

# 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

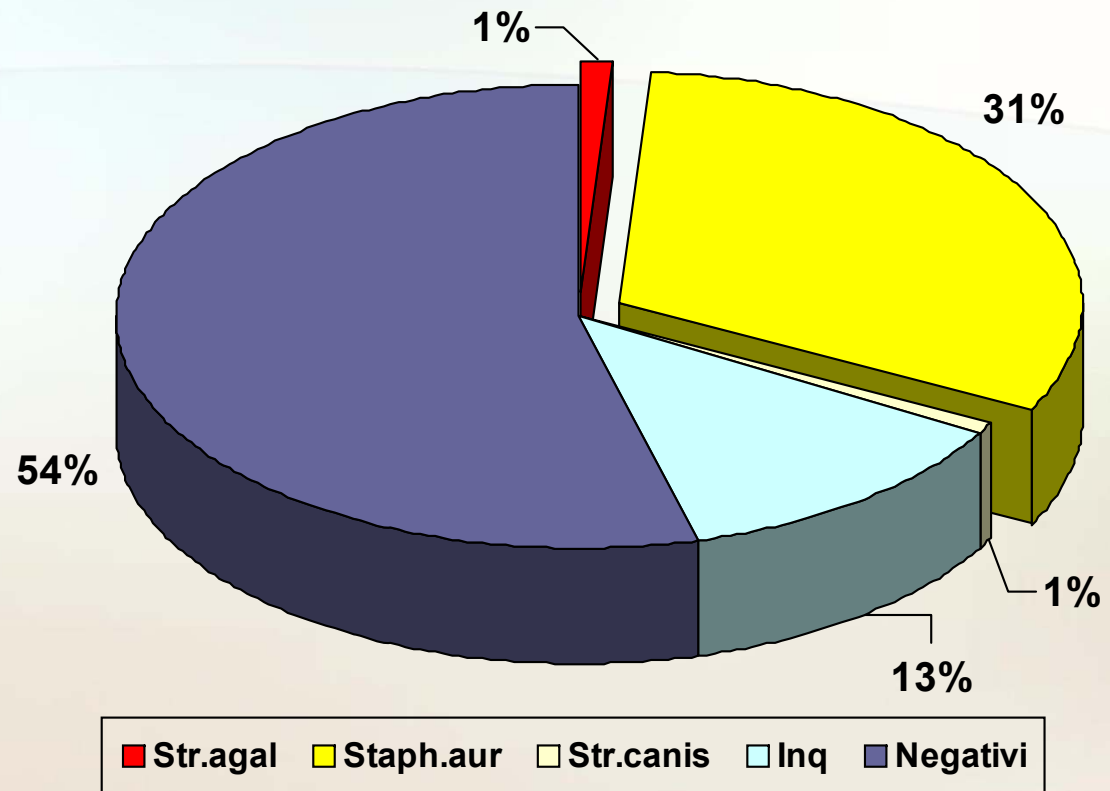
1. REAL TIME PCR applicazione in campo
2. Il conteggio cellulare differenziale
3. La messa in asciutta selettiva



