

Protocolli di campo supportati dalle nuove tecnologie: risultati di un trimestre di sperimentazione

Alfonso Zecconi

Università degli Studi di Milano - DIMEVET

Quando fare sistema paga! (personaggi ed interpreti)



L'allevatore



Il servizio tecnico



Le nuove tecnologie diagnostiche



Il servizio veterinario



Il ricercatore

Perché il sistema non funziona

- Ciascuna di queste figure **ha obiettivi propri, razionali e giustificabili**
- Tali obiettivi **apparentemente sembrano essere diversi**
- Il confronto spesso **non porta ad obiettivi condivisibili ed azioni condivise**
- **Ne conseguono:**
 - Ritardi nel raggiungimento dei propri obiettivi
 - Ridondanze e sovrapposizioni
 - Sprechi di risorse umane e materiali
 - Inefficienza e scarsa competitività sul mercato
 - Indebolimento significativo del proprio ruolo sul mercato



Condividere gli obiettivi



Servizio veterinario

- Ridurre uso antibiotici



Nuove tecnologie

- Usare metodi innovativi più accurati



Ricercatore

- Applicazione nuove tecnologie



Servizio tecnico

- Fornire supporto aggiornato



Allevatore

- Produrre in modo sostenibile



Condividere le azioni



Servizio veterinario

Avere criteri condivisi e coerenti per definire animale «ammalato» per salvaguardare le produzioni e la salute pubblica

Nuove tecnologie

Applicare in campo in modo efficiente e corretto le nuove tecnologie.
Creare informazione non numeri

Ricercatore

Mettere a punto strategie che portino un concreto miglioramento della filiera latte

Servizio tecnico

Trasferire le informazioni e le strategie all'allevatore in modo semplice e chiaro

Allevatore

Produrre sempre meglio (e sempre di più) nel rispetto del benessere e della salubrità dei prodotti

Quando fare sistema paga – in pratica

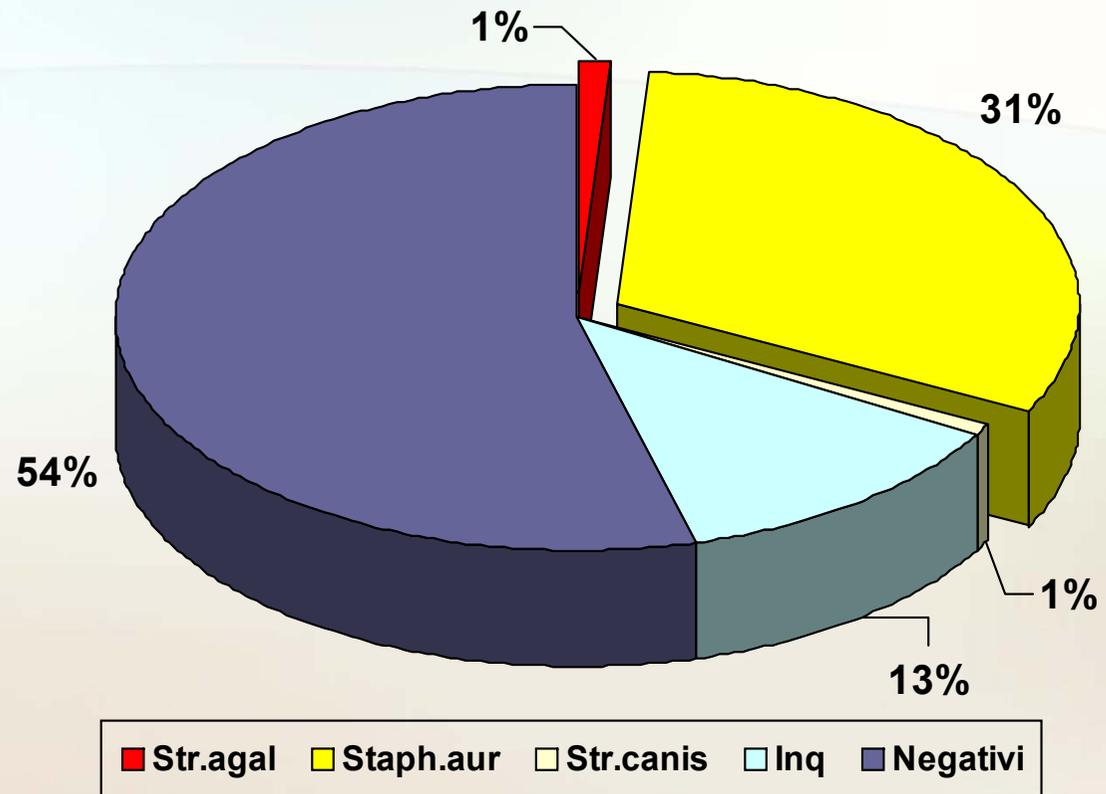
1. REAL TIME PCR applicazione in campo
2. Il conteggio cellulare differenziale
3. La messa in asciutta selettiva



Real time PCR: applicazione in campo

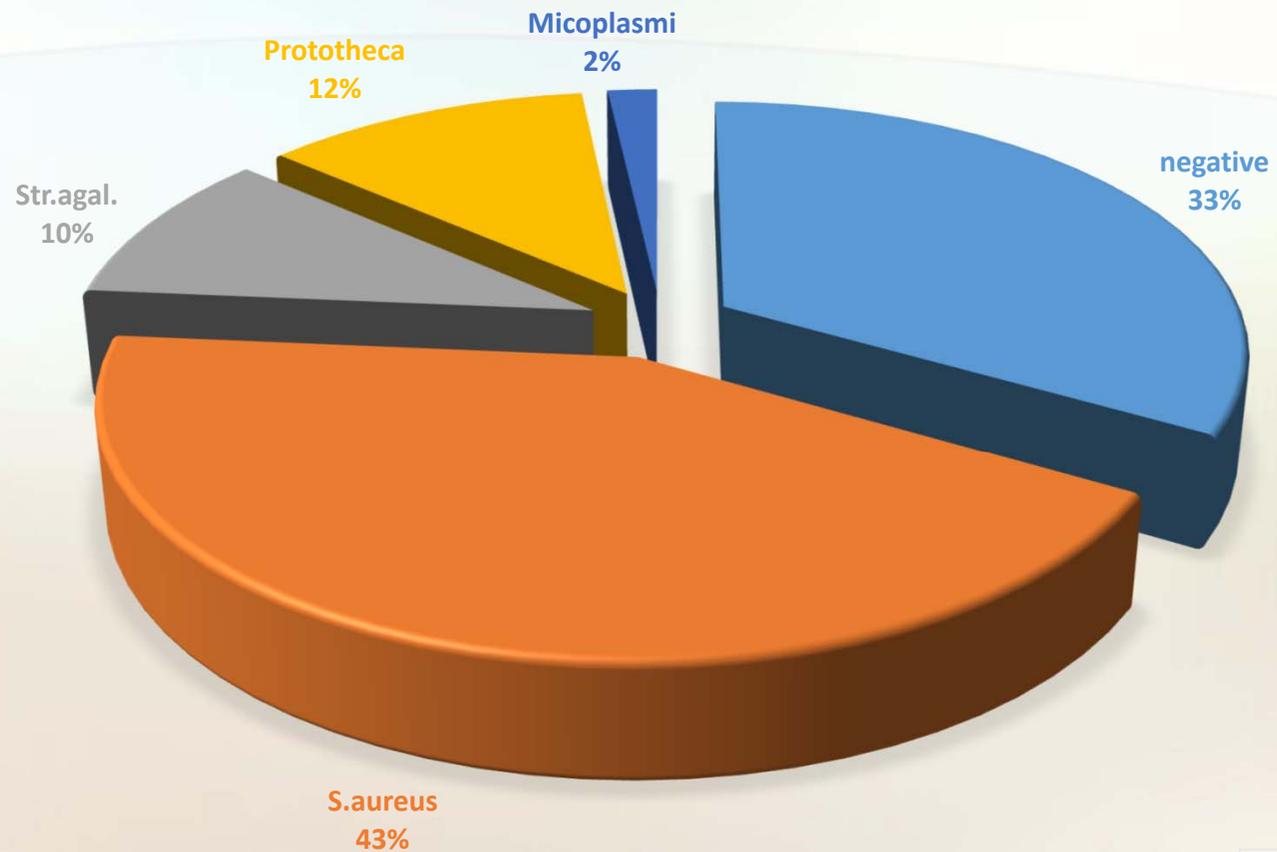
L'evoluzione delle tecniche - 2002

2400 allevamenti
Metodo microbiologico
convenzionale



L'evoluzione delle tecniche - 2018

582 allevamenti
Metodo RT PCR
3 campioni LM



Ignavia, scarsa competenza e *S.aureus*

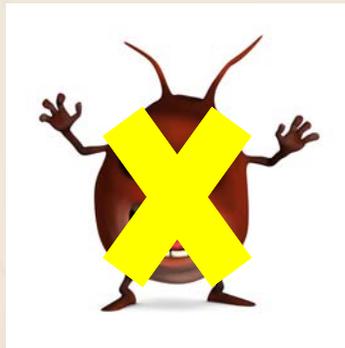
- **Frase sentita con maggiore frequenza: “con *S.aureus* non si può fare nulla bisogna convivere”.**

Il risultato della *convivenza*:

- → aumento del 40% delle infezioni in 16 anni
- → perdite 2002 stimate in 2 milioni €
- → perdite 2018:
 - Perdita stimata per minore produzione su 251 allevamenti **>9 milioni €/anno**
 - Perdita per allevamento medio **36.500 €/anno**
 - Perdita per **bovina allevata 276€/capo**

Ignavia, scarsa competenza e *S.aureus*

- ***S.aureus* non è risolvibile o non si ha voglia/capacità di risolvere il problema?**
- Es. **costo analisi** per piano di eradicazione *S.aureus* per stalla media **6000€/anno**
- **Gli strumenti ci sono, le informazioni anche!**
- Bisogna voler risolvere il problema, rivolgersi a persone competenti e usare strumenti adeguati!



