULTATI SIEROLOGICI E ANALISI AMBIENTALI/INDIVIDUALI	21
CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI	24

INTRODUZIONE

La paratubercolosi è un'infezione cronica dell'intestino dei ruminanti causata da *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP). Questa malattia causa significative perdite economiche negli allevamenti di vacche da latte e si diffonde principalmente attraverso la via oro-fecale. Dagli studi eseguiti in Veneto e Lombardia emerge che la prevalenza apparente delle aziende varia dal 48% (Lombardia) al 65% (Veneto) (Pozzato *et al.*, 2011). Uno studio effettuato in Lazio da Lillini *et al.*, 2005 emerge una prevalenza apparente nelle aziende del 42%. Dal punto di vista patogenetico, se l'infezione avviene generalmente nelle prime settimane di vita, le manifestazioni cliniche tardano anni a sopravvenire. Questo ritardo varia da soggetto a soggetto in relazione alla patogenicità del ceppo, alla dose infettante e soprattutto all'efficacia della risposta immunitaria. Negli animali infetti la risposta è inizialmente di tipo cellulo-mediato, atta a contenere la diffusione del patogeno. In questo stadio l'escrezione fecale è limitata, quindi i metodi diagnostici diretti hanno una sensibilità molto bassa. Di contro i metodi di rilevazione dell'immunità cellulare potrebbero essere utilizzati, ma sono difficilmente applicabili per gli attuali limiti di specificità. Con la progressione dell'infezione, la capacità di difesa dell'ospite viene progressivamente meno permettendo la proliferazione di MAP a livello intestinale e l'escrezione fecale di livelli rilevabili del patogeno. A questo si associa la diffusione sistemica del MAP con conseguente attivazione dell'inefficace risposta umorale, facilmente individuabile con metodi ELISA commerciali molto specifici. Alla luce di quanto detto e sulla base dello stadio evolutivo della malattia, i soggetti infetti possono essere classificati come: 1.infetti; 2.infettanti; 3.clinici.

Dal punto di vista della diffusione della malattia, numerose indagini su vasta scala condotte nei Paesi a maggiore vocazione zootecnica indicano che la paratubercolosi è oggi diffusa in tutto il mondo, con dati di prevalenza apparente di allevamenti infetti variabile fra il 7 e il 60%. A livello nazionale, le indagini realizzate in varie regioni, utilizzando il test ELISA sul sangue di animali di età superiore a 12-24 mesi, hanno rilevato una prevalenza apparente di allevamenti infetti variabile dal 42% al 65%. Per contro, la prevalenza di animali infetti appare contenuta, con dati variabili dal 2,4% al 4,6%. Le indagini effettuate in Veneto e in Lombardia hanno stimato una prevalenza reale che si aggira intorno al 70% (Luini *et al.* 2013). Un altro studio In Umbria e Marche indica invece una prevalenza del 53% (Papa *et al.*, 2011).

SCOPO DEL LAVORO

L'impossibilità di rilevare gli animali infetti (non ancora infettanti) con le metodiche diagnostiche attualmente in uso limita fortemente il controllo epidemiologico della paratubercolosi e la definizione di metodi alternativi di identificazione degli stadi di infezione risulta prioritaria. Nel corso del presente progetto l'IZSve ha il compito di esaminare bovine appartenenti a stalle colpite da paratubercolosi al fine di identificare, attraverso l'utilizzo di metodi diagnostici tradizionali, animali infetti che sviluppano lo stadio infettante della malattia. La seconda parte del progetto, in carico ad ANAPRI, prevede l'analisi retrospettiva dei profili genetici di questi soggetti, tale attività permetterà l'individuazione di eventuali differenze quali-quantitative di espressione. L'identificazione di marcatori associati alla paratubercolosi permetterà di determinare il potenziale prognostico e selettivo di specifici profili genetici, come già evidenziato nelle razze Frisona e Jersey.

MATERIALI E METODI

RACCOLTA CAMPIONI

L'attività dell'IZSve nel contesto del progetto proposto da ANAPRI, si è sviluppato in due fasi consecutive. La prima fase ha previsto un monitoraggio sierologico in aziende che allevano Pezzate Rosse italiane e la contestuale somministrazione di un questionario per il rilevamento dei fattori ambientali e manageriali potenzialmente correlati alla presenza della malattia. Nella seconda fase, sono stati selezionati 10 allevamenti (5 risultati negativi al test sierologico e 5 positivi), nei quali sono stati effettuati campionamenti ambientali volti a stabilire l'eventuale presenza del micobatterio nell'ambiente e, in un secondo momento, prelievi di sangue e feci individuali su un campione di animali tale da individuare una prevalenza pari o superiore al 15% e con un livello di confidenza del 95% (fino a 18 animali per azienda). Inoltre, sono stati svolti ulteriori accertamenti sui capi risultati positivi nella prima fase, con un secondo prelievo di sangue e un campione di feci individuale per ogni soggetto positivo ancora in vita. L'ANAPRI nel contempo sta effettuando delle analisi genetiche sui capi degli allevamenti campionati. Il prossimo e ultimo step del progetto riguarda la compilazione della check-list nelle aziende esaminate della Provincia Autonoma di Trento.

Invece, per quanto riguarda il controllo dei capi risultati positivi in fase di macellazione con prelievo di tessuto per l'esame colturale (valvola ileocecocolica), non è stato possibile effettuarlo a causa del mancato avviso di invio al macello dei capi.

ESAMI DI LABORATORIO

I campioni ambientali e le feci individuali sono stati processati per la ricerca del MAP secondo la PDP DIA 072 "ricerca di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mediante Real Time PCR", e la PDP DIA 139 "ricerca di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mediante coltura in terreno liquido".

Con l'utilizzo di un abbassalingua sterile monouso sono stati pesati 2 g di materiale fecale in una provetta tipo Falcon da 50 ml.

A questa sono stati aggiunti 10 ml di acqua distillata sterile e il tutto è stato vortexato vigorosamente per circa 1 minuto. Successivamente le provette sono state tenute in agitazione su agitatore oscillante orizzontale a 250 movimenti al minuto per 30 minuti. Infine, le provette sono state tenute in posizione verticale per 30 minuti a temperatura ambiente al fine di permettere la sedimentazione del campione.

Per l'estrazione del DNA, sono stati trasferiti 300 µl di surnatante in una provetta sterile tipo eppendorf da 2 ml, preventivamente addizionata con 300 mg di glass beads e 200 µl di acqua distillata sterile. Il campione è stato quindi omogenato e centrifugato. Il DNA è stato estratto con il kit commerciale "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Ditta Roche) e l'amplificazione è stata eseguita con metodica RT-PCR.

Le prestazioni della metodica RT-PCR diretta su campione di feci sono: sensibilità analitica 15 Map/ml su feci, sensibilità diagnostica 90,22% e specificità diagnostica 97,65%.

Per l'esame colturale, sono stati trasferiti 5 ml della sospensione in una provetta sterile da 50 ml, sono stati aggiunti 12,5 ml di HPC 1,5 % e 12,5 ml di BHI e il tutto è stato vortexato vigorosamente per circa 1 minuto e incubato a $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ x 18-24h. Successivamente le provette sono state centrifugate a 900 g x 30' a 25°C, è stato eliminato il surnatante e risospeso il pellet in 1 ml di soluzione antibiotica VAN con successiva vigorosa vortexata. I campioni sono stati incubati a $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ x 18-24 h, vortexati e successivamente è stato inoculato in parallelo un quantitativo di 200 µl della soluzione in due tubi di terreno liquido 7H9+. Dopo incubazione di 6 settimane è stato eseguito uno striscio del terreno, colorato mediante Ziehl-Nielsen e le colture positive confermate mediante rt-PCR.

Le performance del test sono le seguenti: sensibilità analitica 10 MAP/gr di feci, sensibilità diagnostica 100%, specificità diagnostica 94,10%.