# Real time PCR: applicazione in campo

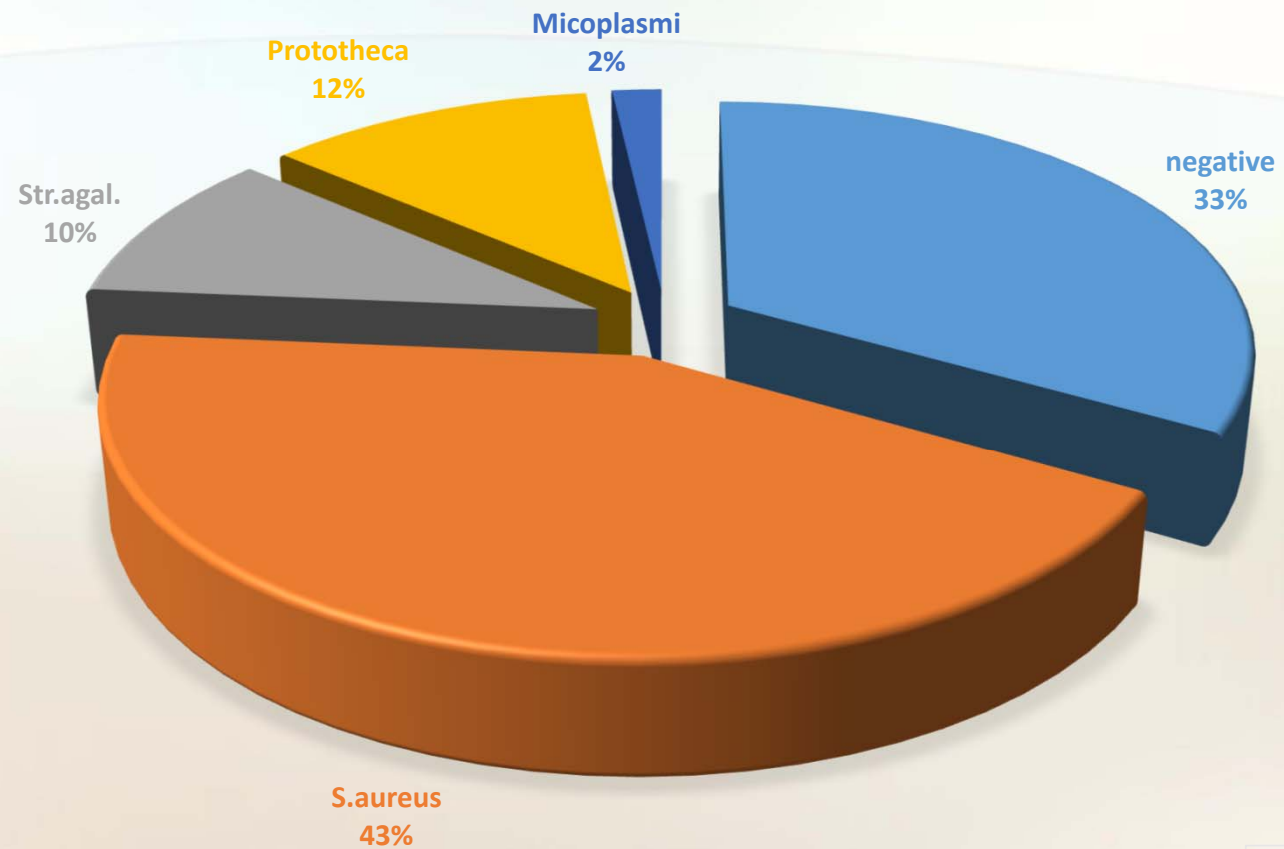
# L'evoluzione delle tecniche - 2002

2400 allevamenti  
Metodo microbiologico  
convenzionale





# L'evoluzione delle tecniche - 2018



582 allevamenti  
Metodo RT PCR  
3 campioni LM

# Ignavia, scarsa competenza e *S.aureus*

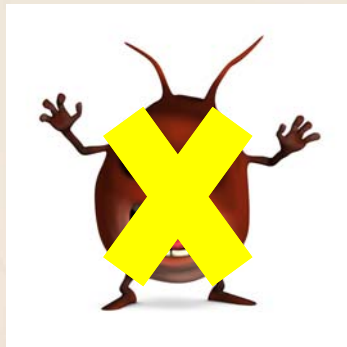
- Frase sentita con maggiore frequenza: “*con S.aureus non si può fare nulla bisogna convivere*”.