Str.agalactiae il microrganismo highlander



- **Piano eradicazione in Lombardia cominciato negli anni '60, dichiarato concluso da IZLER con successo a fine anni '90.**
- Risultati RL 2013 (5800 allevamenti) → 10% positivi (punte 22%)
- Risultati RTPCR (582 allevamenti) → 10% positivi
- Media produzione -2,6 litri/giorno → 57.500€/anno
- Media cellule 446.000 vs. 324.000 allevamenti sani

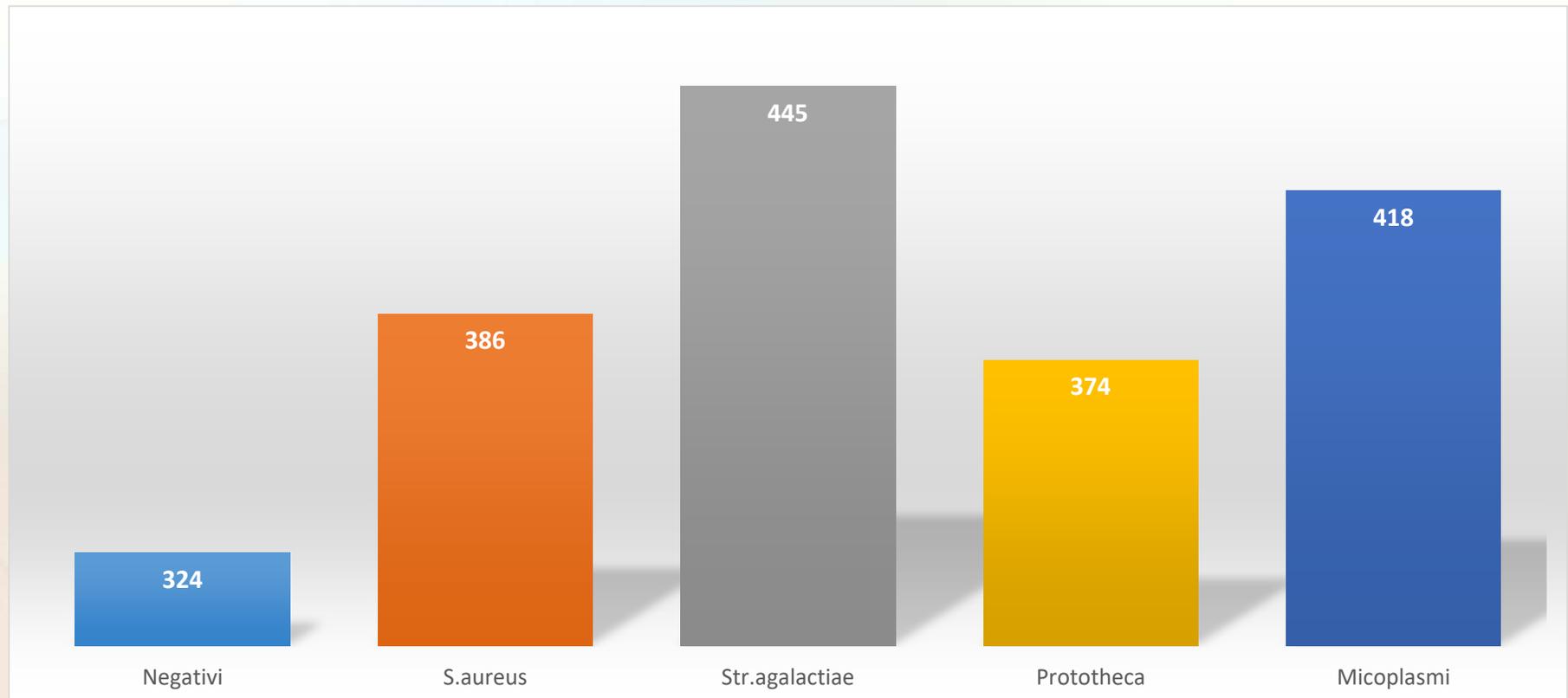
- **Gli strumenti ci sono, le informazioni anche!**
- Bisogna voler risolvere il problema, rivolgersi a persone competenti e usare strumenti adeguati!

Micoplasmi - una nuova sfida

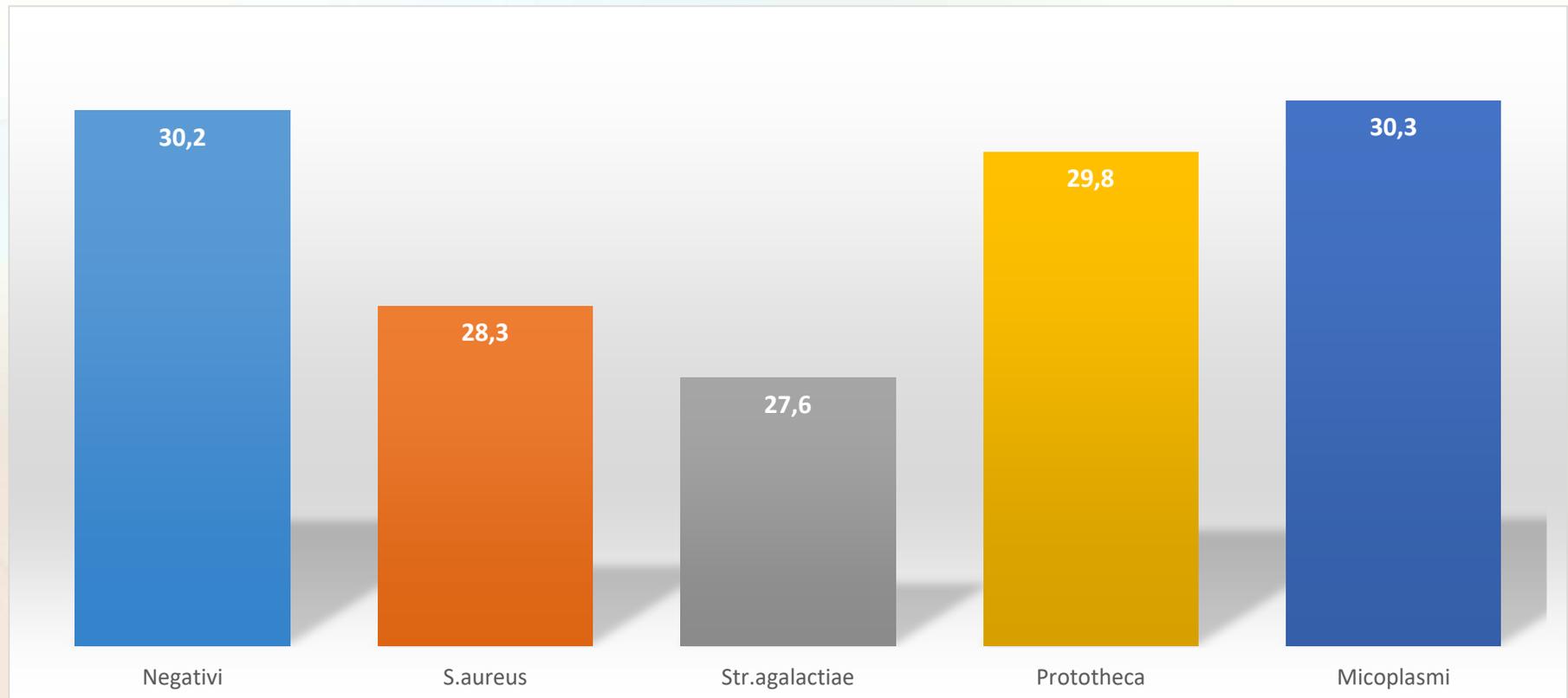
- **Difficile diagnosi** in assenza di metodi molecolari
- **Difficile controllo** in assenza di diagnosi accurata
- Probabilmente **sottostimato** nel nostro Paese
- Informazioni epidemiologiche al momento ancora frammentarie per i nostri allevamenti.

- *Il lavoro fatto fino ad ora però ci da alcune importanti indizi su come procedere.*

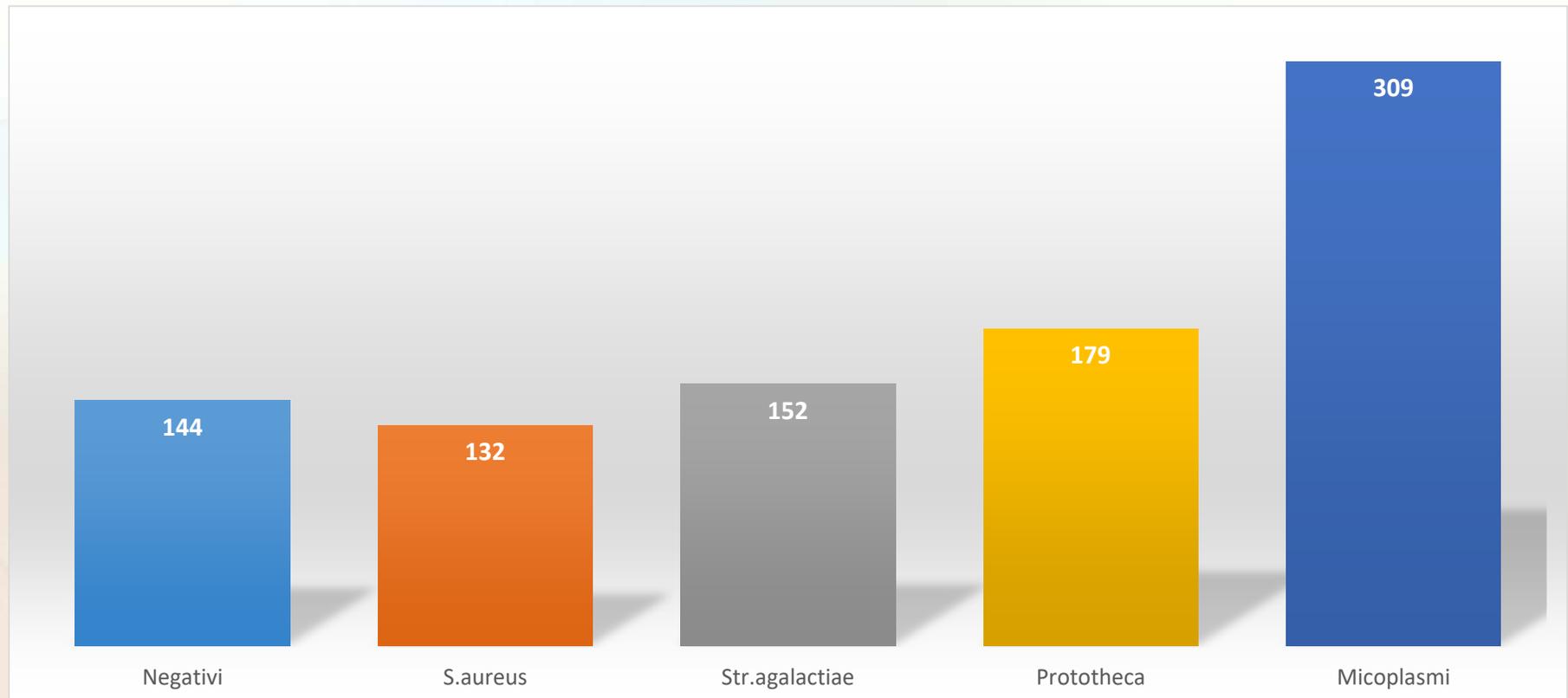
I patogeni non hanno tutti lo stesso effetto – cellule somatiche



I patogeni non hanno tutti lo stesso effetto – produzione media (l/g)



I patogeni non hanno tutti lo stesso effetto – dimensioni (vacche)



Take home message 1

- RT-PCR è una tecnica affidabile e pratica che permette di identificare contemporaneamente più agenti patogeni
- Permette di utilizzare campioni con conservante
- **Sistema ideale per monitoraggio situazione allevamenti**
- Le analisi mostrano che
 - *S.aureus* è ancora un problema rilevante nelle nostre stalle
 - *Str.agalactiae* è presente con prevalenze non trascurabili
 - L'aumento delle dimensioni degli allevamenti potrebbe comportare un problema per Micoplasmi

