

Sintesi dei risultati raggiunti dal progetto di ricerca CRC 2013

Prima fase:

sviluppo ed industrializzazione di un protocollo per la concentrazione delle immunoglobuline da latte

sviluppo e produzione di un test elisa indiretto su base ricombinante per la ricerca di anticorpi diretti verso la gE e industrializzazione del processo
prove di sensibilità del metodo

Nella prima fase del progetto sono stati sviluppati metodi pratici ed economici per la concentrazione delle immunoglobuline da latte. All'utilizzo di matrici di affinità, inizialmente adottate, se è progressivamente passati ad un metodo di doppia precipitazione sequenziale: la prima precipitazione prevede la separazione delle caseine e del grasso dal siero di latte; la seconda precipitazione prevede l'utilizzo di una soluzione precipitante e la conseguente precipitazione delle proteine totali. Il secondo precipitato viene risospeso nel tampone di diluizione (1/1 Vol/Vol) ottenendo un volume tale da permettere l'esecuzione in doppio del test sierologico.

Parallelamente è stato industrializzato il metodo ELISA basato sulla glicoproteina E espressa in forma ricombinante su cellule di mammifero. Il test indiretto ha previsto l'utilizzo di un antigene negativo per minimizzare il rischio di falsi positivi ed un coniugato anti IgG bovine marcato con perossidasi. Per aumentare la sensibilità del metodo è stato impiegato come cromogeno la tetrametilbenzidina. Prove di sensibilità condotte in laboratorio diluendo volumi di latte positivo in volumi crescenti di latte negativo ha permesso di confermare che il protocollo di concentrazione sequenziale manteneva gli stessi livelli ottenuti in via preliminare con matrici di affinità. La specificità invece risultava nettamente aumentata, anche allungando il periodo di incubazione del primario overnight a 4 °C. Il test ELISA, comprensivo dei reagenti per concentrare le IgG da latte è stato quindi ottimizzato dalla in3diagnostic, partner del progetto, e reso disponibile presso il laboratorio APA a partire da Maggio 2015.

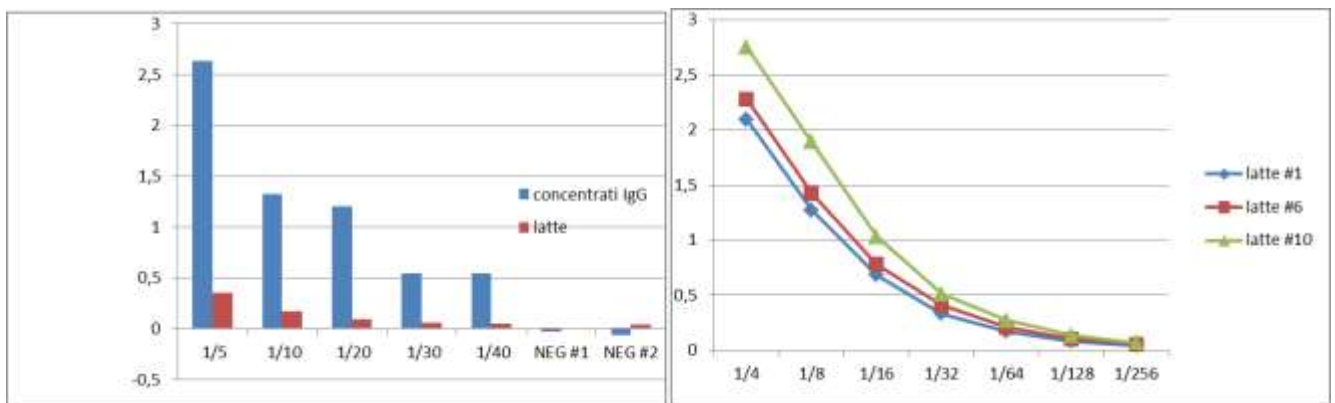


Fig. 1 Sensibilità analitica del test ELISA utilizzato nello studio. Diluizioni di latti positivi per anticorpi anti gE sono state effettuate in laboratorio utilizzando come diluente latte di massa di aziende vaccinate marker. I pool così ottenuti sono stati sottoposti a protocollo di concentrazione di IgG e testati in ELISA.