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

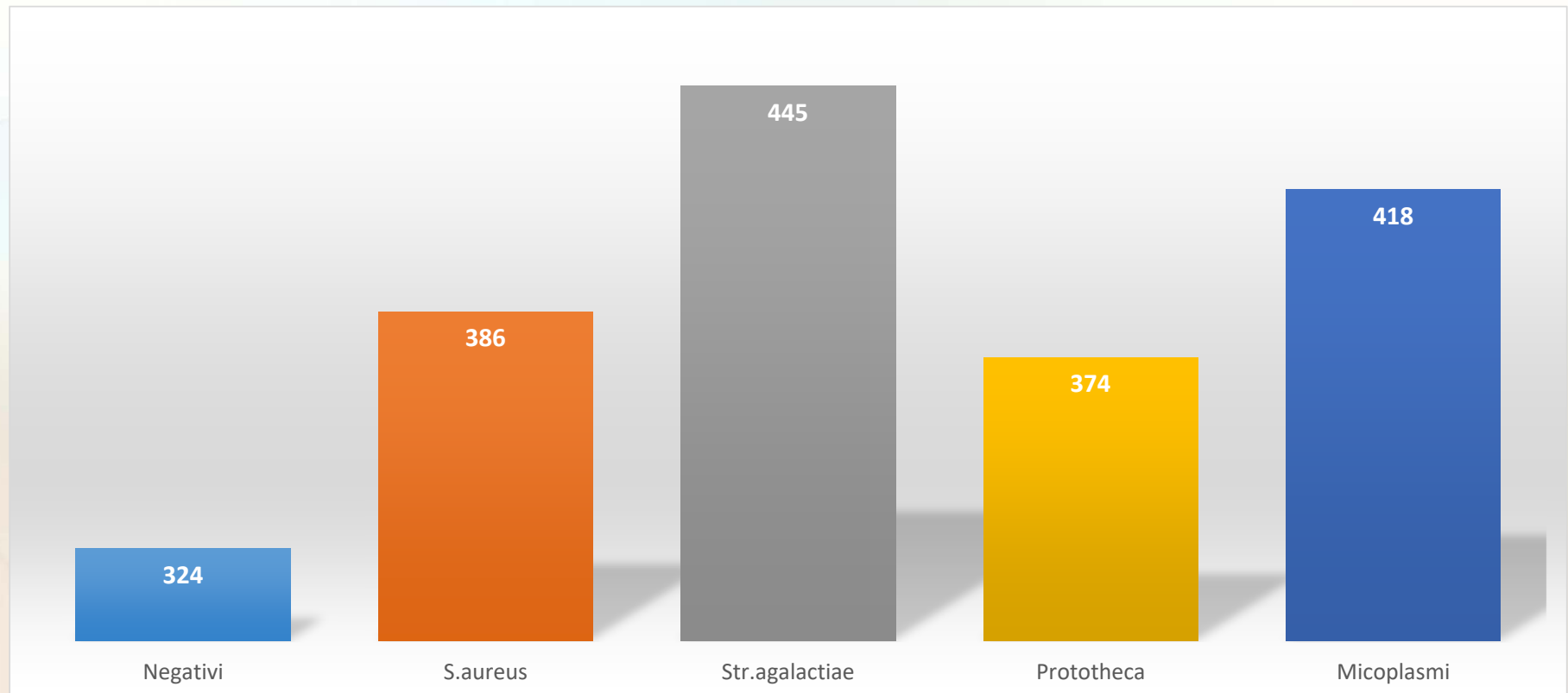


- **Piano eradicazione in Lombardia cominciato negli anni '60, dichiarato concluso da IZLER con successo a fine anni '90.**
- Risultati RL 2013 (5800 allevamenti) → 10% positivi (punte 22%)
- Risultati RTPCR (582 allevamenti) → 10% positivi
- Media produzione -2,6 litri/giorno → 57.500€/anno
- Media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