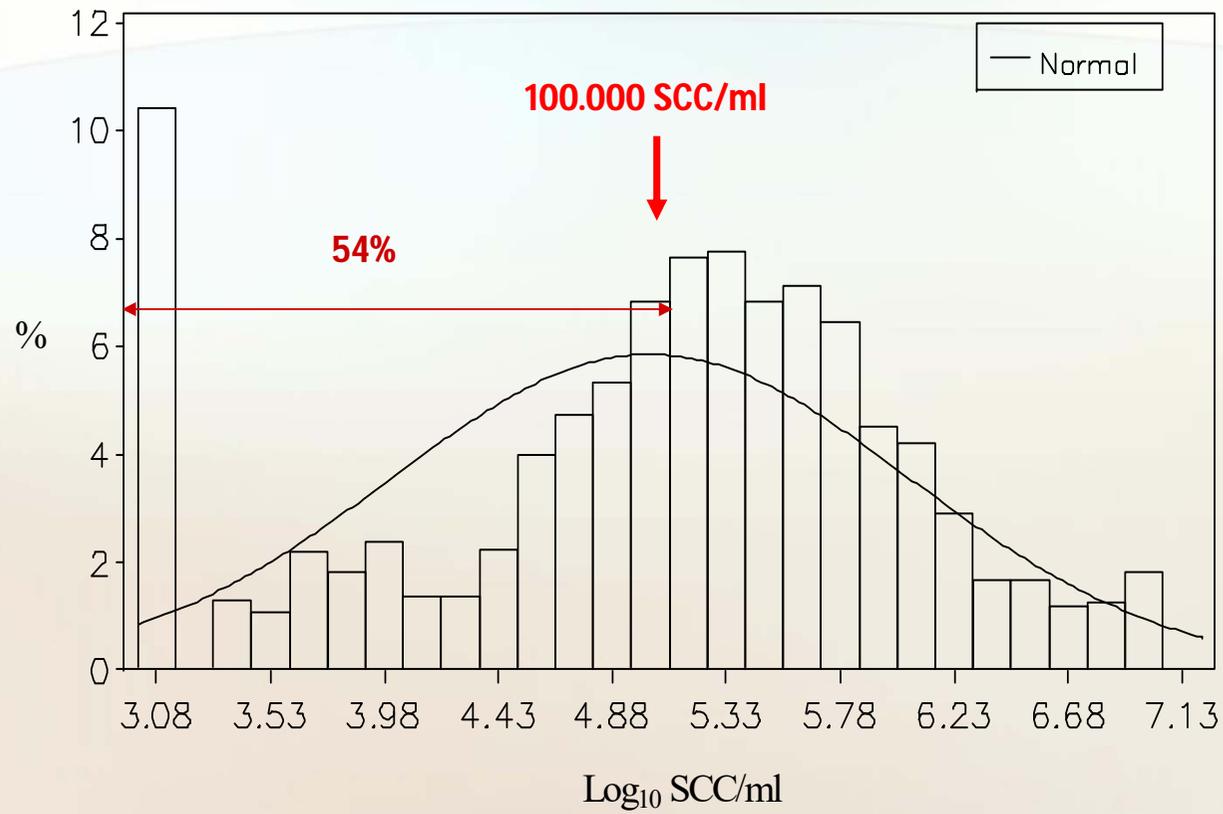
Invito alla Regione Lombardia (agricoltura e sanità)

- Investire in innovazione è utile, ma questa si applica efficacemente solo se c'è un **tessuto produttivo sano!**
- Necessario investire anche in **azioni mirate** a risolvere problemi troppo a lungo trascurati o volutamente ignorati.
 - Comunicazione del problema
 - Formazione di tecnici preparati a risolverlo
 - Indirizzo su come operare in modo efficiente
 - Gestione sanitaria allevamento e uso corretto del farmaco anche in presenza di batteri contagiosi

Conteggio differenziale latte

Dalla teoria alla pratica

Presupposti biologici



Presupposti biologici

Dedicated Analytical Solutions

DSCC PATTERNS – HEALTHY GLANDS

Overview of differentiated somatic cell counts (DSCC) in healthy udder quarters

Reference	DCC in %				Method	
	lymphocytes	macrophages	PMN	epithelial cells	M ¹	FC ²
Lee et al., 1980	19	78	6	4	X	
Paape et al., 1981	28	60	10	2	X	
Miller et al., 1991	24	31	26	19	X	
Leitner et al., 2000	13	13	29	45		X
Rivas et al., 2001	72	10	18	-	X	X
Boutet et al., 2003	18	36	34	12	X	
Dosogne et al., 2003	18	10	30	-	X	X
Schröder and Hamann, 2005	46	17	37	-	X	X
Merle et al., 2007	27	50	23	-	X	
Koess and Hamann, 2008	26	43	31	-	X	
Schwarz et al., 2011a	75	16	8	1	X	
Schwarz et al., 2011b	70	21	9	-		X
Pilla et al., 2012	35	25	40	-	X	

¹⁴

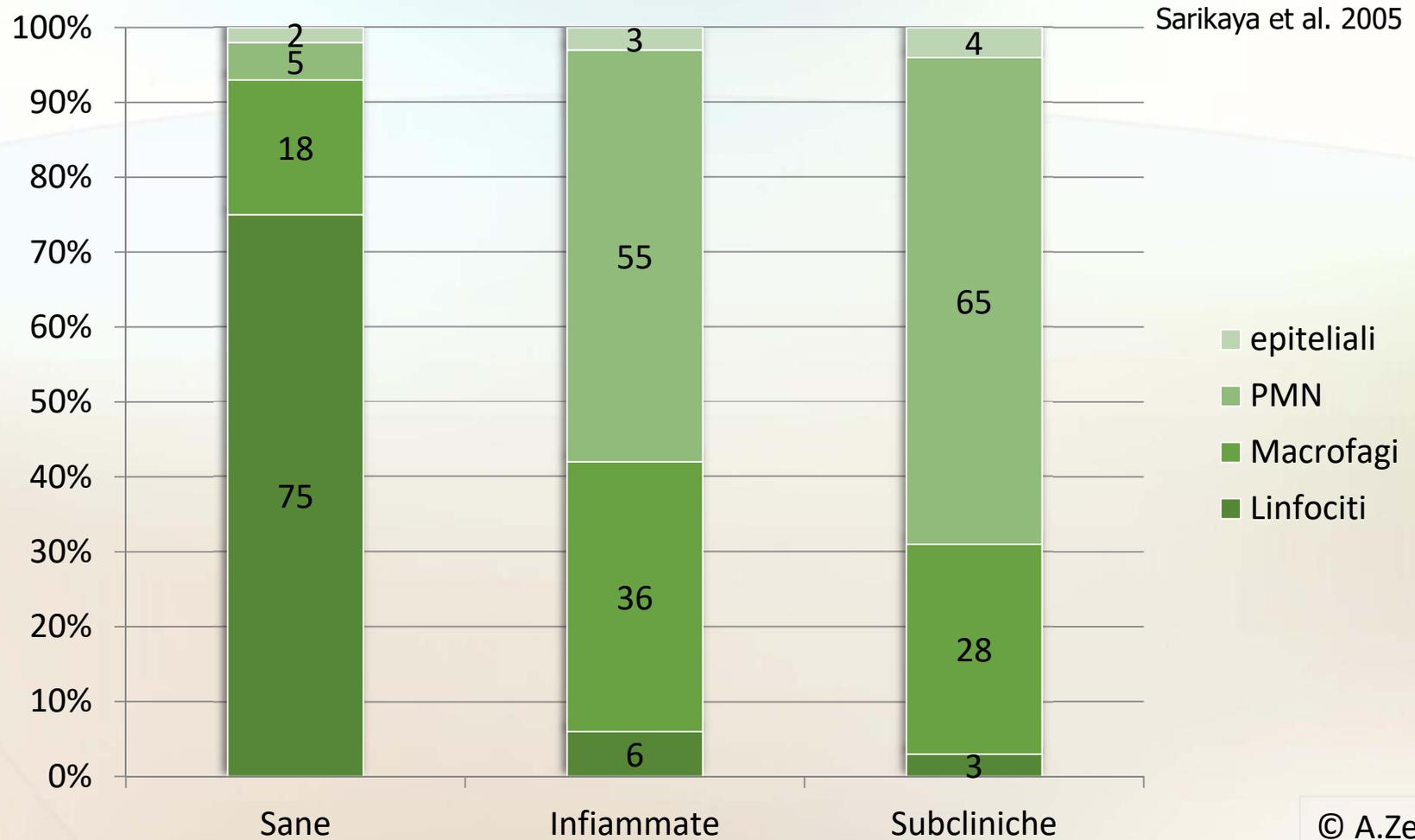
¹microscope; ²flow cytometry, antibody staining

FOSS

Schwarz, 2014

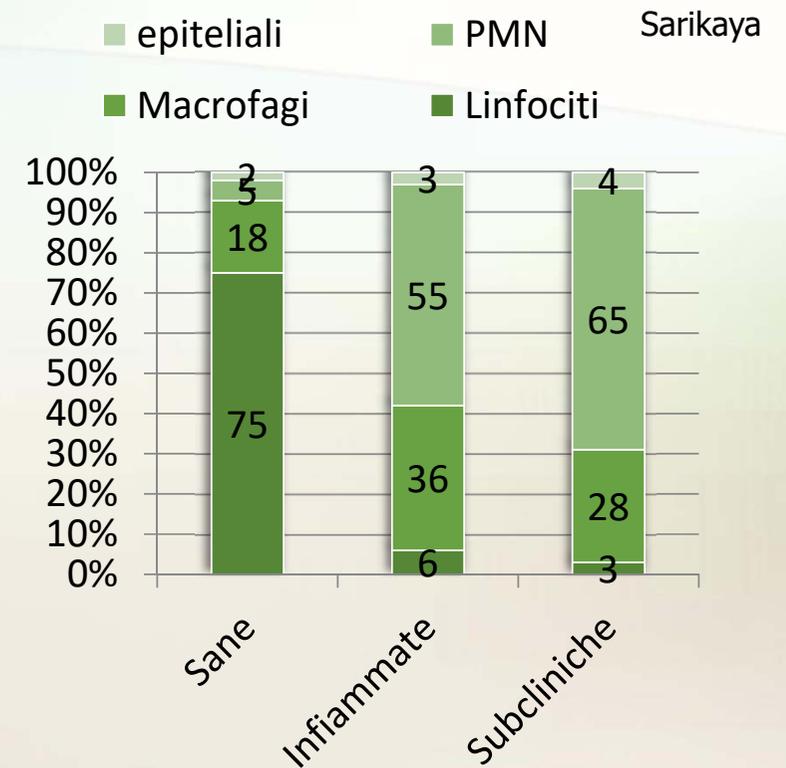
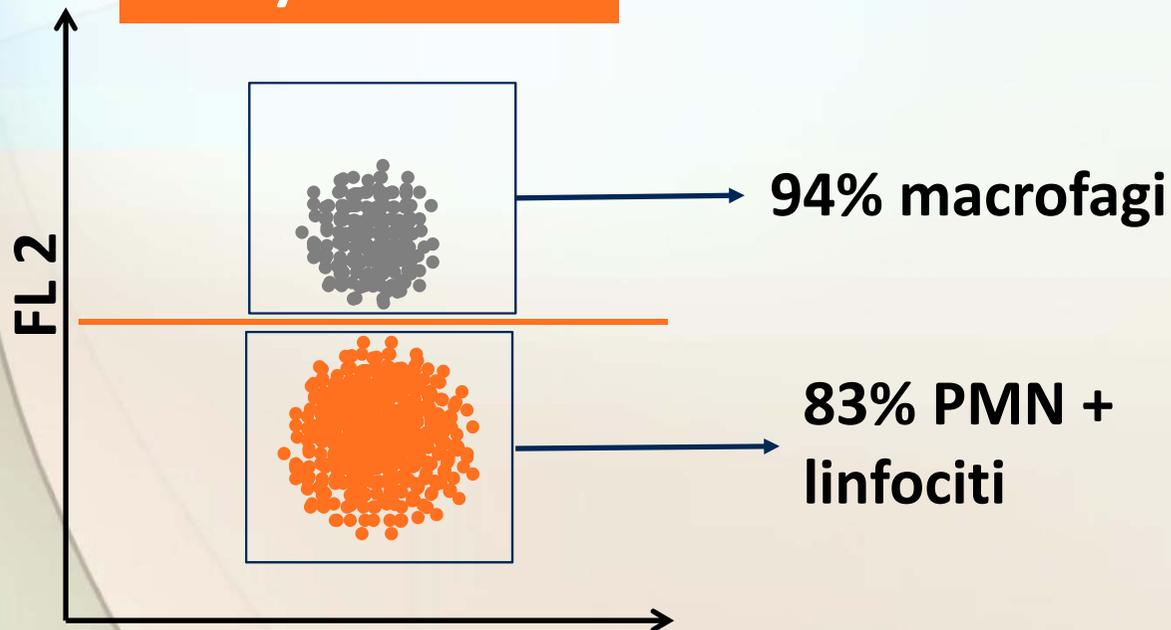
© A.Zecconi 2018

Presupposti biologici



Abbiamo un problema!