Per quanto riguarda il test ELISA su siero, esso permette la ricerca degli anticorpi verso il *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. La sensibilità del test ELISA varia dal 20 al 90% con il progredire dell'infezione. La specificità invece è superiore al 98%.

ATTIVITA' IN ALLEVAMENTO PRIMA FASE

CAMPIONAMENTO

Lo spreadsheet fornito da ANAPRI riporta un totale di 5082 aziende sul territorio nazionale, in cui sono presenti capi di Pezzata Rossa italiana. Sulla popolazione di allevamenti totali, 93 sono le aziende che inviano vitelli al Centro Genetico, di queste 72 sono localizzate nelle regioni Friuli Venezia Giulia, Veneto e nella P.A. di Trento e sono state considerate come popolazione di riferimento per la prima fase.

In tutte le 72 aziende prese in considerazione, è stato effettuato un monitoraggio a campione, tale da poter identificare la presenza di PTB con una prevalenza minima del 5%, un livello di confidenza del 95% e considerando un test diagnostico con sensibilità pari a 58% (sensibilità assunta per test ELISA), come previsto dall'accordo del 17 ottobre 2013 tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano concernente le "Linee guida per l'adozione dei Piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria degli allevamenti nei confronti della Paratubercolosi bovina" (G.U. Serie generale n.271 del 19/11/2013, supplemento ordinario n. 888).

Il campionamento da applicare nelle aziende, prevedeva un controllo su tutti i bovini riproduttori maschi di età superiore a 24 mesi, su tutti i bovini di età superiore ai 24 mesi acquistati negli ultimi 12 mesi e su un campione di bovini femmina (vacche) di età superiore a 36 mesi nati in azienda, con la numerosità riportata in Tabella 1.

Tabella 1. Numerosità campionaria di riferimento

N vacche ≥ 36 mesi	N vacche ≥ 36 mesi da testare
1-41	Tutte
42-50	41
51-60	49
61-100	55

101-300	62
301-500	63
Più di 500	65

L'esito sierologico può fornire risultati negativi, dubbi, debolmente positivi, positivi e fortemente positivi (valori S/P di riferimento in Tabella 2):

1. **Negativo:** elevata probabilità che l'animale non sia infetto, in funzione della prevalenza aziendale. Anche nel caso fosse infetta la bovina non è probabile escrettrice.
2. **Dubbio/debolmente positivo:** moderata probabilità di infezione da Map. Occasionalmente alcuni animali ritornano negativi nella lattazione successiva.
3. **Positivo:** alta probabilità di infezione da Map ma potrebbe non sviluppare sintomi clinici nella lattazione corrente.
4. **Fortemente positivo:** probabilità molto alta di infezione da Map e di escrezione del micobatterio con le feci.

Tabella 2. Interpretazione valori S/P ELISA

ELISA Valore S/P	Interpretazione
<0.60	Negativo
0.60 - 0.70	Dubbio
>0.70 – 1.00	Debolmente positivo
>1.00 – 2.00	Positivo
>2.00	Fortemente positivo

QUESTIONARIO PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO

Nel corso dei sopralluoghi svolti nelle aziende reclutate sono stati utilizzati i questionari per rilevare la situazione ambientale, manageriale e il rischio di trasmissione di paratubercolosi. I questionari di riferimento (Allegato 1) sono stati predisposti dal Centro di Referenza Nazionale per la Paratubercolosi (IZSLER).

I questionari riportano:

- 1-2: scheda anamnestica d'allevamento bovine da latte;

- 3-4: scheda per raccolta anamnesi paratubercolosi e stima della prevalenza di infezione negli allevamenti di bovine da latte;
- 5-10: schede per la valutazione del rischio di trasmissione di infezione paratubercolare negli allevamenti di bovine da latte.

L'analisi del rischio prevede un punteggio per ogni fase, allo scopo di fornire una valutazione il più oggettiva possibile. Viene stabilito un livello di rischio più elevato per i vitelli e via via più basso per gli animali di età crescente in funzione della minore recettività all'infezione con l'aumentare dell'età. Il punteggio ottenuto per ogni singola voce viene sommato e riportato per ogni settore dell'azienda e tale risultato viene rapportato al punteggio massimo ottenibile per settore rispetto al punteggio massimo ottenibile totale. I settori considerati sono sei:

1. Sala parto. Fattori di rischio: utilizzo multiplo, igiene della lettiera, utilizzo come infermeria, presenza di capi infetti, stato igienico della mammella al parto, vitelli nati in altre aree, tempo di permanenza con la madre, vacche nutrici.
2. Vitellaia. Fattori di rischio: somministrazione del pool di colostro, somministrazione di pool di colostro di singole bovine a più vitelle, somministrazione di pool di latte di vacca non pastorizzato, contaminazione fecale di latte e colostro, contaminazione di alimenti ed acqua con feci di animali adulti, contatto diretto/indiretto con animali adulti e loro feci.
3. Vitelle svezzate/manzette. Fattori di rischio: contatto con animali adulti o loro feci, contaminazione degli alimenti con feci di animali adulti, contaminazione dell'acqua di bevanda con feci di animali adulti, pascolo promiscuo con animali adulti, alimentazione con foraggi contaminati da letame e /o liquame.
4. Manze gravide. Fattori di rischio: contatto con animali adulti o loro feci, contaminazione degli alimenti con feci di animali adulti, contaminazione dell'acqua di bevanda con feci di animali adulti, alimentazione con foraggi contaminati da letame e/o liquame.
5. Vacche e tori. Fattori di rischio: contaminazione fecale degli alimenti, contaminazione fecale dell'acqua di bevanda, accesso a zone di accumulo/stoccaggio di letame/liquame.
6. Animali acquistati. Fattori di rischio: acquisto da allevamenti certificati, acquisto da allevamenti a basso rischio, acquisto da un solo allevamento di stato sanitario sconosciuto, acquisto da più allevamenti di stato sanitario sconosciuto.

Il punteggio su ogni singolo fattore di rischio per settore si basa su specifici criteri e varia a seconda del settore considerato (Tabella 3).

Tabella 3. Tabella riassuntiva della valutazione del rischio

	SETTORE	MASSIMO PUNTEGGIO	N° FATTORI DI RISCHIO	PUNTEGGIO MASSIMO PER FATTORE
A	Sala parto	80	8	10
B	Vitelli presvezzamento	60	6	10
C	Vitelle/manzette svezate	35	5	7
D	Manze gravide	25	5	5
E	Vacche e tori	16	4	4
F	Animali acquistati	60	9	40
	Totale	276		

RECLUTAMENTO DELLE AZIENDE

La prima fase del progetto prevedeva il reclutamento di 72 aziende di vacche da latte di razza Pezzata Rossa Italiana di cui, 10 in Veneto, 26 in Friuli Venezia Giulia e 36 nella P.A. di Trento (Tabella 4). La distribuzione della popolazione bovina è rappresentata in tre mappe distinte: Veneto (Figura 1); Friuli Venezia Giulia (Figura 2); provincia autonoma di Trento (Figura 3). Il personale dell'IZSve, ha effettuato l'analisi del rischio nelle aziende presenti in Veneto e in Friuli Venezia Giulia. Per le aziende della PA di Trento sono stati acquisiti, previo consenso firmato da parte degli allevatori, i dati sierologici in quanto nella provincia è attivo un piano di controllo della malattia e i referti sono presenti nel database dell'IZSve, nel corso della prossima fase, verranno applicate le CKL per la valutazione del rischio, su un numero rappresentativo di aziende.