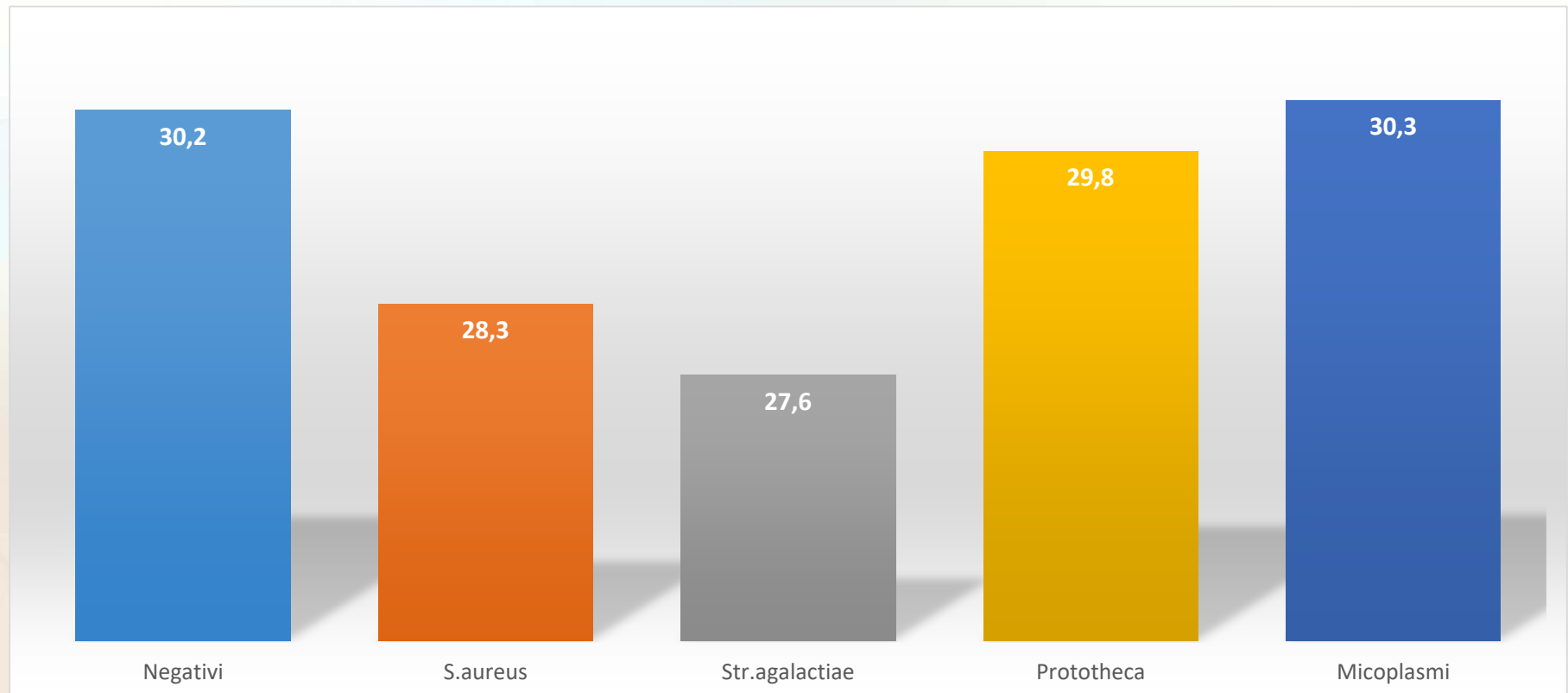
# Micoplasmi - una nuova sfida

- **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.*

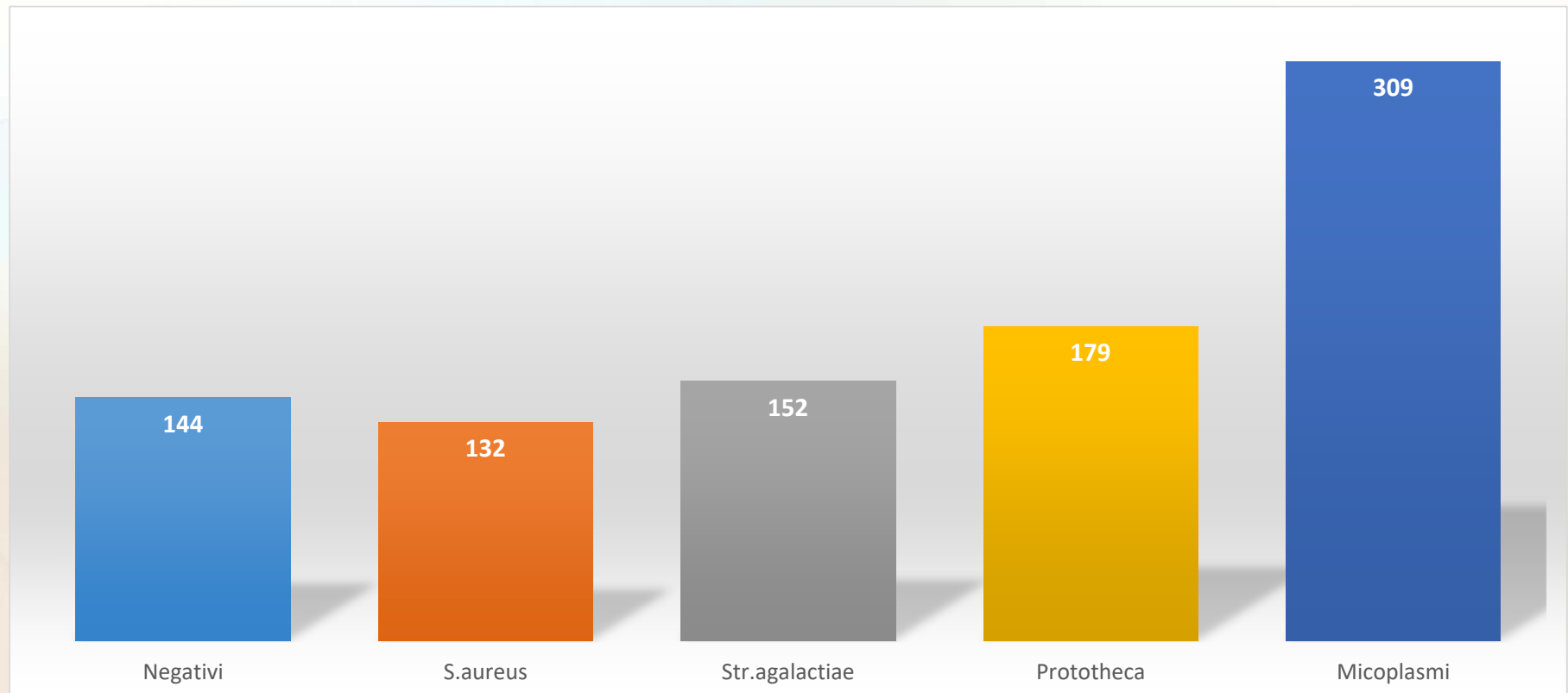
## I patogeni non hanno tutti lo stesso effetto – cellule somatiche