Analysis of DSCC



Valutazione epidemiologica

- I parametri di un test diagnostico
 - **Sensibilità:** proporzione di soggetti «ammalati» ($>200.000/\text{ml}$) che sono positivi al test ($\text{DSCC} > \text{soglia definita}$)
 - **Specificità:** proporzione di soggetti «negativi» ($\leq 200.000/\text{ml}$) che sono negativi al test ($\text{DSCC} \leq \text{soglia definita}$)
- Parametri «tecnici» che permettono di valutare le performances complessive di un test diagnostico **ma non dicono nulla sulla probabilità che un soggetto positivo sia realmente ammalato o sano se negativo**



Valutazione epidemiologica

- I parametri di un test diagnostico
 - **Valore predittivo positivo VPP:** probabilità che un soggetto positivo al test ($DSCC > \text{soglia definita}$) sia ammalato ($SCC > 200.000/\text{ml}$)
 - **Valore predittivo negativo VPN:** probabilità che un soggetto negativo al test ($DSCC \leq \text{soglia definita}$) sia sano ($SCC \leq 200.000/\text{ml}$)
- Questi valori ci danno quindi la probabilità che un soggetto sia sano o ammalato e **quindi ci mettono in condizione di prendere decisioni su basi oggettive**



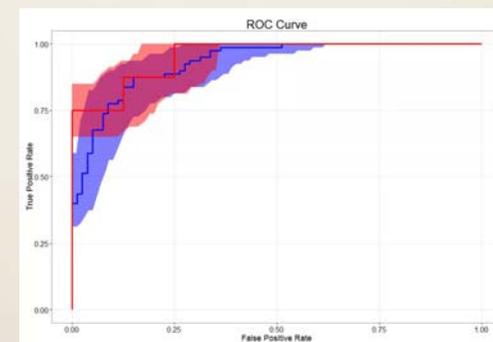
Il problema principale

**Quale soglia
dobbiamo
mettere per
DSCC?**

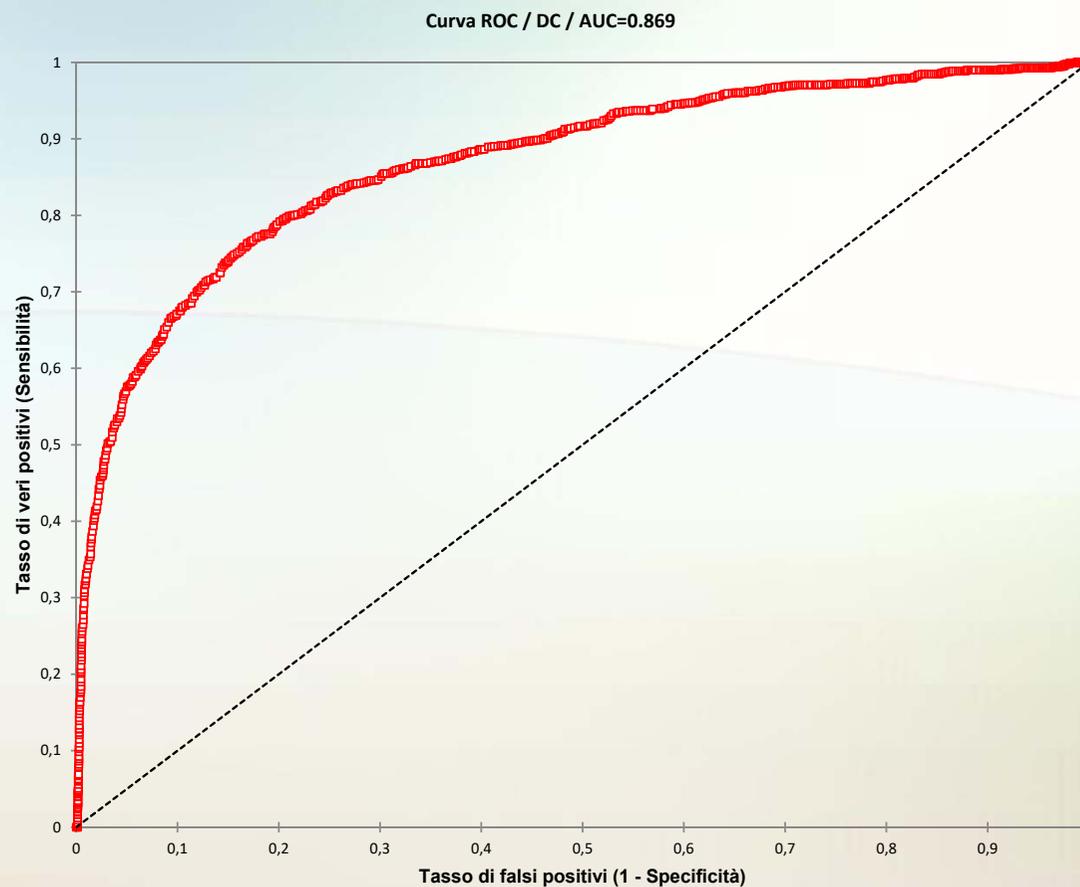


Cosa abbiamo fatto

- Abbiamo raccolto ed analizzato i CF di 4 allevamenti a distanza di 7-10 giorni.
- Complessivamente 4802 bovine
- Definito valore soglia per SCC a 200.000/ml → mastite subclinica
- Verificato relazione con DSCC mediante curva ROC e calcolo valore soglia per DSCC