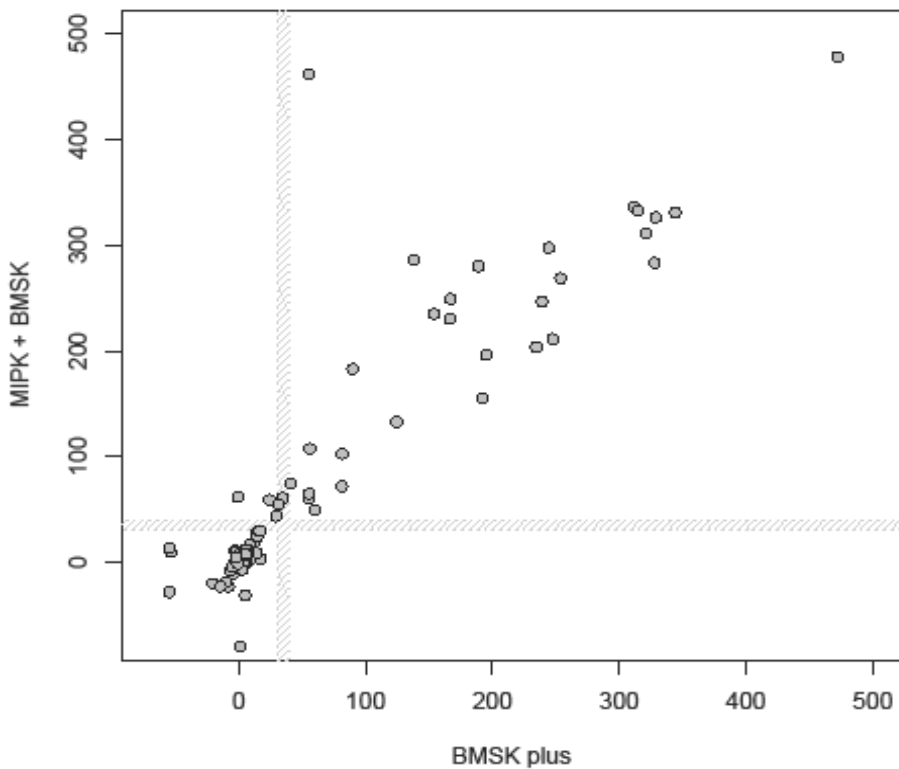


Fig 2 Plot a dispersion. Due metodi di concentrazione delle IgG a confronto. La doppia precipitazione (asse delle ascisse), adottata nello studio su campo è stata confrontata con la purificazione mediante matrice di affinità (asse delle ordinate).

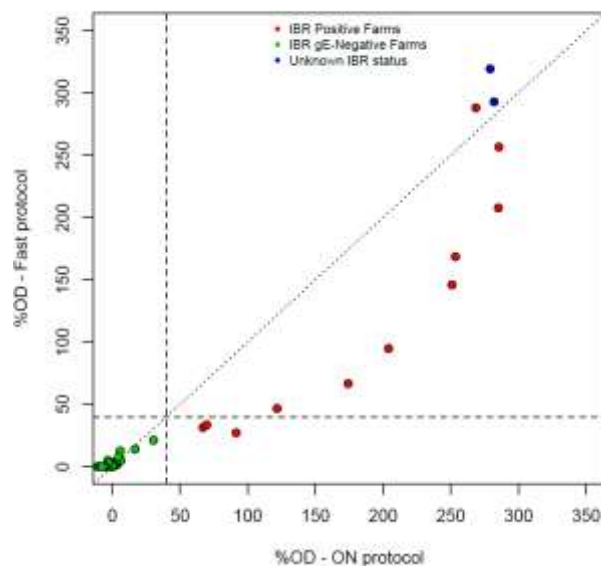


Fig 3 Plot a dispersion. Due metodi di incubazione delle IgG a confronto: l'incubazione overnight a 4°C (asse delle ascisse) è stata confrontata con l'incubazione rapida di un'ora a 23°C (asse delle ordinate). Il primo metodo risulta più sensibile specialmente nei campioni deboli positivi.