## 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

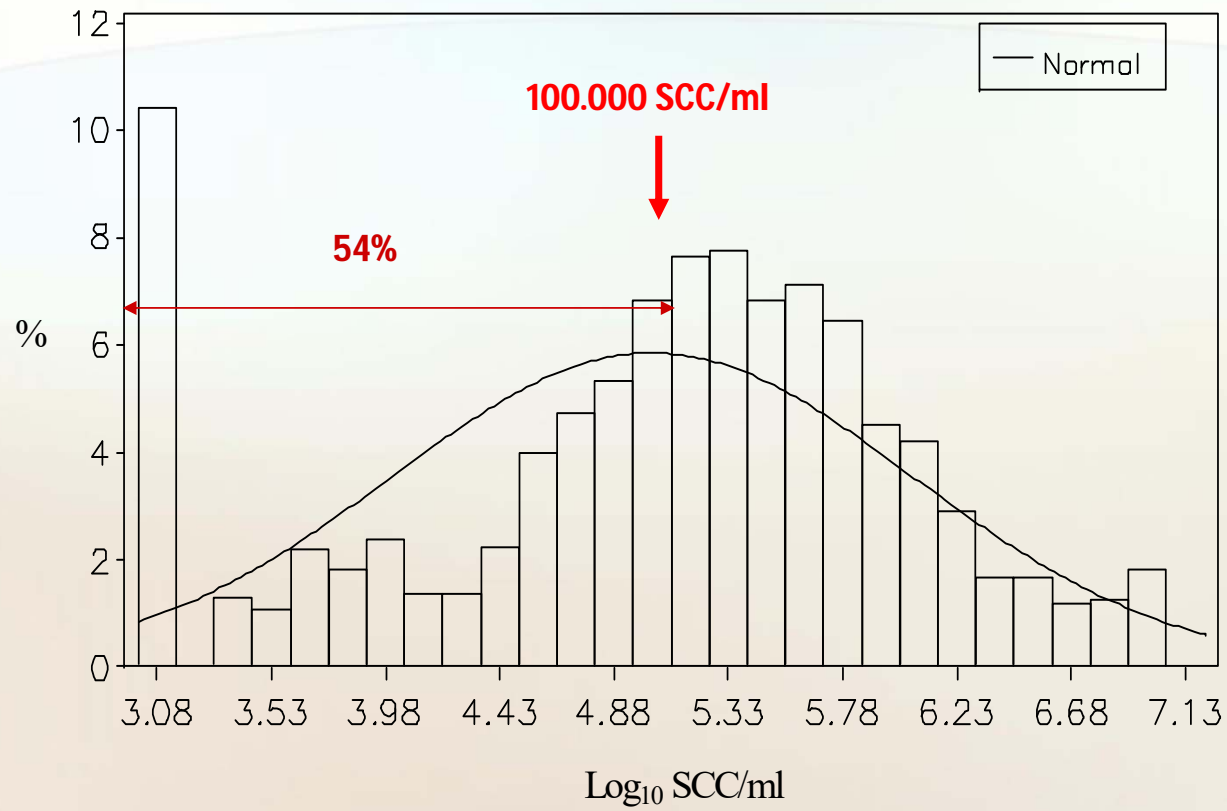
# Invito alla Regione Lombardia (agricoltura e sanità)