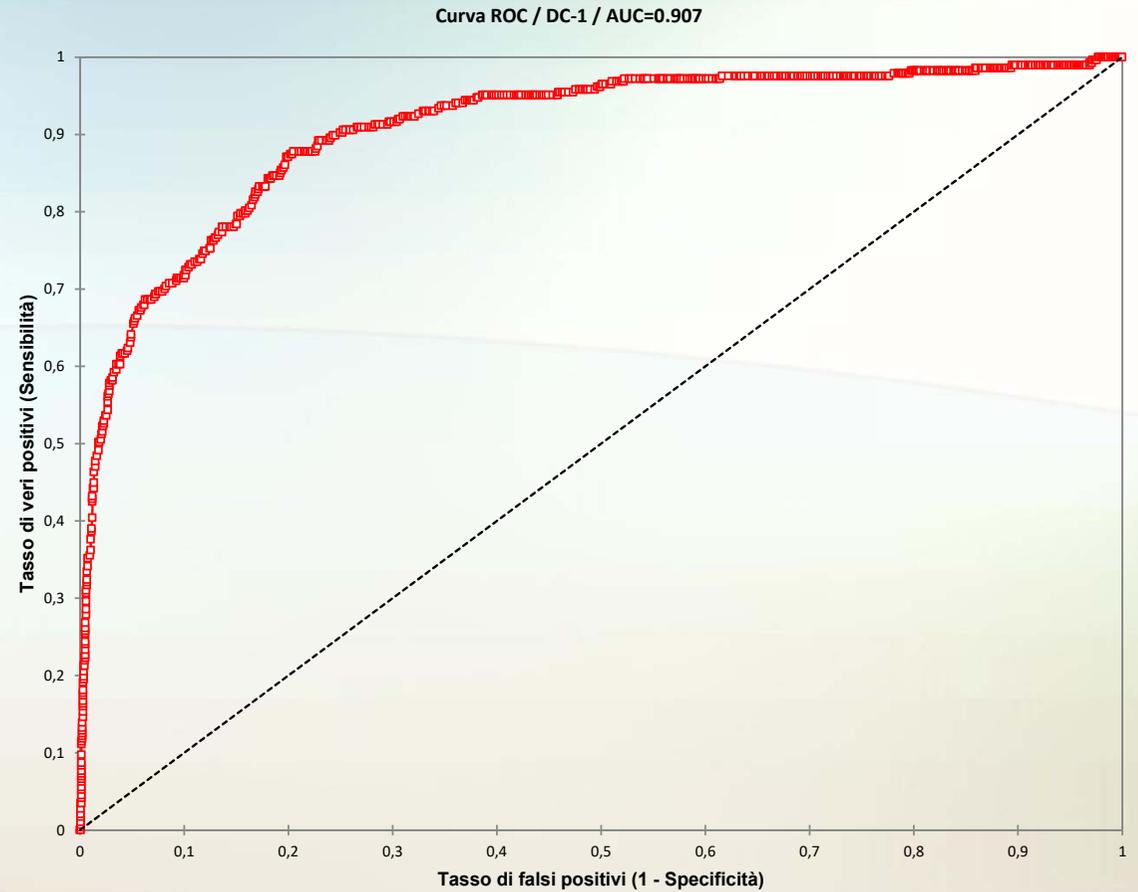


Tutti i
campioni



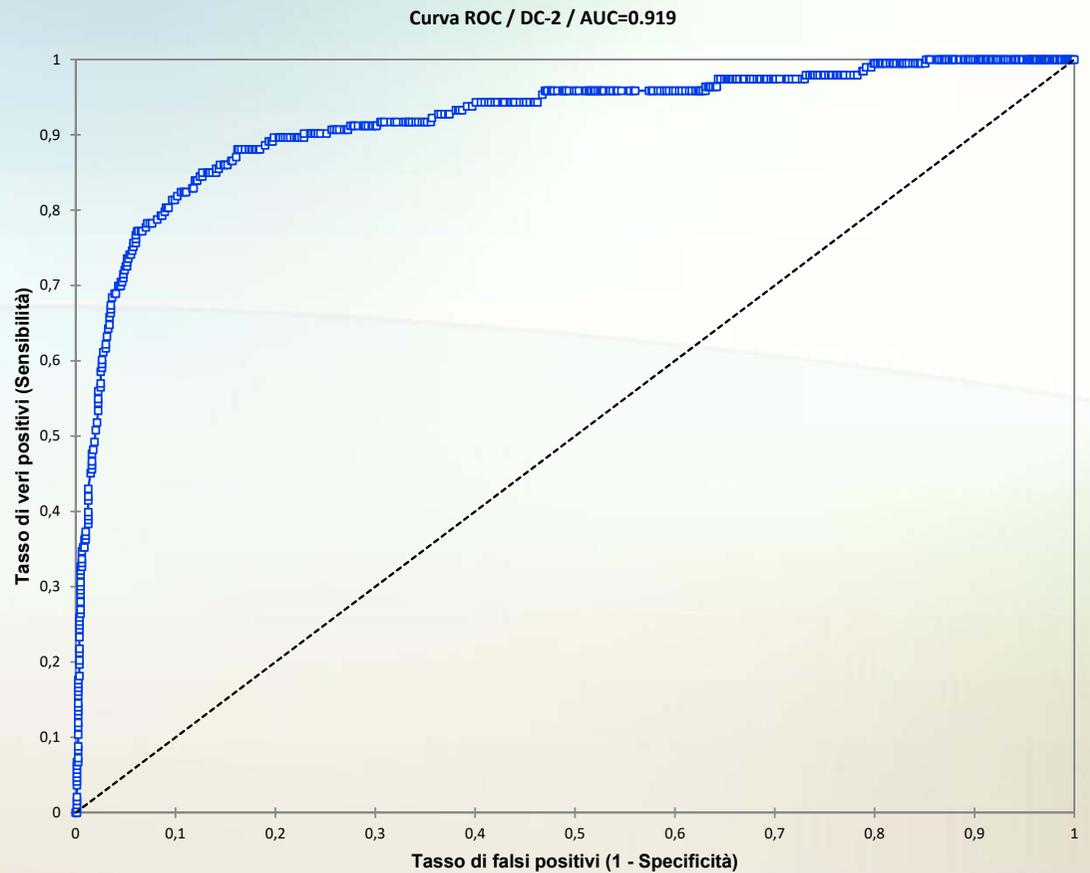
Soglia	Sensibilità	Specificità	VPP	VPN	LR+	LR-
68.500	0.763	0.831	0.567	0.924	4.518	0.285

DSCC primi 100 gg



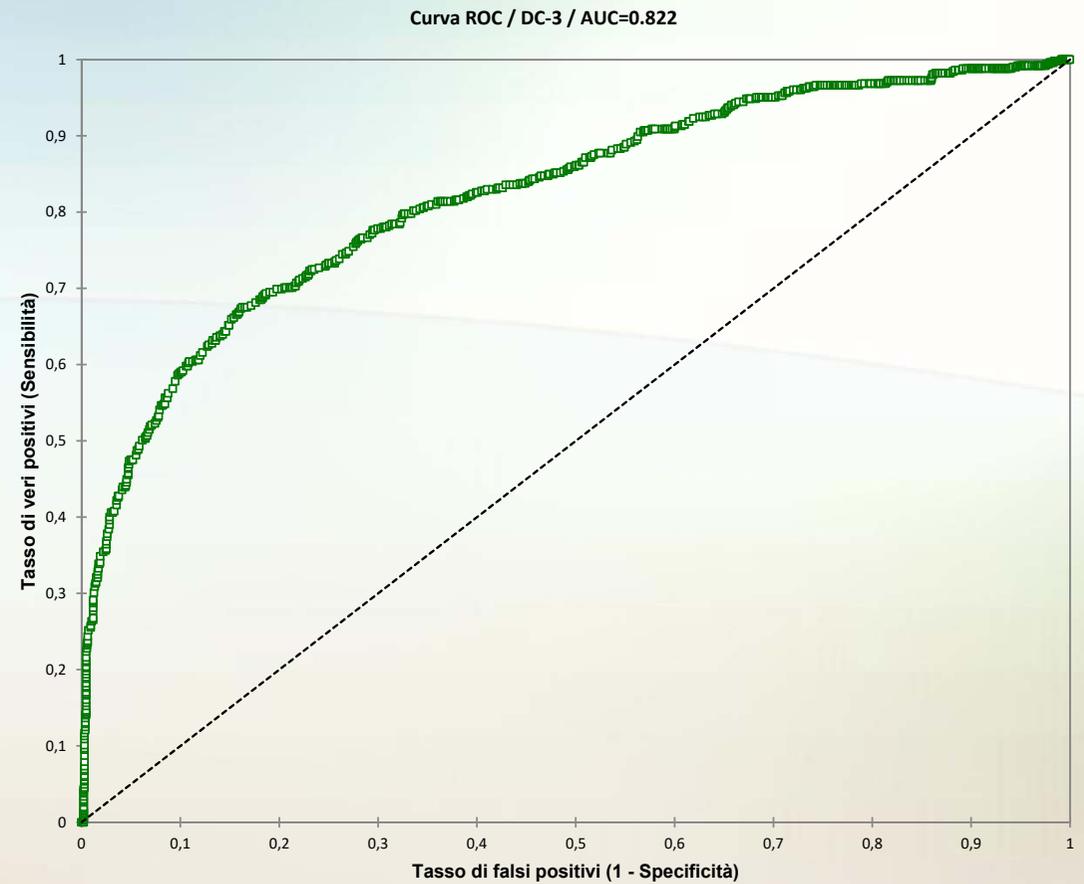
Soglia	Sensibilità	Specificità	VPP	VPN	LR+	LR-
66.300	0.878	0.795	0.478	0.968	4.285	0.153

Dscc 100-200 giorni



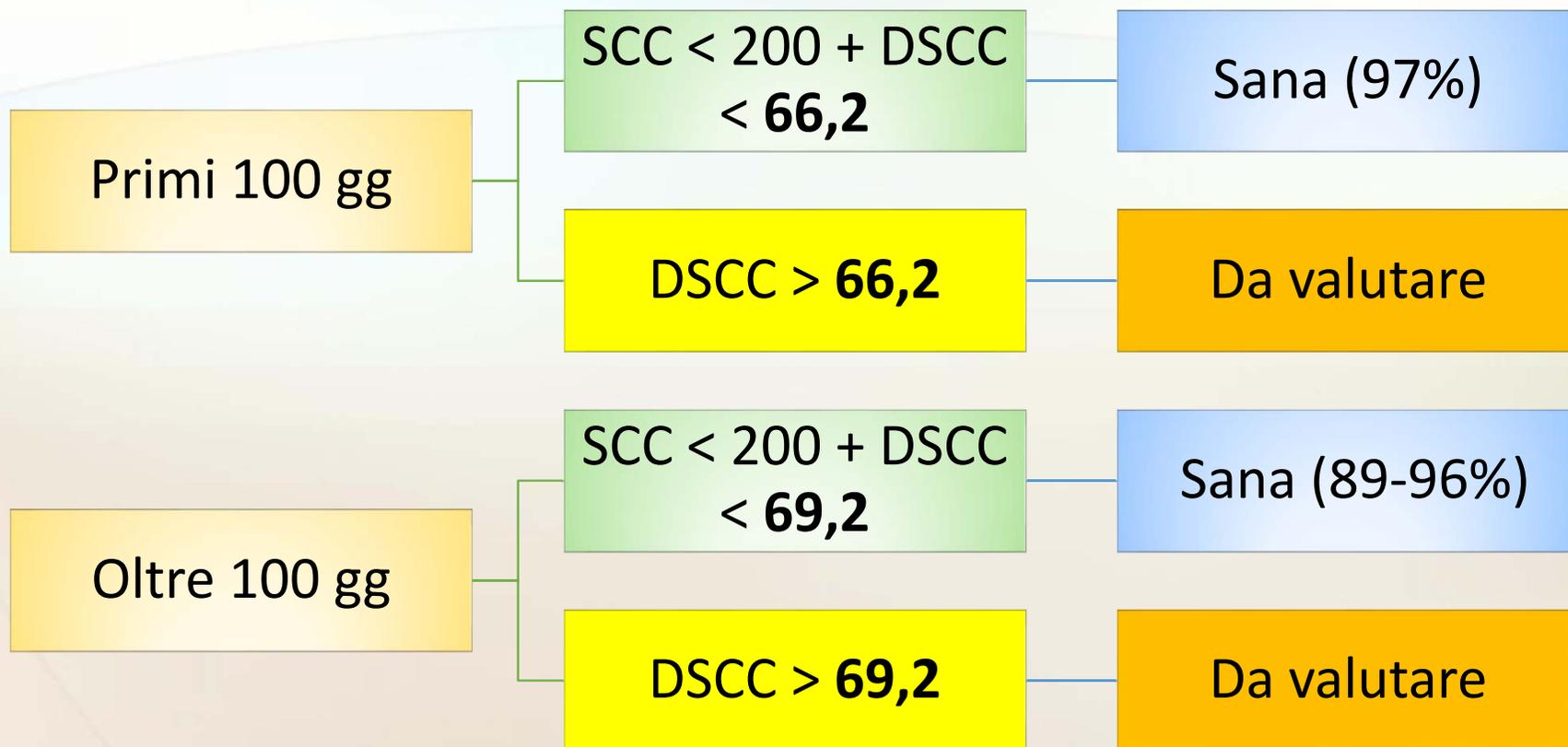
DC-2	Sensibilità	Specificità	VPP	VPN	LR+	LR-
69.200	0.850	0.873	0.619	0.960	6.697	0.172

Dscc
>200 giorni



DC-3	Sensibilità	Specificità	VPP	VPN	LR+	LR-
69.300	0.675	0.837	0.623	0.866	4.147	0.388

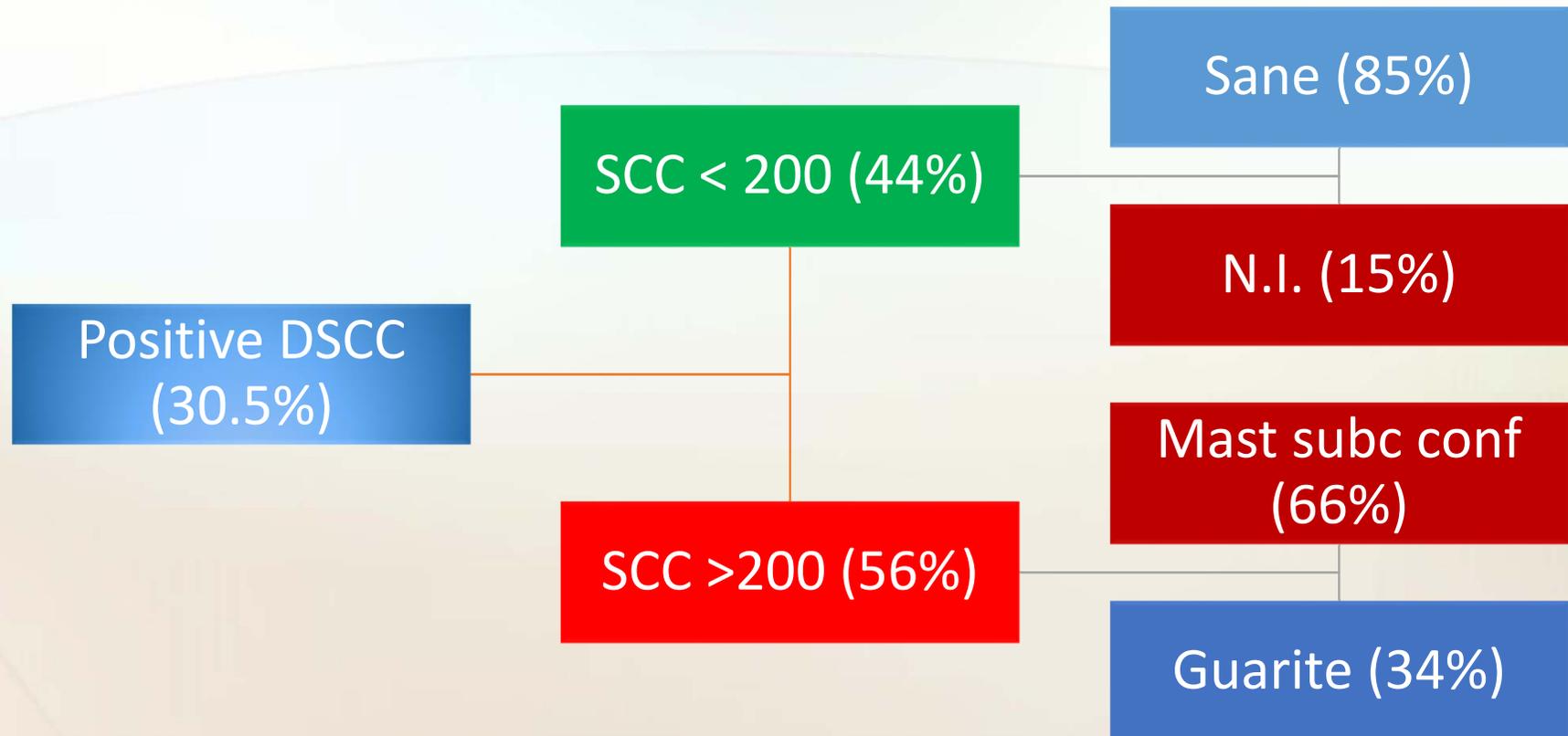
Decisioni, decisioni, decisioni...