Classe di consistenza	VENETO			FRIULI VENEZIA GIULIA			TRENTO		
	N° aziende	Totale sieri	Media sieri per azienda	N° aziende	Totale sieri	Media sieri per azienda	N° aziende	Totale sieri	Media sieri per azienda
1-41	2	65	33	10	332	33	24	619	26
42-50	0	-	-	0	-	-	3	128	43
51-60	1	49	49	0	-	-	1	51	51
61-100	3	165	55	8	442	55	7	578	83
101-300	4	270	68	8	496	62	1	83	83
Totale	10	549	55	26	1270	49	36	1459	41

Tabella 4. Aziende reclutate nel progetto

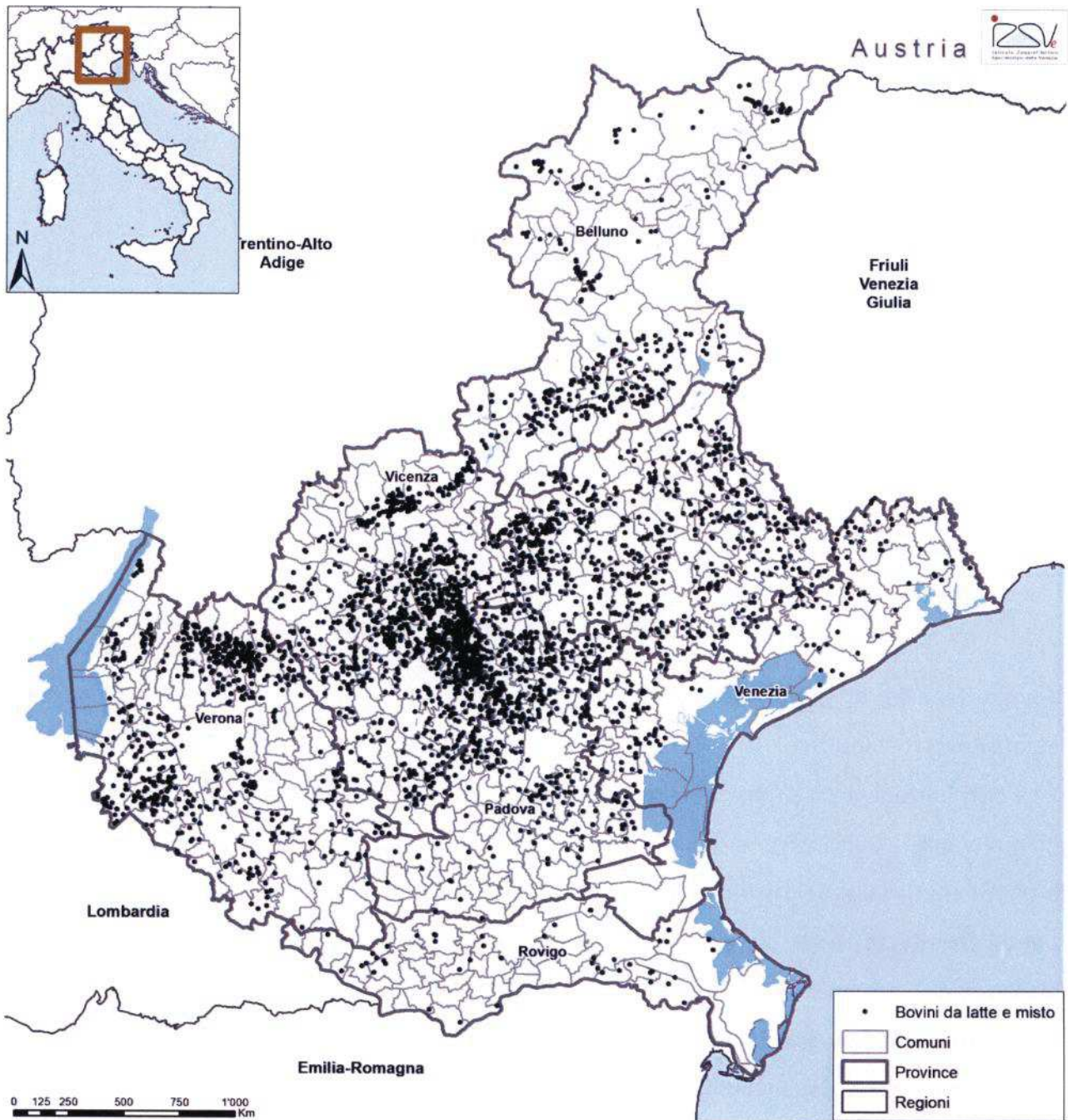


Figura 1. Distribuzione della popolazione bovina in Veneto



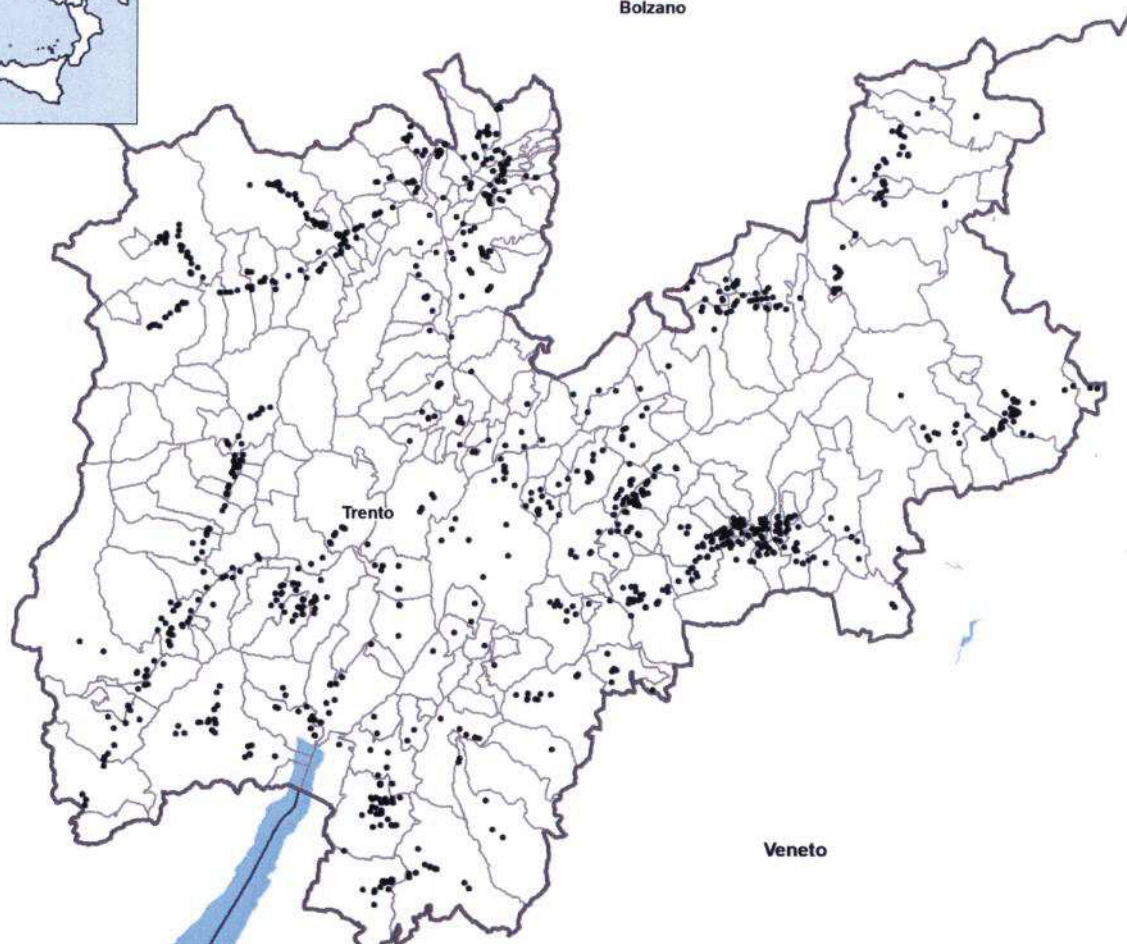
Figura 2. Distribuzione della popolazione bovina in Friuli Venezia Giulia



Austria



Bolzano



Veneto

Lombardia



Figura 3. Distribuzione della popolazione bovina in Provincia Autonoma di Trento

RISULTATI DEL CAMPIONAMENTO

➤ PRIMA FASE

RISULTATI SIEROLOGICI

In totale sono stati analizzati 3278 sieri provenienti da 72 diverse aziende del Veneto, Friuli Venezia Giulia e P.A. di Trento. I prelievi nelle regioni Veneto e Friuli Venezia Giulia sono stati effettuati dal personale IZSVe, mentre i dati relativi alle aziende di Trento sono stati estratti dai campionamenti effettuati dai Servizi Veterinari locali, eseguiti secondo il Piano nei confronti della malattia in atto nella Provincia Autonoma.