Seconda fase:

selezione delle aziende partecipanti in funzione dello stato sanitario

Nella giornata del 4 dicembre 2014, nei locali della sede Apa di Cuneo, si è tenuta la riunione di inizio progetto coinvolgendo tutti partners (Dipartimento di Scienze veterinarie, Associazione Provinciale Allevatori, ora Associazione Regionale Allevatori del Piemonte, Servizio Veterinario - Azienda Sanitaria Locale CN1, Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Cuneo). Durante l'incontro è stato concordato l'organigramma delle attività da svolgersi a partire dal 2015 da parte di ciascuno dei partner coinvolti.

In seguito sono state individuate tutte le aziende bovine da latte associate all' APA, cui mensilmente attraverso la rete dell'associazione stessa, vengono effettuati i controlli funzionali su ogni campione di latte individuale. Di tutte queste aziende è stato verificato contestualmente, sul sistema informatico ufficiale Arvet, l'eventuale stato sanitario per IBR, ove presente (azienda aderente al piano regionale per il controllo e l'eradicazione dell'IBR).

Inoltre, per catalogare le aziende in fasce di interesse ai fini del progetto, è stata condotta un'analisi preliminare sul latte di massa di circa 250 aziende iscritte all' APA, dalla quale è emersa una percentuale significativa di aziende con prevalenza di infezione molto bassa. Su tali aziende si è concentrato lo sforzo maggiore nella fase di reclutamento, in quanto si prevedeva fossero quelle che avrebbero tratto il massimo vantaggio, essendo prossime ad ottenere la qualifica più favorevole.

Il giorno 16-01-2015, presso la sede dell' Apa di Cuneo, si è tenuto il primo incontro fra i partner del progetto e le unità operative dell' Apa che svolgono la raccolta del latte in azienda per i controlli funzionali di routine (c.d. Controllore APA). A ciascun controllore è stato quindi spiegato l'obiettivo del progetto e l'importanza del suo coinvolgimento per il successo dello stesso. Ogni controllore aveva infatti il compito di divulgare nella propria area di lavoro la natura e lo scopo del piano, di reclutare le aziende volontarie e registrarne le adesioni, tramite un modulo di consenso informato.

In particolare al controllore era stato affidato il compito di coinvolgere soprattutto le aziende considerate interessanti ai fini del progetto (aziende debolmente positive, negative, negative vaccinate con vaccino delecto, indenni ed ufficialmente indenni): allo scopo ad ogni controllore era stata assegnata una tabella riportante le aziende di sua pertinenza divise per colore in base alla classe di interesse. :

A partire dal 21-01-2015 è stato distribuito agli allevatori cuneesi, attraverso i propri Controllori APA, un volantino informativo per illustrare lo scopo del progetto ed invitare gli stessi all'incontro del 10-02-2015 presso la sala Brut e Bon del comune di Fossano per approfondire l'argomento e chiarire eventuali dubbi.

Il reclutamento delle aziende volontarie si è concluso nel mese di maggio 2015 ed è riuscito a coinvolgerne 313 di cui 154 classificate positive, 122 negative e 37 non ancora aderenti al piano volontario regionale.

Su tutte le aziende aderenti il progetto garantiva un controllo diagnostico su sangue individuale su tutti gli animali di età superiore ai 24 mesi; per le 37 aziende non ancora classificate, la partecipazione al progetto è stata anche l'occasione per aderire al piano regionale IBR e verificare la propria situazione.

Durante la riunione del 15-05-2015, presso la sede APA di Cuneo, sono state dettagliate ai controllori le modalità operative per la gestione dei campioni di latte dei controlli funzionali.

