



## Direttive tecniche

concernenti il

### **prelievo e l'analisi di campioni per la diagnosi della paratubercolosi (*Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*, MAP)**

del 12 luglio 2016

---

Visti gli articoli 237 capoverso 2 e 312 capoverso 5 dell'ordinanza del 27 giugno 1995 sulle epizootie (OFE; RS 916.401), l'Ufficio federale della sicurezza alimentare e di veterinaria (USAV) emana le seguenti **direttive**:

#### **I. Campo d'applicazione**

1. Le presenti direttive tecniche regolamentano i requisiti per il prelievo e l'analisi di campioni per la diagnosi della paratubercolosi (ParaTb), *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* (MAP) negli animali delle specie bovina, ovina, caprina compresi i bufali e i camelidi del nuovo mondo nonché nei ruminanti selvatici tenuti in cattività che esibiscono segni clinici o cambiamenti anatomo-patologici tali da destare il sospetto di paratubercolosi (caso di sospetto secondo l'art. 238 cpv. 1 OFE). Stabiliscono i materiali da esaminare e i metodi d'analisi da applicare.

#### **II. Prelievo dei campioni**

2. Il veterinario cantonale decide la persona responsabile del prelievo dei campioni.
3. Come materiali da esaminare per l'identificazione diretta del MAP servono campioni fecali, strisci di mucosa intestinale rettale, parti intestinali patologicamente alterate (prevalentemente digiuno o ileo) o linfonodi intestinali.
4. Deve essere prelevato materiale adeguato in recipienti sterili, a tenuta di liquido.

Ciascun campione necessita di un triplice imballaggio e prevede:

- a. un contenitore stabile (impermeabile all'aria e all'acqua)
- b. un secondo imballaggio (p. es. involucro di plastica con sufficiente materiale assorbente per trattenere tutte le eventuali fughe di liquido) e
- c. un imballaggio esterno (p. es. scatola per il trasporto).

Sull'imballaggio è necessario riportare l'indicazione «Sostanza biologica, categoria B» e l'etichetta con il numero «UN 3373».

Il pacco deve essere spedito per posta prioritaria o corriere. Bisogna assicurarsi che i campioni arrivino in laboratorio il giorno dopo.

### III. Laboratori

5. I laboratori che svolgono le analisi nell'ambito della lotta ufficiale contro la ParaTb necessitano del riconoscimento da parte dell'USAV (art. 312 OFE). L'elenco dei laboratori riconosciuti è pubblicato su Internet: <https://www.blv.admin.ch/blv/it/home/tiere/tierseuchen/tierseuchendiagnostik.html>.
6. Il veterinario cantonale decide a quale laboratorio riconosciuto per la ParaTb inviare il campione da analizzare.
7. **Laboratorio nazionale di riferimento:** Institut für Veterinärbakteriologie, Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, Winterthurerstrasse 270, CH-8057 Zürich.

### IV. Metodi d'analisi

#### 8. Amplificazione del DNA specifico del MAP (PCR real-time)

Materiali da esaminare: feci, strisci di mucosa intestinale rettale, mucose intestinali patologicamente alterate, linfonodi intestinali, colture batteriche con sospetto di MAP.

Per l'identificazione diretta del MAP nel campione si devono impiegare unicamente sistemi di PCR real-time approvati dall'USAV. Su Internet sono pubblicati i kit omologati dall'USAV per i test: <https://www.blv.admin.ch/blv/it/home/tiere/tierseuchen/tierseuchendiagnostik.html>. Occorre attenersi alle istruzioni del produttore del kit. È importante la corretta estrazione preliminare del DNA per i micobatteri, che deve contenere una disagregazione meccanica.

#### 9. Messa in evidenza microscopica dell'agente patogeno

Materiali da esaminare: feci, strisci di mucosa intestinale rettale, mucose intestinali patologicamente alterate, linfonodi intestinali.

Metodo di analisi: colorazione chimica degli strisci secondo Ziehl-Neelsen. Analisi al microscopio ottico con ingrandimento di 1000 volte.

Identificazione di batteri acido-resistenti: anche nel tubo digerente dei ruminanti sani sono identificabili batteri acido-resistenti di varie dimensioni. Pertanto, la messa in evidenza microscopica di batteri acido-resistenti nello striscio colorato chimicamente del materiale da esaminare non costituisce una prova inequivocabile della presenza di MAP. Solo in concomitanza con i sintomi clinici tipici della ParaTb e/o i caratteristici cambiamenti anatomico-patologici della mucosa intestinale, la messa in evidenza microscopica di piccoli batteri acido-resistenti (ca. 1,5 x 0,5 µm) nei caratteristici agglomerati densi di ≥ 3 batteri è un importante indizio eziologico. Gli esiti microscopici positivi devono essere confermati con una PCR specifica per il MAP.

A causa dell'escrezione intermittente e della distribuzione disomogenea del MAP in un campione, un esito microscopico negativo non esclude con certezza un'infezione da MAP. Per escludere la ParaTb, l'analisi deve procedere con la PCR o la coltura.

#### 10. Messa in evidenza in coltura

Materiali da esaminare: feci, strisci di mucose intestinali rettali, mucose intestinali patologicamente alterate, linfonodi intestinali.

Il materiale da esaminare è integralmente omogenato e decontaminato. L'inoculo è immerso in almeno due tubetti (agar a becco di clarino) Herrold's Egg Yolk Medium con micobactina e incubato per **12-16 settimane**. Occorre analizzare a intervalli regolari la crescita di colonie MAP tipiche. Le colonie sospette sono identificate come MAP tramite PCR. L'analisi conclusiva avviene tramite il prelievo delle colture e l'analisi PCR del DNA del materiale prelevato.

11. Se i reperti degli esami anatomo-patologici (sezione, istologia, colorazione Ziehl-Neelsen) indicano la presenza di una paratubercolosi, l'agente patogeno deve essere identificato tramite PCR.
12. La sierologia non è adatta alla diagnostica sul singolo animale, pertanto non rientra nel campo di applicazione di queste informazioni tecniche.

## **V. Analisi nei casi sospetti e valutazione dei reperti**

13. Il materiale adeguato prelevato da singoli animali che presentano segni clinici di infezione o cambiamenti anatomo-patologici è analizzato tramite PCR diretta.
14. Se la PCR dà esito positivo per la presenza di MAP, l'animale è considerato MAP-positivo (caso di epizoozia).
15. Se la PCR dà esito negativo per la presenza di MAP, l'analisi tramite PCR viene ripetuta con un nuovo campione. Se la seconda analisi dà esito positivo, l'animale è considerato MAP-positivo (caso di epizoozia). Se anche la seconda analisi dà esito negativo, l'animale è considerato MAP-negativo (nessun caso di epizoozia).

## **VI. Stesura del rapporto**

16. I risultati devono essere notificati alla banca dati dei laboratori dell'USAV secondo le disposizioni descritte nelle «Direttive tecniche concernenti il rendiconto ad alis, il sistema di informazione dei laboratori, da parte dei laboratori riconosciuti».

## **VII. Obbligo di notifica per i laboratori**

17. Il laboratorio di analisi notifica senza indugio al competente veterinario cantonale (secondo l'art. 237a cpv. 2 OFE) i risultati positivi di uno dei metodi di analisi di cui al capitolo IV (Messa in evidenza dell'agente patogeno).

## **VIII. Entrata in vigore**

Le presenti direttive entrano in vigore il 15.08.2016.

UFFICIO FEDERALE DELLA SICUREZZA ALIMENTARE E DI VETERINARIA