Gli allevamenti risultati negativi sono 42: 3 in Veneto; 13 in Friuli Venezia Giulia; 26 in provincia autonoma di Trento. Gli allevamenti risultati positivi sono 28: 7 in Veneto; 11 in Friuli Venezia Giulia e 10 per la PA di Trento. Due allevamenti sono risultati dubbi in Friuli Venezia Giulia. La prevalenza intra-aziendale varia in misura considerevole negli allevamenti controllati: gli animali positivi infatti in media sono il 3% con un range che va dallo 0,88% al 7,14% (Tabella 5). Gli esiti sono accompagnati da un valore di SP direttamente proporzionale alla positività sierologica, infatti, valori di SP compresi tra 0,60 e 0,70 sono considerati dubbi, valori tra 0,70-1,0 sono considerati debolmente positivi, valori compresi tra 1,00 e 2,00 sono positivi e valori superiore a 2,00 sono fortemente positivi (Tabella 6). La localizzazione delle aziende positive, negative e dubbie di Veneto, Friuli Venezia Giulia e PA di Trento è rappresentata nelle Figure 4, 5 e 6.

Tabella 5. Allevamenti positivi alla sierologia

Regione	N° aziende positive	N° sieri positivi	Prevalenza intra-aziendale		
			Media	Minimo	Massimo
VENETO	7	12	2,79	1,61	6,45
FRIULI VENEZIA GIULIA	11	18	3,08	1,61	5,45
TRENTO	10	12	3,07	0,88	7,14
Totale	28	42	3,00	0,88	7,14

Tabella 6. Valori SP riepilogativi

	Media	Minimo	Massimo
VENETO	1,365	0,57	2,44
FRIULI VENEZIA GIULIA	1,114	0,63	2,19
TRENTO	0,96	0,57	1,90