Riferimenti normativi:

Il protocollo diagnostico è stato disegnato per risultare conforme alla normativa europea, nell'ottica di consentire un futuro riconoscimento di un piano di controllo obbligatorio in ambito regionale

In particolare si è tenuto conto di quanto stabilito dalla decisione 2004/558/CE nell'allegato 3:

Decisione 2004/558/CE –diritto consolidato-

punto 1.4.3 (acquisizione qualifica)

“tre campioni di latte raccolti con un intervallo di almeno tre mesi da un gruppo di latte di non più di 50 femmine in lattazione, a seconda delle specifiche dell'esame impiegato”

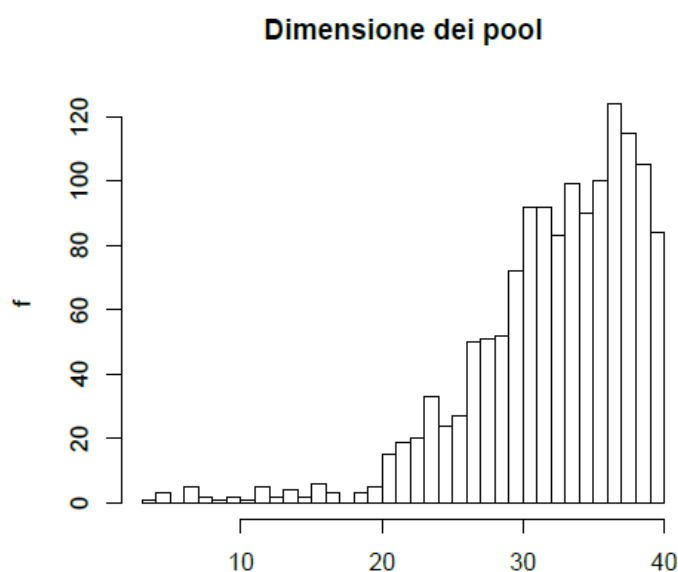
punto 2.2.3 (mantenimento qualifica)

“due campioni di latte raccolti con un intervallo da tre a dodici mesi da un gruppo di latte di non più di 50 femmine in lattazione, a seconda delle specifiche dell'esame impiegato”

Il metodo proposto dal progetto prevedeva:

- la calendarizzazione di due controlli annuali per le aziende indenni ed ufficialmente indenni e tre controlli annuali per le aziende negative vaccinate, negative e positive;
- lo stoccaggio del latte raccolto durante i controlli di routine in un'area appositamente dedicata delle celle frigorifere e la composizione nella stessa mattinata di pool di latti singoli di non più di 40 animali (1 ml ciascuno);

Nel grafico seguente viene illustrata la distribuzione dei pool di latte in base alla consistenza. Il numero di campioni individuali viene automaticamente determinato dal software utilizzato, sulla base nel numero degli animali in lattazione al momento del prelievo.



- il campionamento in singolo per le aziende composte da non più di 10 animali in lattazione;
- il ricampionamento, durante il mese successivo, su tutte le aziende negative risultate positive al test su pool.

Per la gestione dei dati è stato sviluppato un software dedicato per identificare ed etichettare in modo univoco il codice di ogni pool, associato a ciascun codice a barre presente sui singoli campioni di latte, e recante anche il codice azienda e la qualifica per IBR.

Nel mese di giugno 2015 a ciascuna azienda aderente è stata consegnata una lettera di ringraziamento per la collaborazione, riportante l'indirizzo web per accedere con un codice personale ad un file condiviso (Google Drive), sul quale sarebbero stati inseriti in tempo reale i risultati dei test in forma anonima.

Al fine di presentare le linee guida del progetto ed i tempi di realizzazione, uniformare le strategie ed il tipo di informazione, è stato effettuato un incontro con i veterinari ASL ed i veterinari liberi professionisti operanti nel cuneese nella giornata del 26-06-2015.

La fase operativa ha avuto inizio il giorno 18-05-2015.