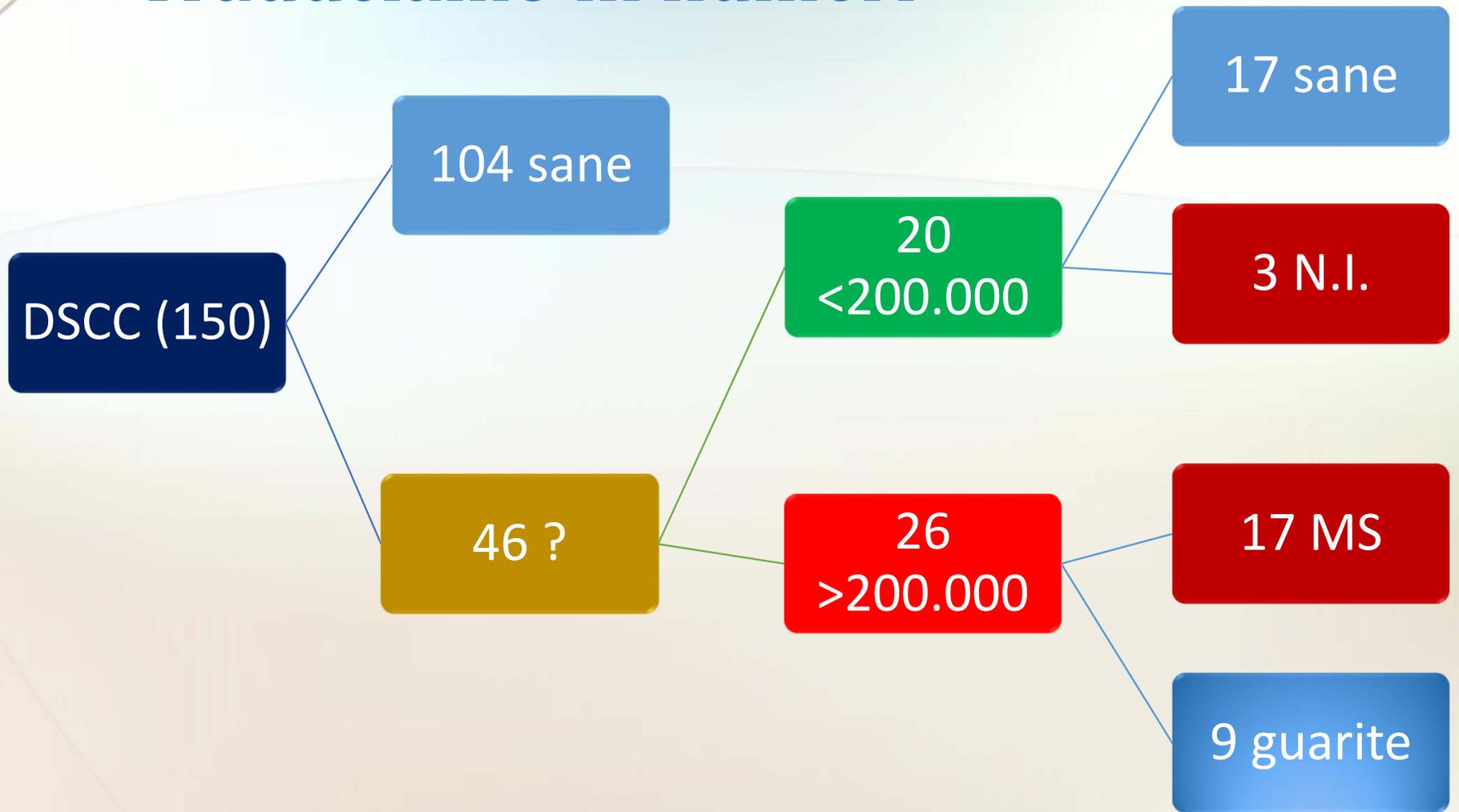
Passo successivo

- Campioni controlli funzionali a 7-10 gg di distanza
- **Possibilità di verificare stato sanitario animale**
 - **Sano** → 2 controlli consecutivi < 200.000 cellule/ml
 - **Mastite subclinica** → 2 controlli consecutivi > 200.000 cellule/ml
 - **Nuova MS** → primo < 200.000, secondo > 200.000 cellule/ml
 - **Guarito** → primo > 200.000, secondo < 200.000 cellule/ml
- Verifica del valore DSCC > soglia nell'individuare animali problema

DSCC > soglia



Traduciamo in numeri



La storia continua...

- Valutazione DSCC su quarto in abbinamento con analisi batteriologica (prova asciutta selettiva)



Take home message 2

- Conteggio cellulare differenziale → tecnica nuova che **necessita di una messa a punto** (definizione soglie e significato)
- **Valutazione necessariamente complessa** alla luce del problema sottostante
- Allo **stato attuale** delle conoscenze:
 - **Soglie diverse** in funzione delle caratteristiche di animali/allevamenti
 - **Utile identificazione soggetti sani**
 - **Permette di focalizzare l'attenzione** su un numero ridotto di soggetti
- Indagini in corso permetteranno di definire ancora meglio il suo utilizzo nella pratica

Asciutta selettiva: è possibile?

Il quadro di riferimento

Chi mettere in asciutta

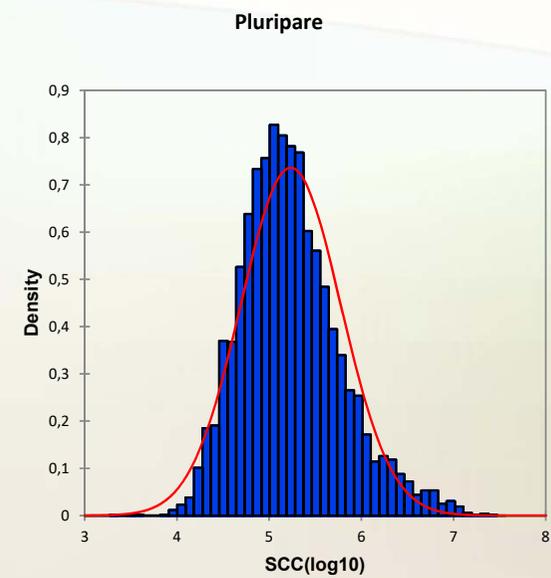
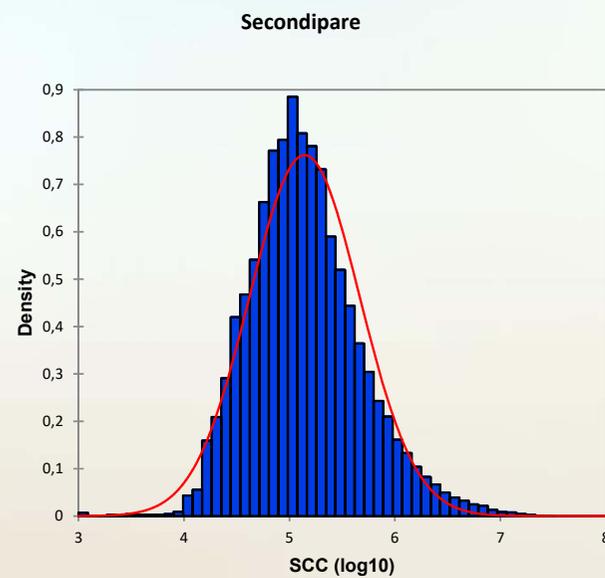
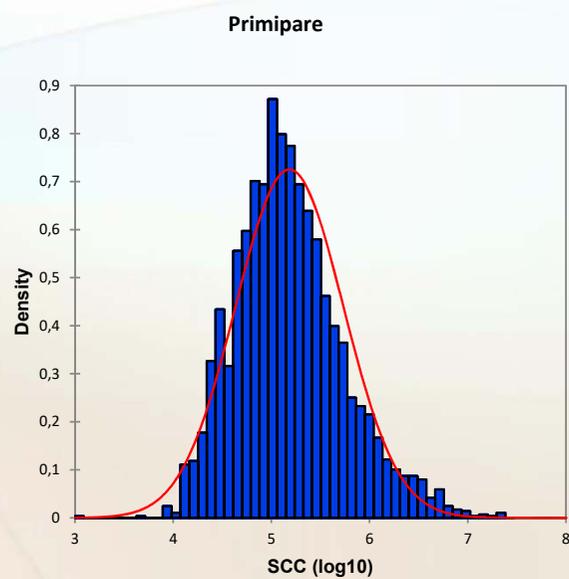
- Un approccio basato sulla terapia in asciutta selettiva **richiede di definire in modo univoco quando un animale sia ammalato** (da trattare) o meno
- Alla messa in asciutta **la diagnostica** può essere
 - Microbiologica
 - Cellulare
- Per praticità e costi la scelta di definire la sanità della mammella in base al **contenuto cellulare del latte è la soluzione migliore** (non la più precisa).
- Tuttavia, per agire in questo senso è fondamentale eseguire preventivamente una **valutazione epidemiologica** per definire i criteri secondo cui selezionare le bovine da destinare alla terapia in asciutta.