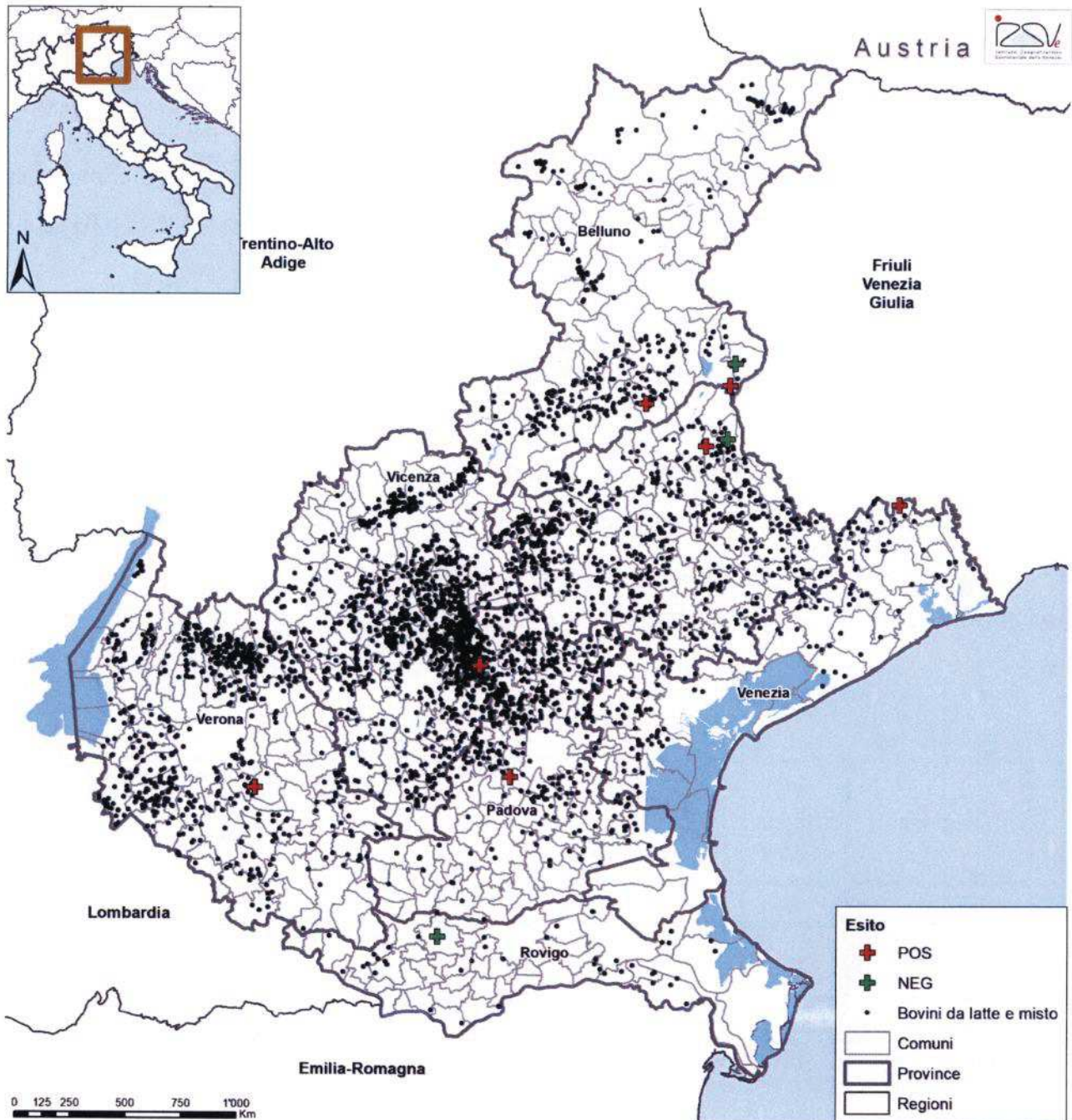


Figura 4. Localizzazione degli allevamenti positivi e negativi in Veneto

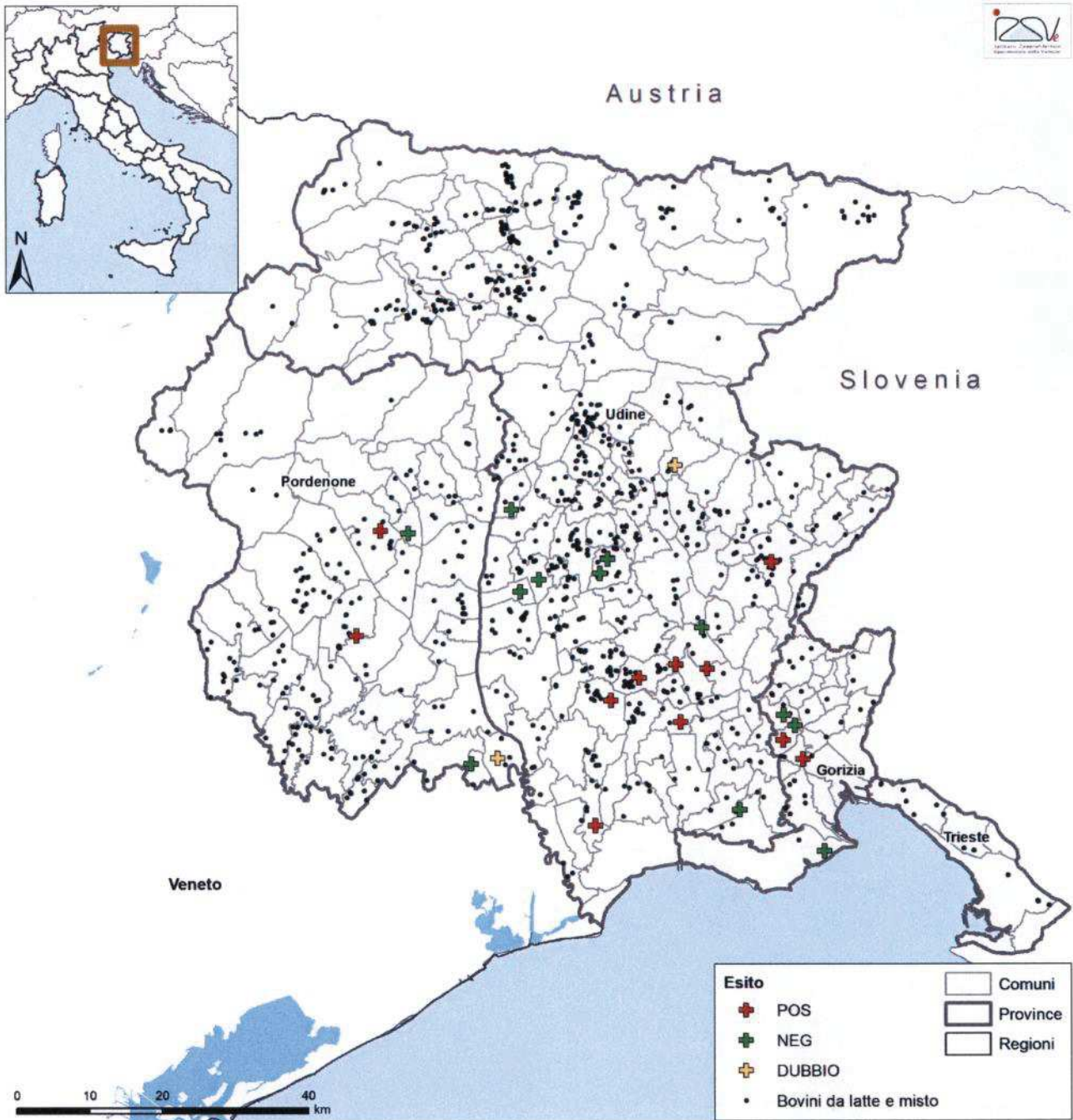


Figura 5. Localizzazione degli allevamenti negativi, positivi e dubbi in Friuli Venezia Giulia

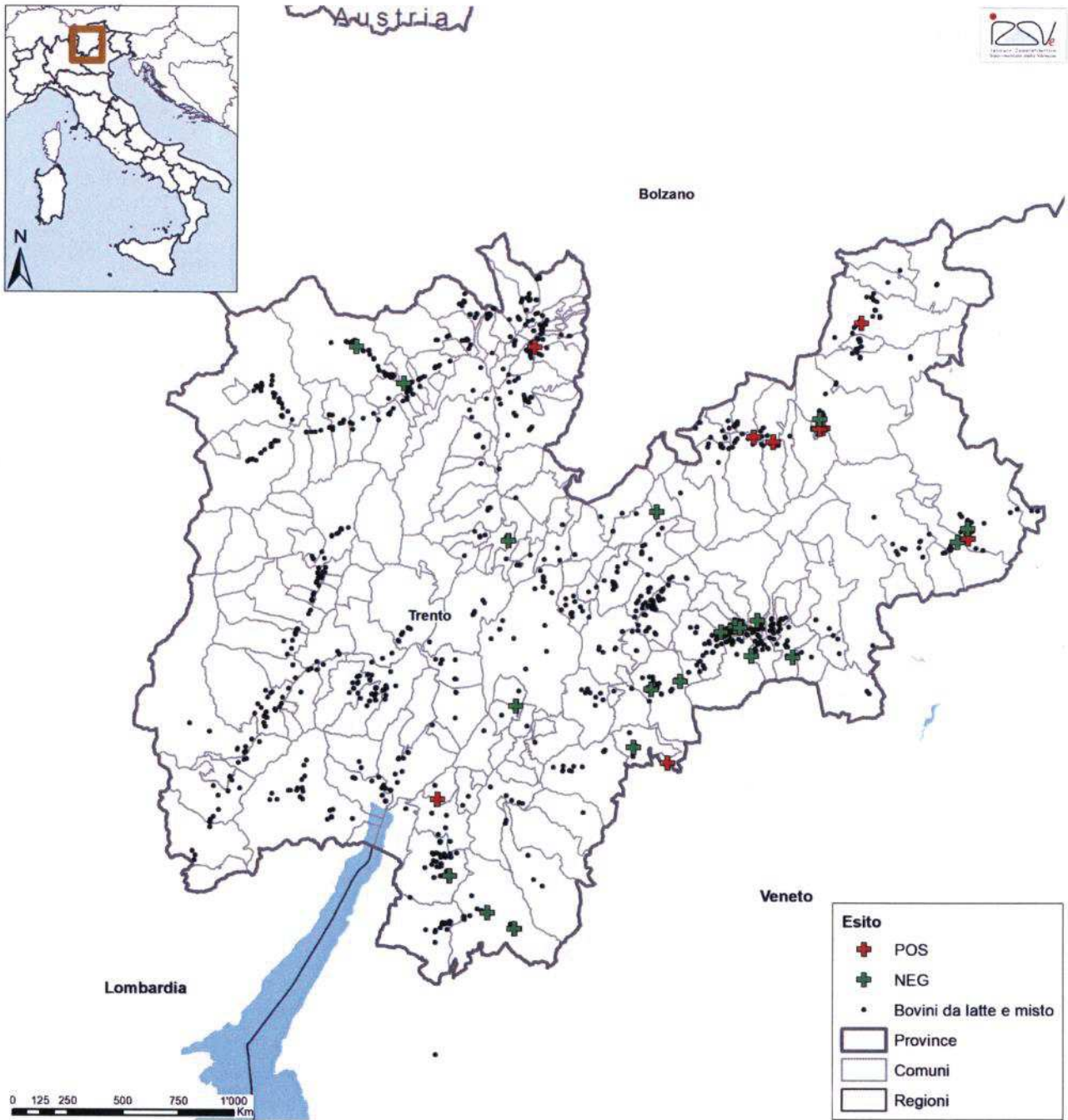


Figura 6. Localizzazione degli allevamenti negativi e positivi in provincia autonoma di Trento

RISULTATI QUESTIONARIO

Il questionario predisposto dal Centro di Referenza Nazionale per la paratubercolosi è stato somministrato in 34 allevamenti da parte del personale IZSVe: 10 in Veneto e 24 in Friuli Venezia Giulia.

Le aziende reclutate risultano molto differenti sotto i diversi aspetti: management, tipologia della struttura, numero di capi allevati e posizione geografica. Gli aspetti presi in considerazione per la categorizzazione del rischio di trasmissione paratubercolare sono molteplici e si basano sia sulla numerosità dei fattori di rischio per settore sia sul settore stesso, infatti la recettività all'infezione è maggiore nei vitelli e minore negli animali adulti. Grazie a una griglia di valutazione ogni singolo fattore di rischio è stato valutato e il punteggio per settore è stato ottenuto con la somma dei fattori di rischio. Infine la valutazione dei sei settori porta a un punteggio complessivo. I punteggi complessivi più elevati sono associati a un rischio più alto di trasmissione dell'infezione.

Gli allevamenti sono disposti in ordine crescente di rischio secondo i punteggi totali ottenuti nell'indagine (Tabella 7).

In autunno 2019 verranno compilati i questionari anche per le aziende della Provincia Autonoma di Trento, da parte del personale IZSVe.