Il latte dei controlli funzionali è stato raccolto nei suddetti pool e trattato al fine di concentrare le immunoglobuline con il kit BMSK Plus industrializzato dalla In3diagnostic. I concentrati ottenuti sono stati testati in ELISA ed i risultati sono stati caricati sul file condiviso con gli allevatori.

Durante i primi quattro mesi di campionamento sono stati testati 27076 animali di 317 aziende, 829 pool e 33 campioni di latte singoli. Sono risultate discordanti e pertanto ricontrollate il mese successivo 2 sole aziende classificate negative dai precedenti controlli Asl. Per entrambe è stata tuttavia dimostrata la recente circolazione virale e quindi sono state riclassificate positive da reinfezione.

Sono invece risultate negative al test su latte ma classificate positive da vecchi controlli Asl, 93 aziende su 162. Su tali aziende il progetto prevedeva un esame sierologico individuale secondo il protocollo diagnostico ufficiale, al fine di aggiornare lo stato sanitario ed effettuare la stima accurata della sensibilità del metodo proposto nella presente ricerca. Si tratta infatti di aziende che probabilmente hanno continuato negli anni il programma di controllo previsto, vaccinando le nuove generazioni con vaccino marker ed eliminando progressivamente gli animali a fine carriera. Su queste aziende positive, il piano prevedeva solo il controllo su un ristretto numero di capi giovani, allo scopo di verificare la progressione della eradicazione, limitando il controllo dei capi positivi a esame eseguiti diversi anni prima.

Nel corso dei primi quattro mesi hanno rinunciato al progetto 12 aziende, per ragioni legate alla chiusura delle stesche o alla vendita degli animali, o ancora per non aver mantenuto l'impegno a consentire i controlli individuali su sangue (controlli ufficiali), mentre sono entrate nel progetto 4 nuove aziende.

I campionamenti sono stati sospesi nel mese di agosto 2015 (per interruzione dei controlli funzionali da parte dell'Apa) e sono ripresi a settembre 2015.

A dicembre 2015 (18-12-2015), presso la sede Arap di Cuneo, si sono riuniti i partner del progetto per fare il punto della situazione, illustrare i dati ottenuti e programmare le attività 2016.

Gli animali testati sino a quel momento risultavano 47000 per 1404 pool. Per il secondo blocco di analisi (settembre 2015 – dicembre 2015) era preventivato il campionamento delle sole aziende classificate negative vaccinate, negative e positive escludendo le aziende indenni e ufficialmente indenni. Sono state individuate anche in questa fase due aziende discordanti rispetto ai dati ufficiali, risultate ai successivi controlli Asl, positive da reinfezione.