- 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 <sup>1</sup>	FC <sup>2</sup>
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	

<sup>14</sup>

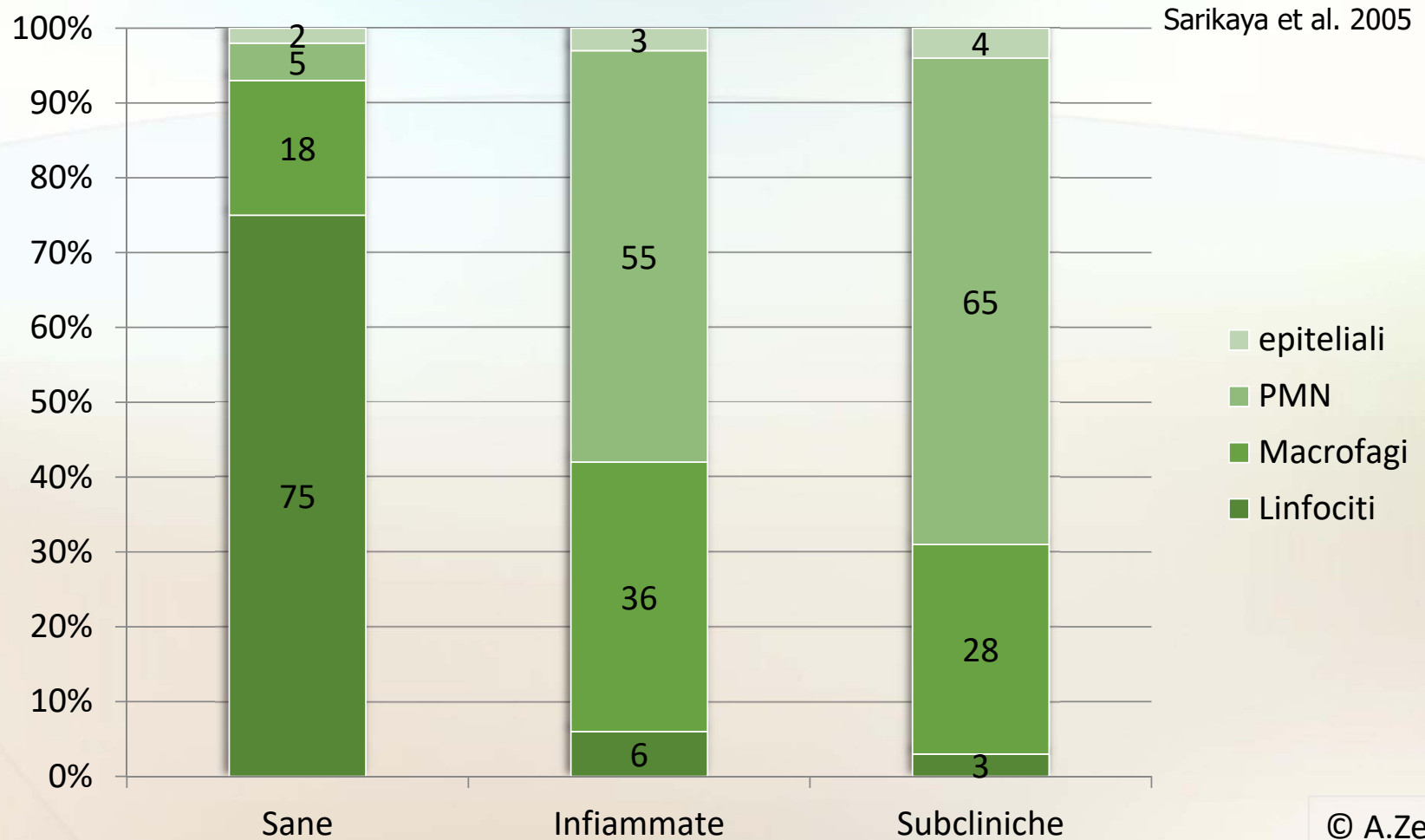
<sup>1</sup>microscope; <sup>2</sup>flow cytometry, antibody staining