Tabella 7. Risultati del questionario di valutazione del rischio paratubercolosi

	Sala parto	Svezamento	Vitelle svezate	Manze	Vacche	Animali acquistati	Totale
Massimo ottenibile	80	60	35	25	16	60	276
Ragione Sociale	Punteggi ottenuti						
Azienda 1	20	16	5	5	4	0	50
Azienda 2	27	12	5	6	4	0	54
Azienda 3	20	14	5	12	8	0	59
Azienda 4	27	19	6	6	5	0	63
Azienda 5	24	10	11	12	7	0	64
Azienda 6	32	18	0	10	5	0	65
Azienda 7	33	14	5	10	4	0	66
Azienda 8	44	6	10	7	2	0	69
Azienda 9	29	26	10	2	3	0	70
Azienda 10	33	9	16	9	7	0	74
Azienda 11	22	27	10	11	4	0	74
Azienda 12	36	12	11	12	6	0	77
Azienda 13	46	23	5	6	4	0	84
Azienda 14	34	22	10	11	9	0	86
Azienda 15	50	18	10	8	4	0	90
Azienda 16	45	26	10	5	4	0	90
Azienda 17	40	21	10	11	8	0	90
Azienda 18	32	22	11	19	8	0	92
Azienda 19	39	21	10	17	6	0	93
Azienda 20	35	31	11	11	8	0	96
Azienda 21	56	12	10	14	8	0	100
Azienda 22	39	29	13	12	10	0	103
Azienda 23	37	26	20	12	8	0	103
Azienda 24	48	31	10	12	4	0	105
Azienda 25	51	22	13	13	9	0	108
Azienda 26	45	23	14	20	7	0	109
Azienda 27	32	26	10	10	4	30	112
Azienda 28	55	27	14	12	7	0	115
Azienda 29	43	31	5	9	8	20	116
Azienda 30	54	23	14	20	8	0	119
Azienda 31	53	26	14	16	10	0	119
Azienda 32	62	26	12	14	6	0	120
Azienda 33	51	40	10	14	5	0	120
Azienda 34	28	48	25	20	12	0	133

Le voci che influiscono maggiormente sul punteggio totale sono la gestione della sala parto e della vitellaia: in media questi due settori da soli compongono il 69% del punteggio finale. In particolare, la sala parto influisce per il 43% e la gestione della vitellaia prima dello svezzamento per il 26%. La corretta gestione di questi due settori risulterebbe prioritaria per il miglioramento sanitario dell'allevamento. I settori dallo svezzamento in poi sembrano incidere meno sul punteggio totale di rischio di paratubercolosi (31%). Per quanto riguarda l'introduzione di nuovi animali, solo due aziende dichiarano di averne acquistati di recente, pertanto questa voce in generale non influisce sul rischio (Tabella 8, Figura 7).

Tabella 8. Riepilogo dei punteggi ottenuti

Fattori	Punteggio massimo ottenibile	Punteggio mediano ottenuto
Sala parto	80	38
Svezzamento	60	22,5
Vitelle svezzate	35	10
Manze	25	11,5
Vacche	16	6,5
Animali acquistati	60	0
Totale	276	91

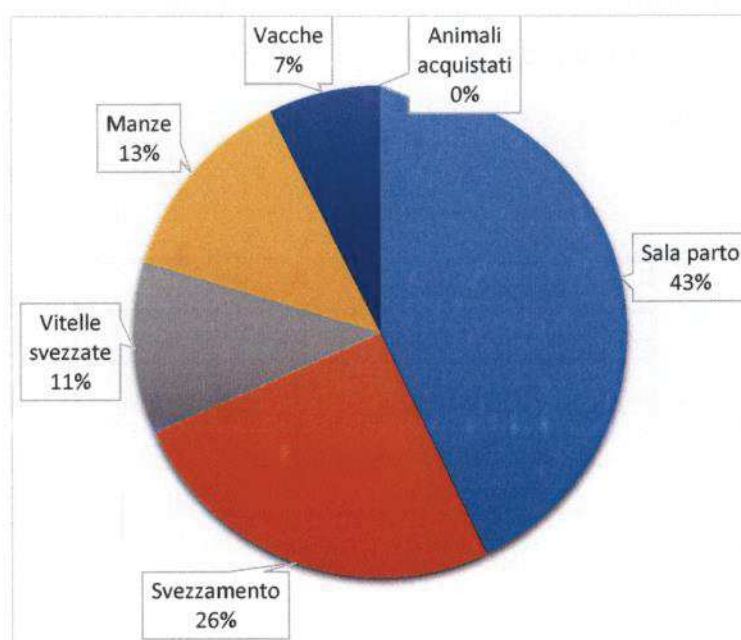


Figura 7. Suddivisione del rischio nelle aziende intervistate

I fattori di rischio maggiormente presenti nella sala parto sono:

- Utilizzo multiplo;
- Utilizzo come infermeria;
- Presenza capi infetti.

La prima voce si riferisce al fatto che in molti casi la sala parto ha un'alta densità di animali e questo può influenzare negativamente sulla contaminazione ambientale.

In secondo luogo molte aziende utilizzano la sala parto anche come infermeria per gli animali malati non gravidi.

In media gli allevamenti hanno ricevuto un punteggio elevato per la presenza di bovine infette in sala parto: questa valutazione è stata assegnata perché non esiste un piano di controllo per la paratubercolosi pertanto tali bovine si considerano di status sanitario sconosciuto.

Per quanto riguarda i vitelli prima dello svezzamento le voci che più influiscono sul rischio sono:

- Somministrazione colostro di singole bovine a più vitelli;
- Somministrazione di pool di latte non pastorizzato;
- Somministrazione di pool di colostro;
- Contatto diretto/indiretto con animali adulti e/o loro feci.

IL FATTORE PASCOLO

Un importante fattore di rischio per la trasmissione della paratubercolosi è rappresentata dal pascolo. Nelle aziende intervistate, solo 5 portano i capi al pascolo e di queste, quattro sono positive alla paratubercolosi (Tabella 9).

Tabella 9. Aziende con bovine al pascolo

Denominazione	Esito
Azienda 13	Positivo
Azienda 26	Positivo
Azienda 30	Negativo
Azienda 31	Positivo
Azienda 32	Positivo

➤ SECONDA FASE

RISULTATI SIEROLOGICI E ANALISI AMBIENTALI/INDIVIDUALI

Per la seconda fase sono state selezionate 10 aziende, di cui 5 risultate positive e 5 negative (Figura 8). Tra le negative, sono state scelte 3 aziende in Friuli Venezia Giulia (due in provincia di Pordenone e una in provincia di Udine) e due in Veneto (province di Belluno e Treviso). Stessa suddivisione per Regione per le aziende risultate positive, con 3 allevamenti in provincia di Udine, una in provincia di Venezia e una a Verona. Negli allevamenti selezionati sono stati eseguiti dapprima test PCR ambientali e in un secondo momento gli screening sierologici, PCR ed esame colturale su feci su una numerosità di animali tale da individuare una prevalenza pari o superiore al 15% e con un livello di confidenza del 95% (Tabella 10).