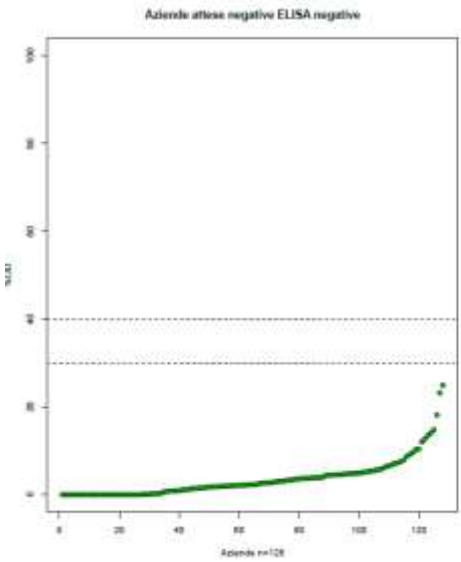
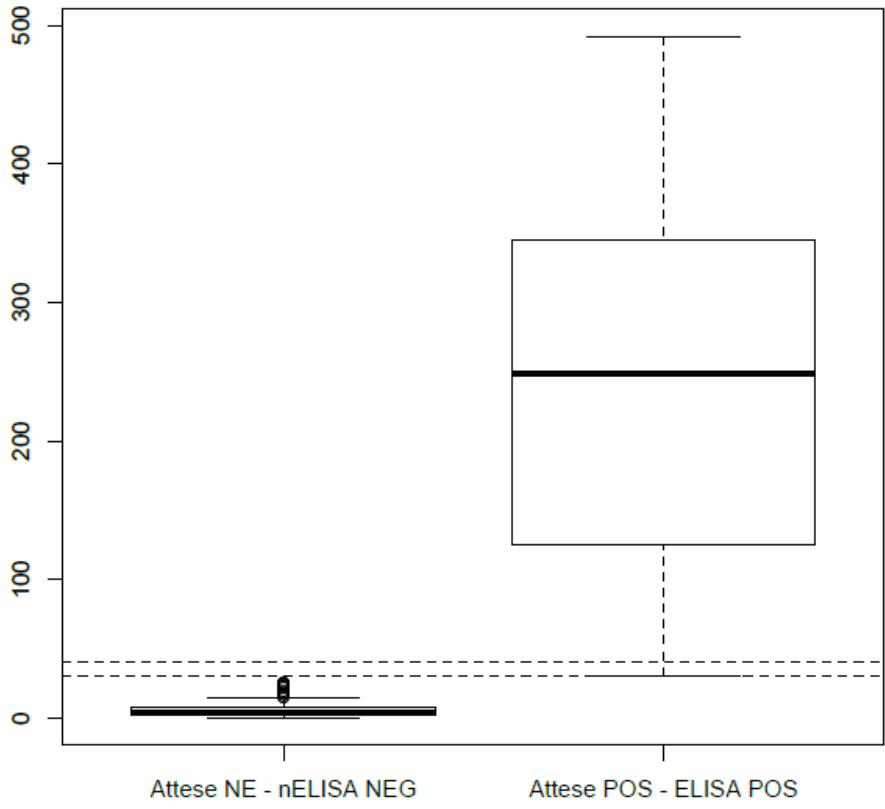
Una criticità emersa ha riguardato le aziende positive ma con bassa prevalenza, per le quali si è deciso di ridurre a 20 il numero di campioni per pool in modo da ridurre il potenziale rischio di falsi negativi.

Un'altra criticità riscontrata è stata la difficoltà di ottenere dati ufficiali aggiornati rispetto ai controlli sul latte.

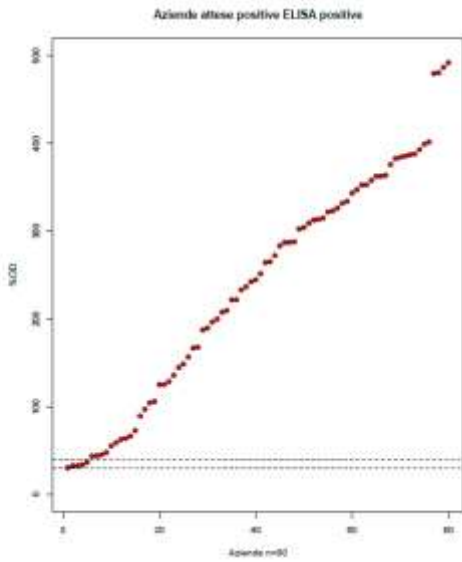
Il giorno 18-02-2016 è stata inoltre effettuata una riunione dei referenti del progetto al fine di organizzare l'implementazione della piattaforma informatica per far dialogare il sistema di Arvet con quello dell'Associazione Italiana Allevatori. Tale azione, risulterà particolarmente importante nelle fasi successive al progetto di ricerca, qualora le autorità sanitarie decidessero l'adozione del metodo di sorveglianza su latte.

Risultati aggiornati ad Aprile 2016

Nell'ultimo blocco di controlli (gennaio 2016 – aprile 2016) sono state ricampionate tutte le aziende aderenti per un totale cumulativo di 2214 pool e circa 70000 animali. Per le aziende classificate indenni ed ufficialmente indenni il test su latte ha confermato i dati ufficiali. Quarantaquattro aziende inizialmente classificate positive ma risultate negative al test su latte sono state riclassificate in base ai recenti controlli ufficiali come negative, confermando che il metodo su pool di latte può essere convenientemente adottato anche per portare in qualifica le aziende (§1.4.3) e non solo per attività di sorveglianza (§2.2.3). Diciotto aziende senza qualifica sono entrate nel piano regionale e classificate come positive, mentre 4 senza qualifica e risultate negative ai test ufficiali hanno ottenuto la pre-qualifica di "negative".