Il quadro di riferimento

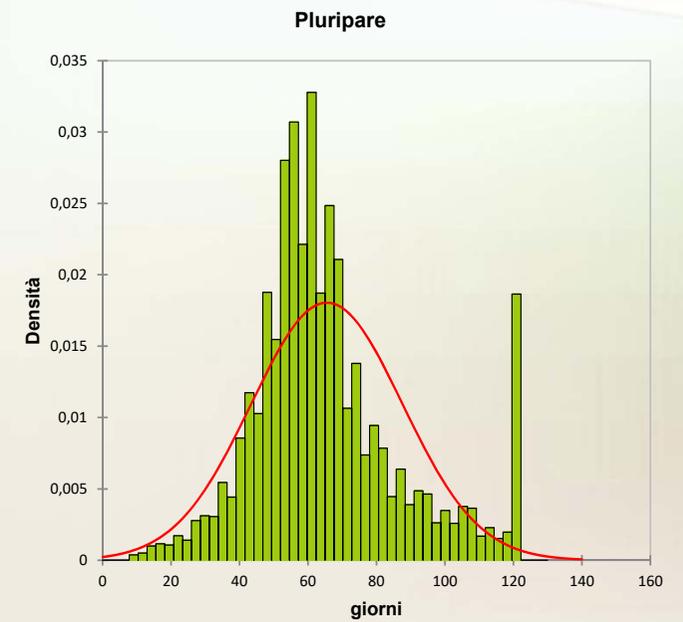
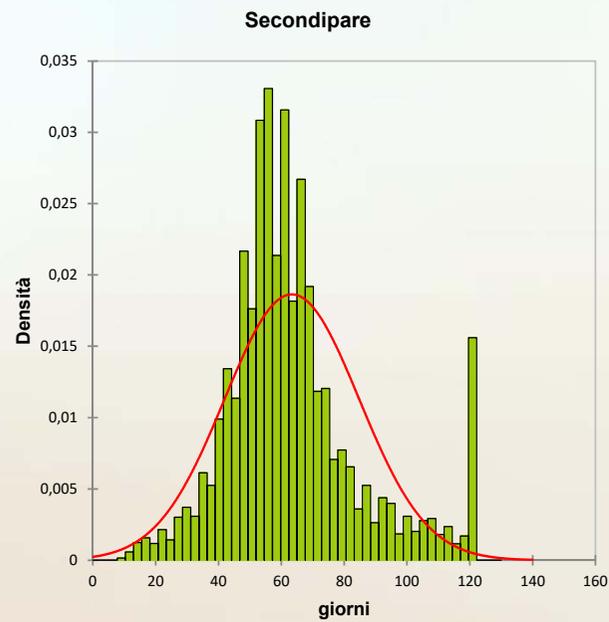
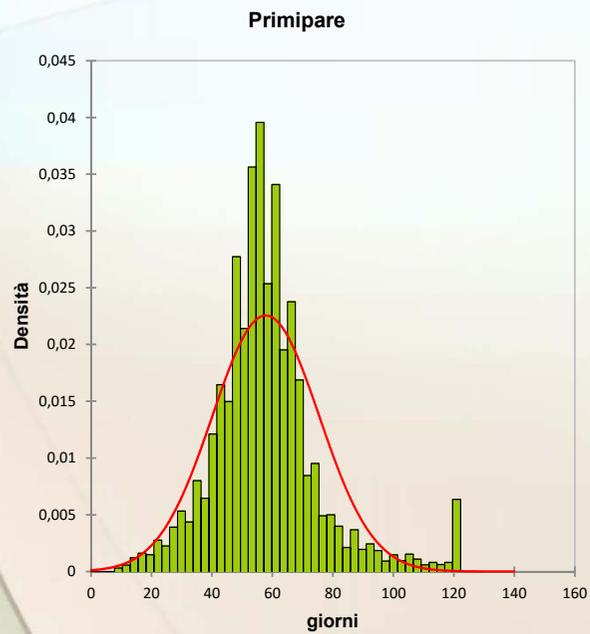


720 allevamenti di bovine da latte lombardi delle provincie di Como, Lecco, Milano, Monza, Pavia, Sondrio per un totale di 45.682 bovine.

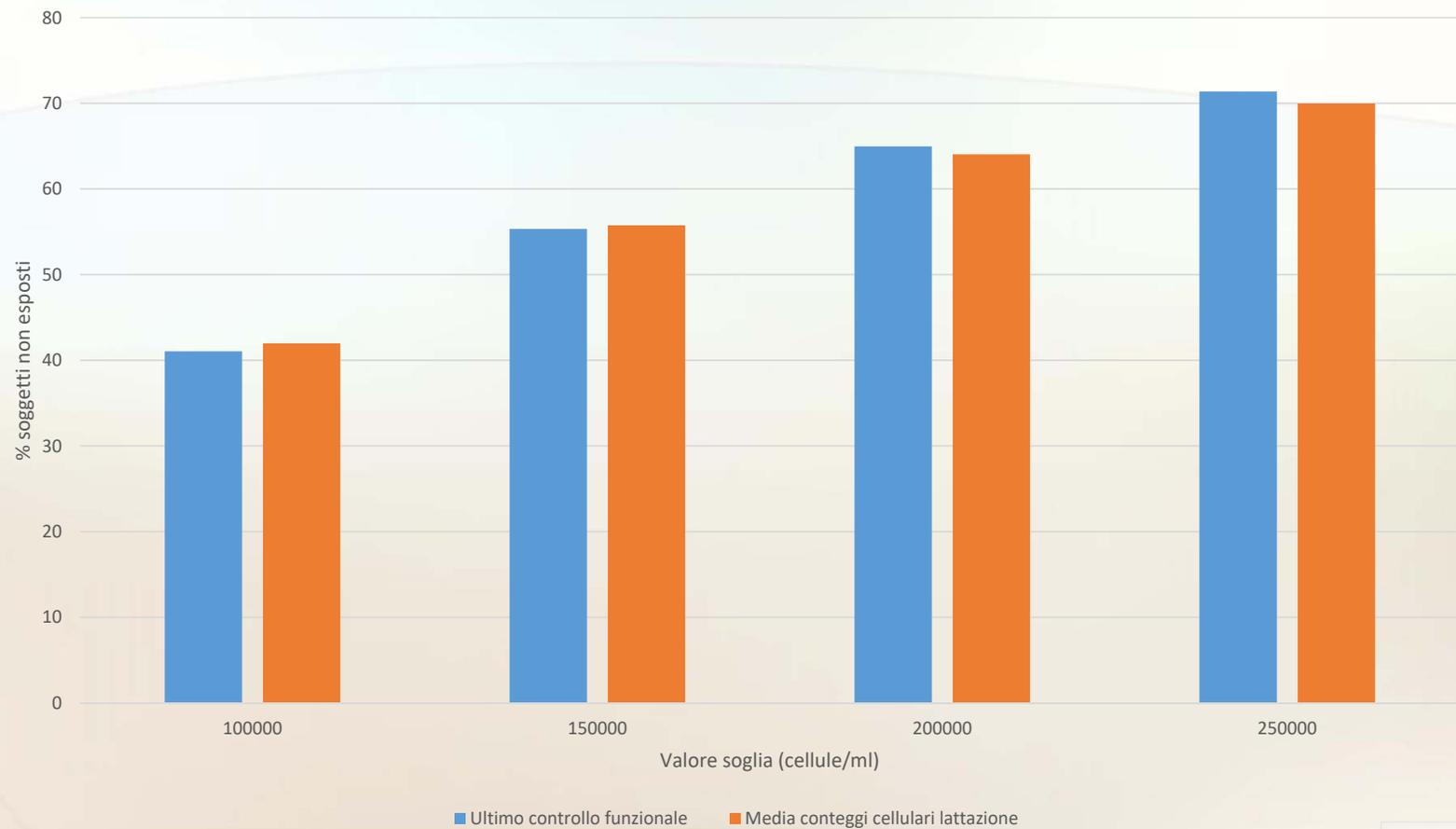
La situazione attuale - SCC



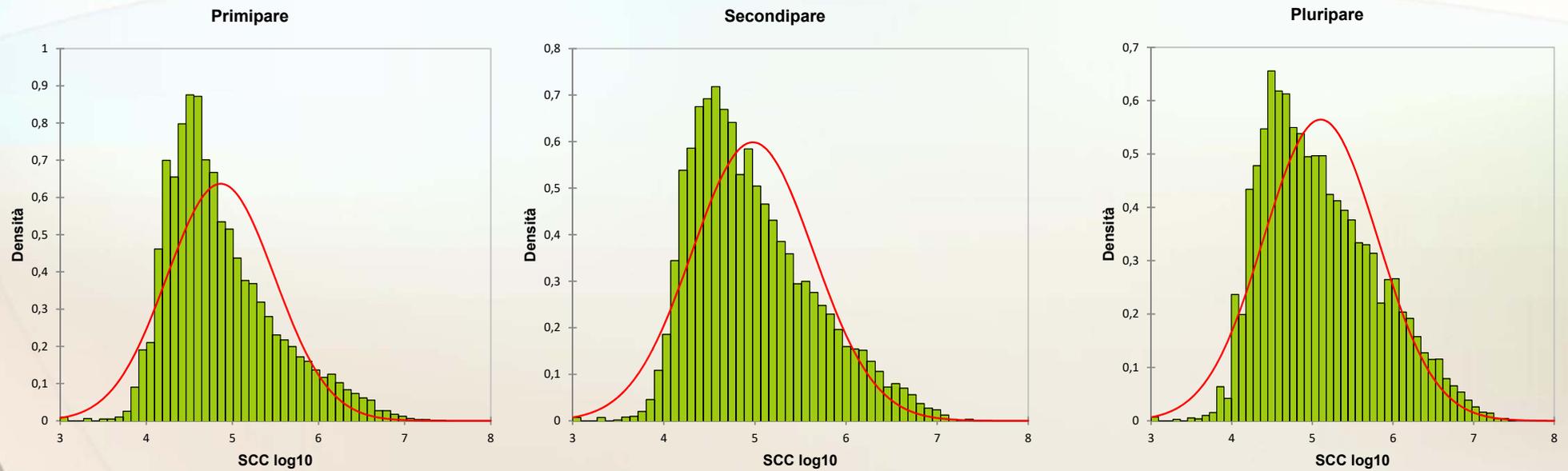
La situazione attuale – durata asciutta



Riduzione potenziale



La situazione attuale – SCC dopo parto



Conseguenze – produzione latte

Fattore	Classi	Media \pm err.std. della produzione al secondo controllo funzionale			
		Soglia 100	Soglia 150	Soglia 200	Soglia 250
Lattazione	1	38,16 \pm 0,09 ^a	38,03 \pm 0,09 ^a	37,90 \pm 0,09 ^a	37,38 \pm 0,09 ^a
	2	39,72 \pm 0,10 ^b	39,60 \pm 0,10 ^b	39,45 \pm 0,10 ^b	39,32 \pm 0,10 ^b
	≥ 3	39,06 \pm 0,11 ^c	38,95 \pm 0,10 ^c	38,85 \pm 0,10 ^c	38,73 \pm 0,10 ^c
Lunghezza asciutta	<45 gg	36,92 \pm 0,13 ^a	36,80 \pm 0,13 ^a	36,66 \pm 0,13 ^a	36,54 \pm 0,13 ^a
	45-60 gg	40,80 \pm 0,08 ^b	40,66 \pm 0,08 ^b	40,53 \pm 0,08 ^b	40,42 \pm 0,09 ^b
	61-75 gg	40,47 \pm 0,10 ^c	40,34 \pm 0,10 ^c	40,21 \pm 0,10 ^c	40,08 \pm 0,10 ^c
	76-90 gg	38,56 \pm 0,18 ^d	38,43 \pm 0,18 ^d	38,31 \pm 0,18 ^d	38,18 \pm 0,18 ^d
	>90 gg	38,16 \pm 0,17 ^d	38,06 \pm 0,17 ^d	37,94 \pm 0,17 ^d	37,83 \pm 0,17 ^d
Rischio alla messa in asciutta	si	38,52 \pm 0,07 ^a	38,34 \pm 0,08 ^a	38,10 \pm 0,09 ^a	37,86 \pm 0,10 ^a
	no	39,44 \pm 0,10 ^b	39,37 \pm 0,09 ^b	39,37 \pm 0,08 ^b	39,36 \pm 0,08 ^b
Stato sanitario al secondo controllo funzionale	subclinica	37,21 \pm 0,10 ^a	37,10 \pm 0,10 ^a	37,01 \pm 0,10 ^a	36,90 \pm 0,10 ^a
	sana	40,75 \pm 0,07 ^b	39,37 \pm 0,09 ^b	40,46 \pm 0,07 ^b	40,32 \pm 0,07 ^b