**FOSS**

Schwarz, 2014

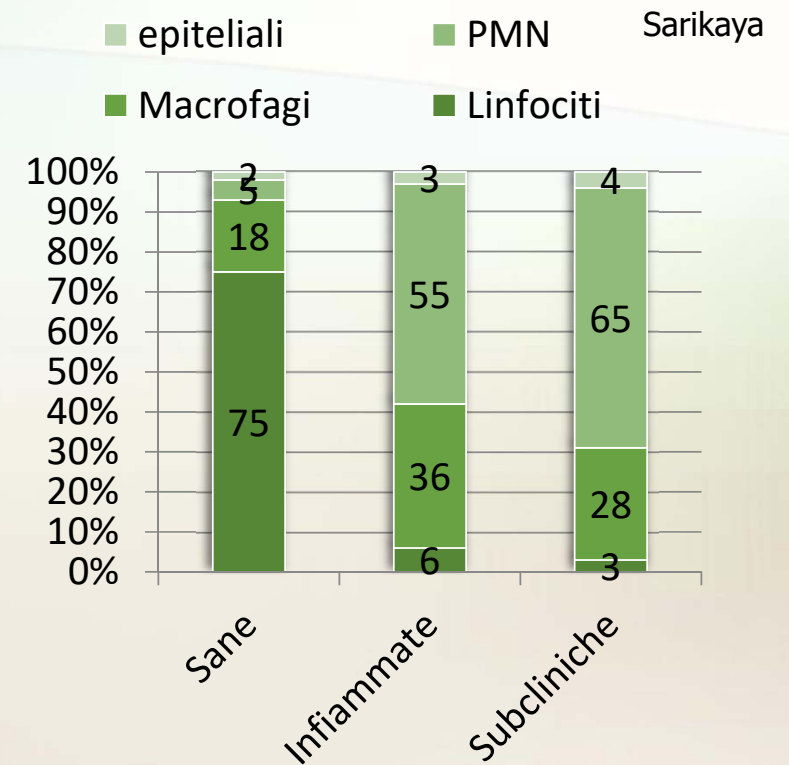
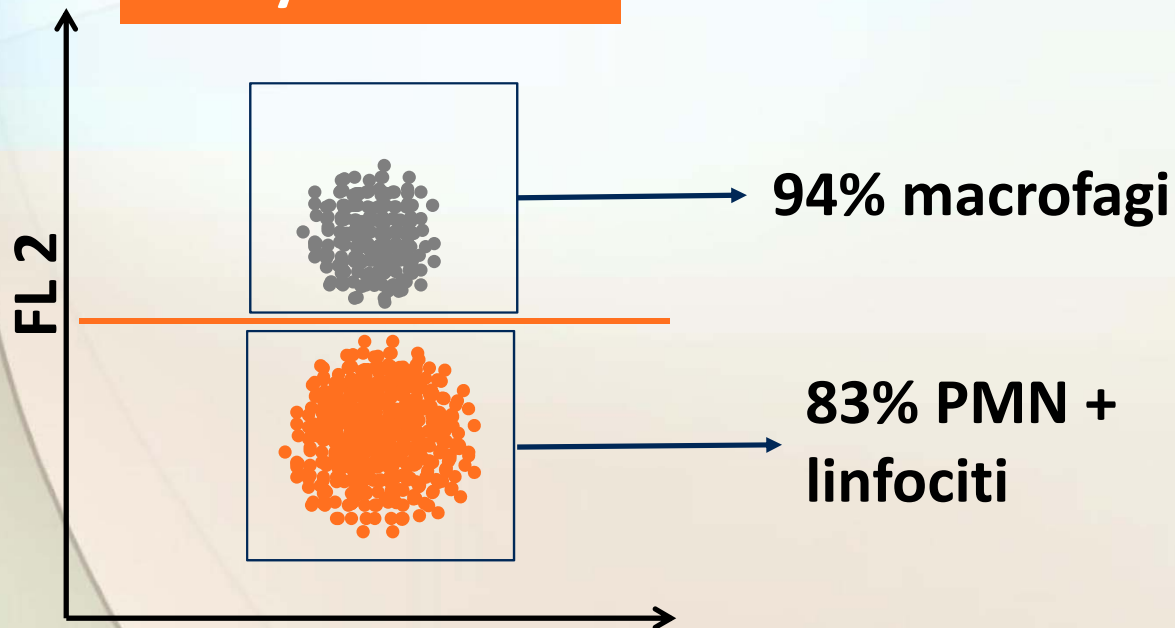
© A.Zecconi 2018