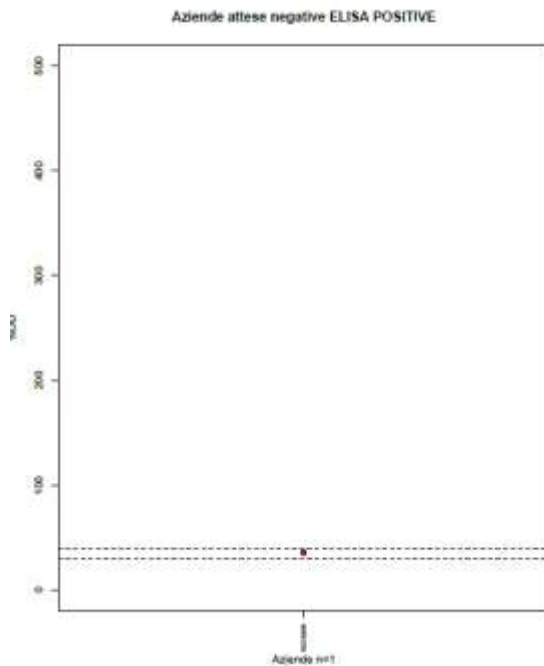
Aziende Attese Negative – ELISA Negative: n=128
 Pool testati: n=732
 Campioni di latte testati: n= 17578



Aziende Attese Positive – ELISA Positive: n=80
 Pool testati: n=603
 Campioni di latte testati: n= 12957

Le figure precedenti illustrano le distribuzioni delle Densità ottiche delle aziende negative e positive con risultato su pool di latte conforme alla qualifica sanitaria aggiornata.

Di seguito vengono illustrati i casi in cui il test su pool di latte ha restituito un risultato non conforme rispetto alla qualifica ARVET e per le quali si rende necessario un approfondimento. In particolare una sola azienda negativa, ha restituito un risultato dubbio in un pool. In tale azienda il successivo controllo su tutti i pool ha confermato la negatività.

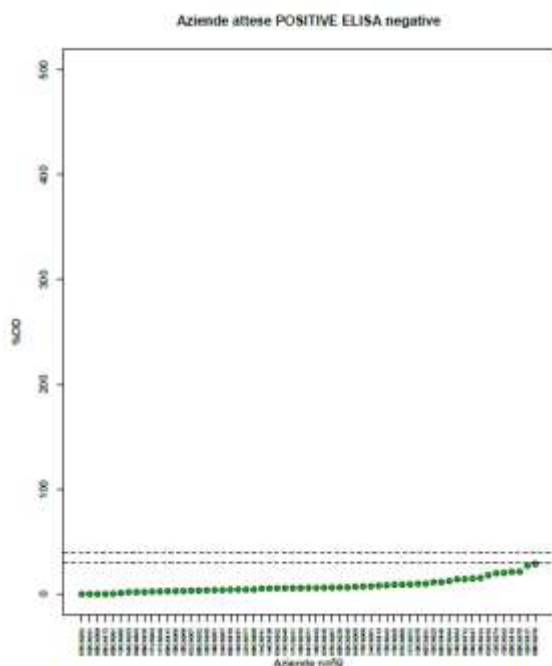


ElisaPOS – ArvetNEG: n=1

Nel grafico non sono comprese 4 aziende negative ma con risultato positivo su latte in cui è stata invece dimostrata circolazione virale, confermata dai successivi controlli sierologici a campione. Il dettaglio dei 4 episodi di circolazione virale è riportato nella tabella di seguito.