¹ medie con differente lettera sono statisticamente differenti (p<0.05)

Le conseguenze

rischio di mastite subclinica al primo controllo funzionale dopo il parto, in base al valore soglia 100.000 cellule/ml relativi ultimo controllo funzionale pre asciutta

Lattazione	Prevalenza esposti %	Prevalenza non esposti %	Rapporto	Limiti confidenza	P
Primipare	28,09	16,49	1,70	1,62-1,80	<0.0001
Secondipare	32,59	20,36	1,60	1,50-1,71	<0.0001
Pluripare	38,90	24,40	1,59	1,49-1,71	<0.0001
Totale	33,27	18,63	1,64	1,59-1,70	<0.0001

rischio di mastite subclinica al primo controllo funzionale post-parto in base al valore soglia 200.000 cellule/ml relativi ultimo controllo funzionale pre asciutta

Lattazione	Prevalenza esposti %	Prevalenza non esposti %	Rapporto	Limiti confidenza	P
Primipare	32,12	18,47	1,74	1,65-1,83	<0.0001
Secondipare	37,64	22,63	1,66	1,57-1,76	<0.0001
Pluripare	43,24	27,34	1,58	1,50-1,66	<0.0001
Totale	38,19	21,37	1,66	1,61-1,71	<0.0001

Le conseguenze

prevalenza (%) mastite subclinica soggetti ipoteticamente non trattati al primo controllo funzionale per le diverse soglie selezionate e in base al numero di lattazioni (ultimo controllo funzionale)

Lattazione	Valore soglia (cellule/ml)			
	100.000	150.000	200.000	250.000
Primipare	16,49 (15,82-17,19) ^{a,1}	17,66 (17,03-18,28) ^b	18,47 (17,87-19,08) ^b	19,04 (18,45-19,65) ^b
Secondipare	20,36 (19,23-21,53) ^a	21,6 (20,64-22,6) ^a	22,63 (21,73-23,55) ^a	23,52 (22,66-24,41) ^a
Pluripare	24,4 (22,83-26,03) ^a	26,34 (25,08-27,64) ^a	27,34 (26,22-28,49) ^a	28,61 (27,56-29,69) ^a
Totale	18,63 (18,08-19,2) ^a	20,27(19,78-20,77) ^b	21,37 (20,91-21,84) ^c	22,31 (21,86-22,76) ^d

¹ frequenze con differente lettera sono statisticamente differenti (p<0.05)

Le conseguenze

prevalenza (%) mastite subclinica soggetti ipoteticamente non trattati al primo controllo funzionale per le diverse soglie selezionate e in base al numero di lattazione (media lattazione)

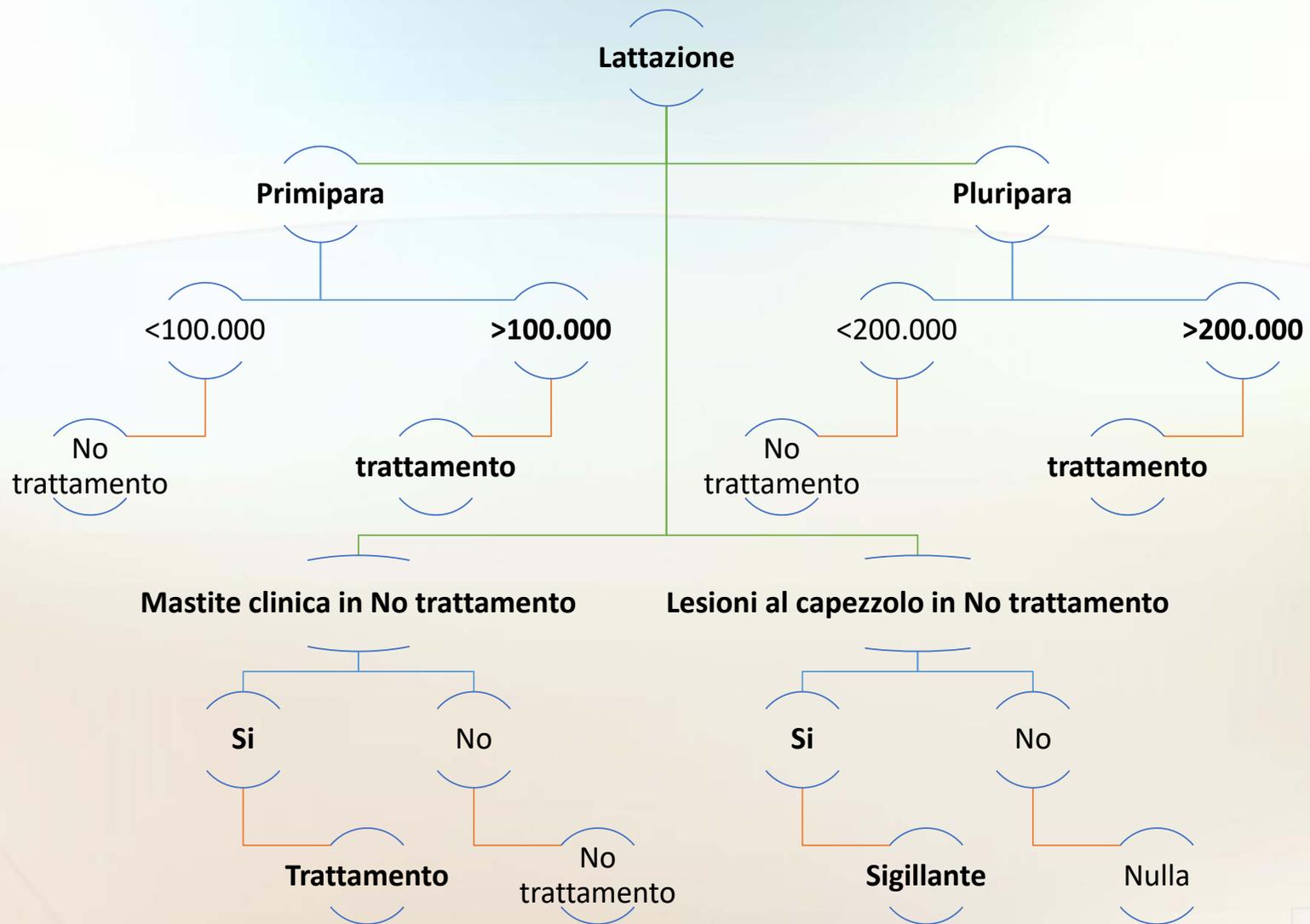
Lattazione	Valore soglia (cellule/ml)			
	100.000	150.000	200.000	250.000
Primipare	15,20 (14,53-15,90) ^a	16,76 (16,13-17,40) ^b	17,61 (17,01-18,22) ^b	18,35 (17,76-18,95) ^b
Secondipare	17,57 (16,56-18,63) ^a	19,36 (18,45-20,30) ^b	20,66 (19,79-21,56) ^c	21,78 (20,93-22,65) ^c
Pluripare	20,06 (18,73-21,46) ^a	22,17 (21,04-23,36) ^b	23,92 (22,86-25,01) ^c	25,67 (24,65-26,71) ^d
Totale	16,69 (16,17-17,22) ^a	18,52 (18,05-19,01) ^b	19,76 (19,30-20,22) ^c	20,93 (20,48-21,38) ^d

¹ frequenze con differente lettera sono statisticamente differenti (p<0.05)

Take home message 2

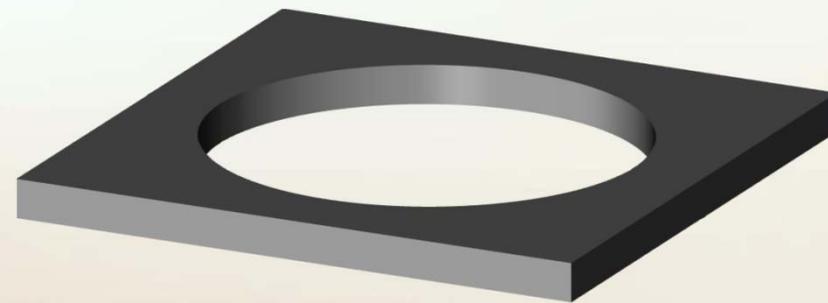
- La scelta della soglia basata sull'ultimo controllo funzionale o sulla media di lattazione non determina una significativa differenza nelle frequenze degli animali da trattare.
- Il superamento delle soglie scelte per definire se una bovina possa essere trattata o meno in asciutta sono associate ad un rischio significativo di comparsa di mastite subclinica dopo parto.
- Avere valori cellulari sotto le soglie definite è associato ad una **frequenza di mastiti subcliniche compresa tra il 13 e il 28%**, valori che nel nostro campione si riferiscono comunque ad animali trattati in asciutta. Quindi in assenza di tale trattamento ci dobbiamo aspettare valori maggiori.
- L'adozione della terapia in asciutta selettiva verosimilmente determinerà **l'aumento della presenza di forme subcliniche dopo parto** e quindi indurrà perdite produttive pari a 3-4 litri/giorno.

Schema operativo asciutta



Cosa stiamo facendo?

- Applicazione schema precedente in 11 allevamenti lombardi
- Analisi batteriologica per quarto
 - 7 gg prima della messa in asciutta
 - Alla messa in asciutta
 - 7 gg dopo parto
 - 14 gg dopo parto
 - Ogni caso clinico fino a 90gg
- Conteggio cellule somatiche totali e differenziali per i campioni precedenti
- Informazione in tempo reale se presenti agenti contagiosi o patogeni maggiori (*Str.uberis* e *Str.dysgalactiae*)



Conclusioni

Conclusioni

- **I dati che avete visto sono il frutto di tanto lavoro ed impegno di:**
 - Allevatori
 - Personale APA/ARAL (a tutti i livelli)
 - Collaboratori Unimi
- **I dati di pochi mesi di lavoro insieme mostrano risultati:**
 - Interessanti
 - Trasferibili negli allevamenti in breve tempo
 - Utili a migliorare la sanità e il benessere degli animali



Quando fare sistema paga!



Sono i **primi passi** di una **collaborazione** che speriamo sia lunga e positiva e i primi **risultati** indicano che la **direzione** è giusta



Un invito



**Latte & salute:
un'associazione da
salvaguardare**

XVI Congresso MCI

9-10 Marzo 2018

Aula Magna Manodori - Università di Modena e Reggio Emilia –
Via Allegri 15 Reggio Emilia

www.mastitalia.org

© A.Zecconi 2018

Grazie !