Figura 8. Aziende selezionate seconda fase

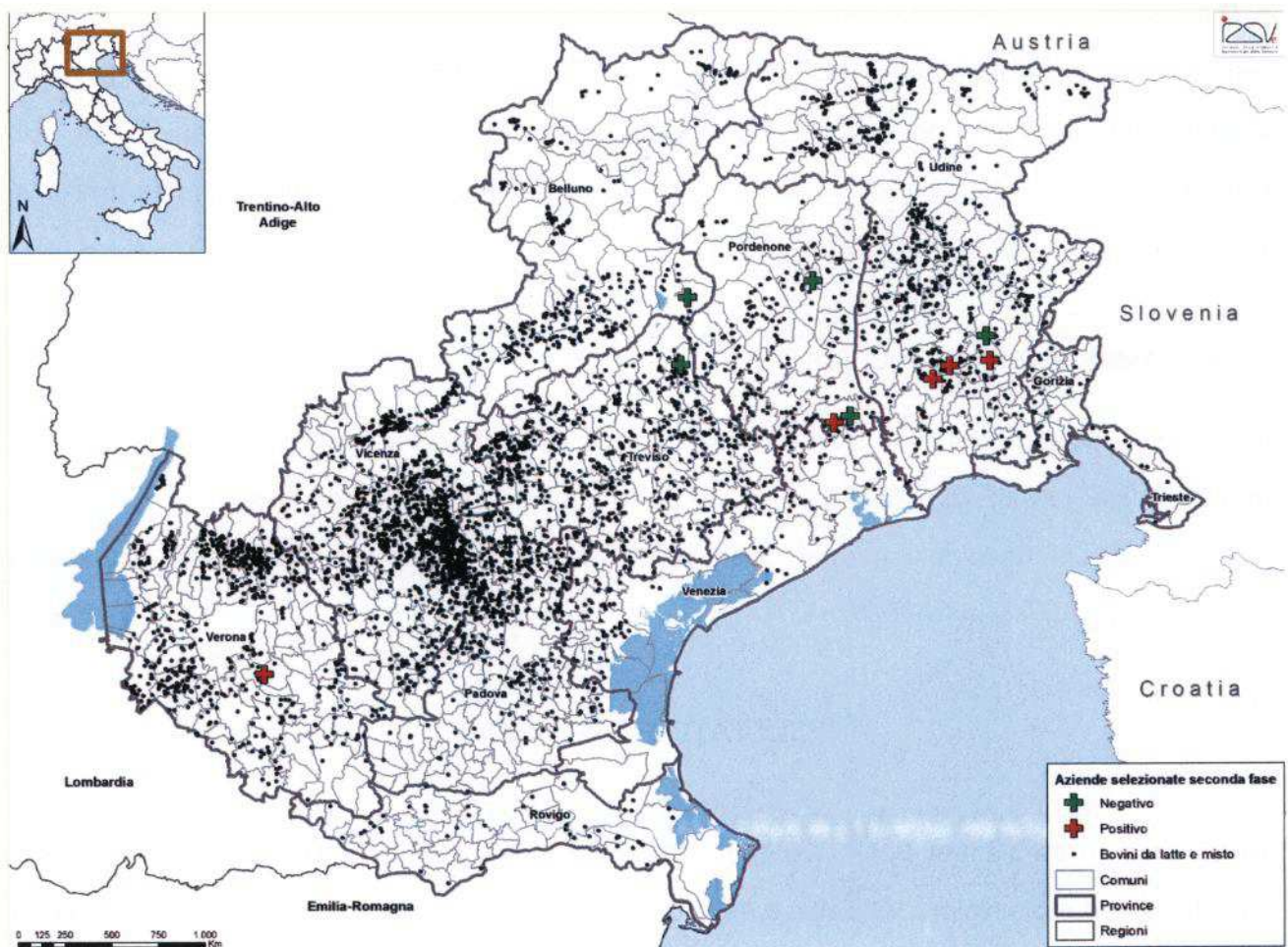


Tabella 10. Numerosità campionaria intra-aziendale di riferimento

N° CAPI IN ALLEVAMENTO	N° CAPI DA TESTARE
1-9	Tutte
10-12	9
13-14	10
15-18	11
19-22	12
23-28	13
29-37	14
38-52	15
53-81	16
82-172	17
172 +	18

1. CAMPIONAMENTO AMBIENTALE

Il campionamento ambientale di feci e lettiera per ogni allevamento selezionato è stato così distribuito: due campioni nelle vacche in lattazione, due campioni nelle vacche in asciutta e due campioni dai reflui (uno nel letame e uno nel liquame), per un totale di 6 campioni di feci e un complessivo di 60 campioni nelle 10 aziende. Questi campioni sono stati raccolti con provette falcon e abbassalingua in legno sterili.

2. CAMPIONAMENTO INDIVIDUALE

In un secondo momento sono stati effettuati i prelievi individuali nei capi delle dieci aziende, in massimo di 18 per allevamento. Si è cercato di campionare gli animali di età superiore ai 4 anni, dove possibile, in modo da aumentare la sensibilità del test. In totale sono stati esaminati 163 sieri e 162 campioni di feci individuali.

RISULTATI SECONDA FASE

Tutti i campioni ambientali (60) hanno dato esito negativo. Per quanto riguarda i sieri, solo un capo ha dato esito dubbio (valore S/P ELISA 0.47), detenuto in un allevamento in provincia di Venezia già risultato positivo durante la prima fase. Le analisi in PCR e microbiologiche delle feci individuali non hanno rilevato presenza del Micobatterio.

ACCERTAMENTI SU CAPI POSITIVI

Durante la seconda fase inoltre sono stati analizzati nuovamente tutti i capi risultati positivi nella prima fase che ancora erano presenti nei diversi allevamenti delle regioni Veneto e Friuli Venezia Giulia. Per ognuno è stato effettuato un secondo prelievo di sangue e un campione di feci, prelevato direttamente dal retto dell'animale.

I capi riscontrati positivi, tra Veneto e Friuli Venezia Giulia, sono stati in totale 30 suddivisi in 18 aziende. Al momento del secondo prelievo individuale, gli animali ancora presenti nei vari allevamenti erano 17 in 13 aziende (5 in Veneto e 8 in Friuli Venezia Giulia) (Figura 9). In Tabella 11 sono presenti ulteriori dettagli.