codice_aziendale	QUALIFICA201505	QUALIFICA201511	QUALIFICA201604
179CNXXX	AZ. NEGATIVA VACCINATA DELETO	AZIENDA POSITIVA	AZIENDA POSITIVA
215CNXXX	AZIENDA NEGATIVA	AZIENDA POSITIVA	AZIENDA POSITIVA
217CNXXX	AZ. NEGATIVA VACCINATA DELETO	AZIENDA POSITIVA	AZIENDA POSITIVA
244CNXXX	AZIENDA INDENNE	AZIENDA INDENNE	AZIENDA POSITIVA

Il grafico successivo mostra invece le aziende con qualifica positiva risultate negative al test su latte. Su queste aziende si è reso necessario un approfondimento caso per caso.



ElisaNEG – ArvetPOS n=59

Pool testati 477

Campioni di latte testati: 9751

Per quasi la metà di queste (n=29), l'analisi condotta sulle singole marche auricolari che compongono i pool non evidenzia animali positivi in lattazione. Si tratta spesso di singoli capi piemontesi che non vengono munti, oppure di esiti per anticorpi totali in animali vaccinati marker non seguiti dal test gE, o ancora di aziende che non hanno più positivi in stalla ma non hanno la qualifica aggiornata. Di fatto queste 29 aziende rientrano fra quelle attese negative.

Nelle restanti aziende, l'analisi condotta sulle singole marche auricolari indica la seguente distribuzione di capi positivi:

Numero aziende	Numero capi positivi nei pool
19	1
8	2
1	3
1	5

La maggior parte delle aziende mostrate, in tutti i pool testati, avrebbero contenuto al massimo 1 o 2 animali positivi nei pool. Va tuttavia rilevato che l'età dei soggetti considerati positivi al test sierologico individuale non è elevata, riducendo la probabilità che si tratti di vecchie vaccinazioni, che potrebbero non essere rilevate con il test su pool. Difficile anche che si tratti di nuove infezioni, dal momento che, anche in aziende vaccinate, la circolazione virale implica un numero considerevole di sieroconversioni, prontamente rilevate dal test in condizioni di campo. Verosimilmente si tratta (o quantomeno non lo si può escludere) di reazioni false positive al test gE competitivo. Su queste ultime aziende sono tuttora in corso analisi caso per caso.

Alla fine di un anno di lavoro risultano quindi 304 aziende aderenti di cui 33 negative vaccinate, 89 indenni, 6 negative, 29 ufficialmente indenni e 140 positive. Ventitré nuove aziende sono entrate nel piano regionale e, di queste, 5 hanno ottenuto la pre-qualifica di aziende NEGATIVE.

Quarantaquattro aziende hanno ottenuto il passaggio di qualifica da AZIENDA POSITIVA ad AZIENDA NEGATIVA. Le aziende negative sono passate da 122 a 157, mentre le positive, o senza qualifica sono diminuite da 181 a 140.

Nell'ultima fase del progetto verranno nuovamente estratti ed analizzati tutti i dati individuali ottenuti dalla diagnostica ufficiale aggiornata a giugno 2016 (prelievo individuale di sangue ed esecuzione di test ufficiali) e paragonati con i risultati ottenuti da ogni pool. Questo consentirà di aumentare notevolmente la copertura delle marche auricolari che compongono i pool di latte con stato sanitario aggiornato (cd "coverage"). Questa analisi consentirà di determinare per ogni pool il numero di animali positivi al test sierologico, fornendo un dato reale ed attendibile di sensibilità diagnostica in condizioni di campo.

Disseminazione dei risultati

I risultati della presente ricerca saranno comunicati a 2 congressi (Società Italiana di Scienze Veterinarie, Palermo 16 giugno 2016 e World BuiatricCongress, Dublino 2-7 Luglio 2016) ed illustrati in un seminario informativo, nell'ambito dell'aggiornamento professionale, ai veterinari piemontesi ASL e liberi professionisti, che si terrà a Grugliasco il 23 giugno 2016.