Figura 9. Capi positivi riesaminati per azienda

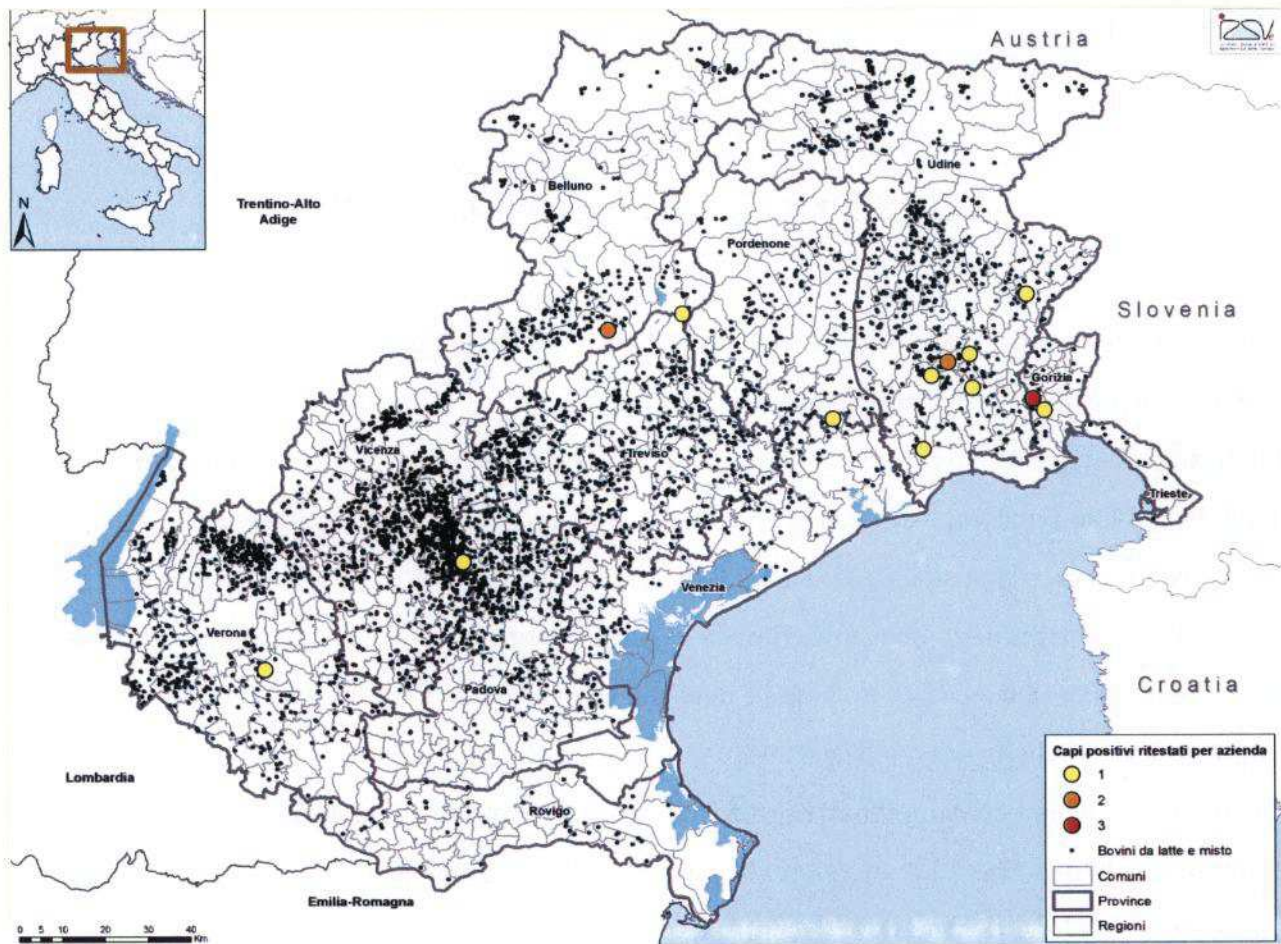


Tabella 11. Capi positivi siero ri-esaminati individualmente

Provincia allevamento	N° capi positivi	Valori S/P 1°FASE	Esito secondo prelievo
Udine	1	0.99	<i>In corso</i>
Udine	1	0.70	<i>In corso</i>
Udine	1	0.81	<i>In corso</i>
Udine	2	0.64 - 0.6	<i>In corso</i>
Udine	1	1.78	<i>In corso</i>
Udine	1	0.77	<i>In corso</i>
Gorizia	1	1.88	<i>In corso</i>
Gorizia	3	0.76 - 1.11 - 1.60	<i>In corso</i>
Belluno	1	1.86	<i>In corso</i>
Belluno	2	0.80 - 0.89	<i>In corso</i>
Verona	1	1.30	<i>In corso</i>
Padova	1	0.90	<i>In corso</i>
Venezia	1	0.86	<i>In corso</i>

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

I dati emersi dal controllo sierologico della prima fase evidenziano una positività interaziendale del 38,9% e una positività intraaziendale media del 3%.

Nel dettaglio: in Veneto la positività intraaziendale varia da 1,61% a 6,45% con valori di SP variabili da 0,57 a 2,44; in Friuli Venezia Giulia la positività varia da 1,61% a 5,45% con SP da 0,63 a 2,19; in P.A. di Trento invece la positività varia da 0,88 a 7,14% con SP compreso tra 0,57 a 1,19.

I valori SP riscontrati negli allevamenti delle regioni Veneto e Friuli Venezia Giulia, evidenziano mediamente valori più alti rispetto a quelli degli allevamenti testati in Provincia di Trento.

È stata stimata anche la prevalenza attesa per le due regioni, considerando il numero di positività rilevate sugli allevamenti campionati rispetto alla consistenza regionale della pezzata rossa del 2015 recuperata dal Bollettino A.I.A. In Veneto il numero di allevamenti è di 427, mentre in Friuli Venezia Giulia 448. Considerando il numero di controllati, ossia 10 in Veneto (con 7 positivi) e 26 in Friuli (11 positivi), ne deriva una prevalenza attesa della malattia compresa tra il 34.7% e il 93.3% e tra il 23.3% e il 63.3%, con un indice di confidenza del 95%, rispettivamente per le due regioni. Gli intervalli risultano piuttosto ampi in quanto il numero di allevamenti campionati rispetto al controllabile è molto basso, infatti il progetto prevede il controllo dei soli allevamenti che conferiscono vitelli al centro genetico.

Il campionamento ambientale effettuato nelle aziende selezionate non ha rilevato presenza del patogeno, né sulle 5 aziende negative né sulle positive. Questo potrebbe indicare una mancata eliminazione del micobatterio tramite le feci, al momento del prelievo, da parte degli animali sierologicamente positivi, oppure da un campionamento aziendale non sufficientemente intenso. Per aumentare la probabilità di isolamento del micobatterio sono stati quindi eseguiti gli accertamenti individuali sui capi sospetti che avevano evidenziato una positività sierologica nella prima fase del progetto, ritestandoli sia con l'ELISA con un ulteriore prelievo di sangue, sia con il campionamento di un aliquota di feci individuale da testare tramite PCR e con esame colturale.

Al momento le analisi sono in corso.

La fase successiva del progetto, prevede il campionamento, per quanto possibile, di campioni sangue e di intestino dei capi che saranno inviati al macello provenienti dai dieci allevamenti selezionati per la fase due.

Infine, per quanto riguarda il management, le fasi più critiche dell'allevamento sono risultate la gestione della sala parto e della vitellaia.

I fattori che potrebbero influire maggiormente sul rischio di trasmissione di malattia sono:

- Sovraffollamento;
- Scarsa igiene;
- Utilizzo della sala parto come infermeria;
- Utilizzo di colostro proveniente da bovine con status sanitario sconosciuto per paratubercolosi;
- Contatto prolungato tra bovine e vitelli.

Allegato 3

**SCHEDE PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO DI TRASMISSIONE DI INFEZIONE PARATUBERCOLARE NEGLI ALLEVAMENTI DI BOVINE DA LATTE
A. SALA PARTO**

Dal momento che la recettività all'infezione è massima negli animali giovani e diminuisce con l'età, viene attribuito a questa fase un punteggio superiore rispetto alle altre fasi.

I fattori di rischio per la sala parto devono essere valutati in funzione del rischio potenziale che il vitello possa ingerire Map, presente all'interno delle feci di animali adulti infetti ed eliminatori. Tali fattori riguardano la pulizia della sala parto, delle mammelle e dei capezzoli delle vacche al parto, la possibilità che il vitello si alimenti direttamente da mammelle di animali infetti o contaminate da feci infette o la possibilità di contaminazione della superficie corporea del vitello.

Fattori di rischio	Criteri per il punteggio	rischio	punti
1 Utilizzo dell'area per più animali contemporaneamente	- box da parto singoli - sale parto multiple con bassa densità di animali - sale parto multiple con alta densità di animali	minimo moderato massimo	0-1 4-6 9-10
2 Igiene della lettiera	- area pulita ed asciutta - accumulo limitato di letame - accumulo notevole di letame	minimo moderato massimo	0-1 4-6 9-10
3 Utilizzo dell'area parto come infermeria delle vacche	- no, praticamente mai - l'infermeria è adiacente alla sala parto - la sala parto è utilizzata come infermeria	minimo moderato massimo	0-1 4-6 9-10
4 Utilizzo dell'area anche per le bovine con Paratubercolosi clinica o positive ai test	- no, praticamente mai - solo per gli animali a basso rischio - sia per gli animali ad alto rischio che per i casi clinici	minimo moderato massimo	0-1 4-6 9-10
5 Stato igienico delle mammelle al momento del parto	- 90% delle mammelle sono tostate, pulite e asciugate - moderatamente sporche nel 20-40% degli animali - molto sporche nella maggioranza degli animali	minimo moderato massimo	0-1 4-6 9-10
6 Nascita dei vitelli in altre zone dell'allevamento, in contatto con animali adulti	- no, praticamente mai - nel 15-25% dei casi - in oltre il 40% dei casi	minimo moderato massimo	0-1 4-6 9-10
7 Permanenza dei vitelli neonati con la madre	- di routine meno di 30' - la maggior parte dei vitelli rimane per 1-4 ore - la maggior parte dei vitelli rimane per più di 6 ore	minimo moderato massimo	0-1 4-6 9-10
8 Suzione di colostro direttamente dalla mammella della madre	- no, praticamente mai - sì, perché rimangono con la madre per 1-4 ore - sì, perché rimangono con la madre per più di 6 ore	minimo moderato massimo	0-1 4-6 9-10

A. SALA PARTO	0	1. Molto basso	2. Basso	3.	4.	5. Moderato	6.	7.	8. Alto	9.	10. Molto alto
1. Utilizzo multiplo											
2. Igiene della lettiera											
3. Utilizzo come infermeria											
4. Presenza di capi infetti											
5. Stato igienico delle mammelle al parto											
6. Vitelli nati in altre aree											
7. Tempo di permanenza con la madre											
8. Vacche nutrici											

Massimo punteggio = 80.

Punteggio totale rilevato per la fase A