# 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**



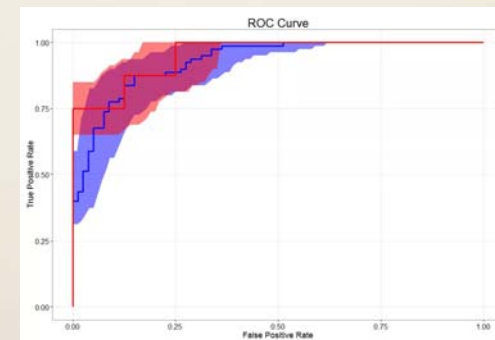
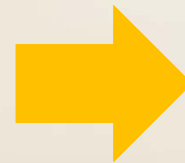
## Il problema principale

**Quale soglia  
dobbiamo  
mettere per  
DSCC?**

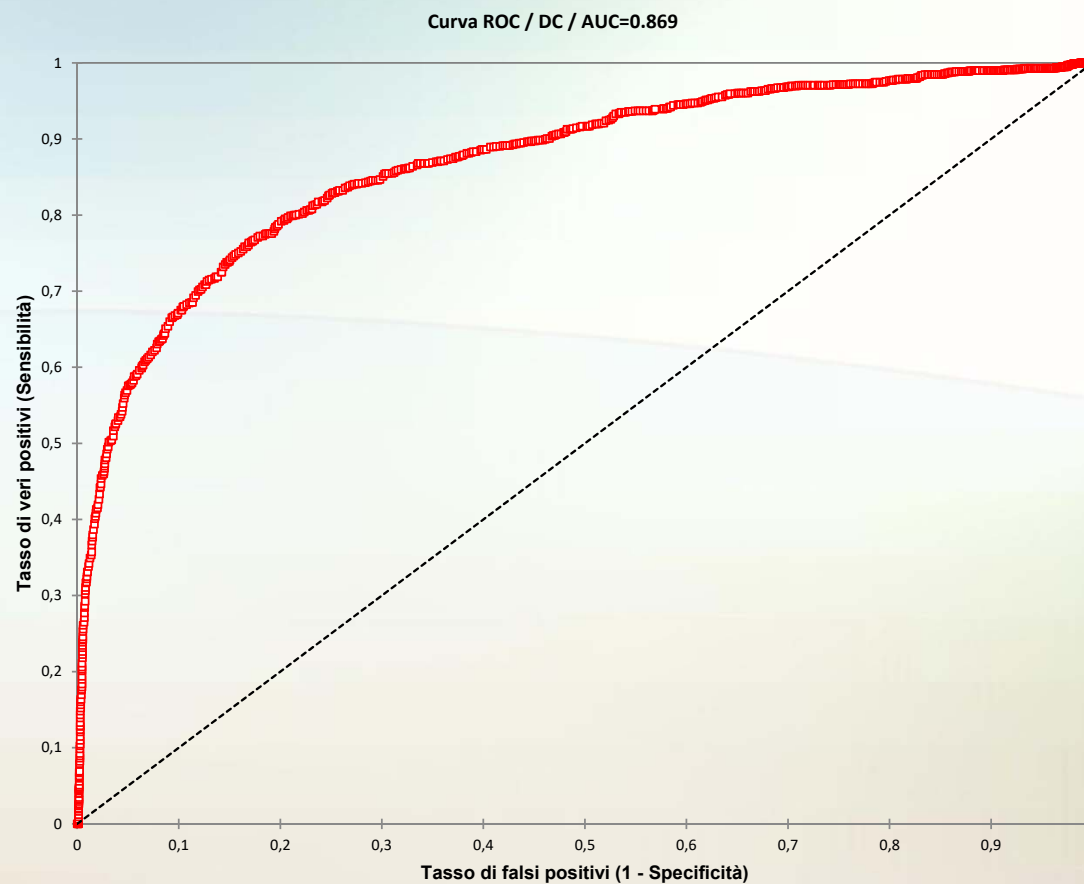


# Cosa abbiamo fatto

- 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

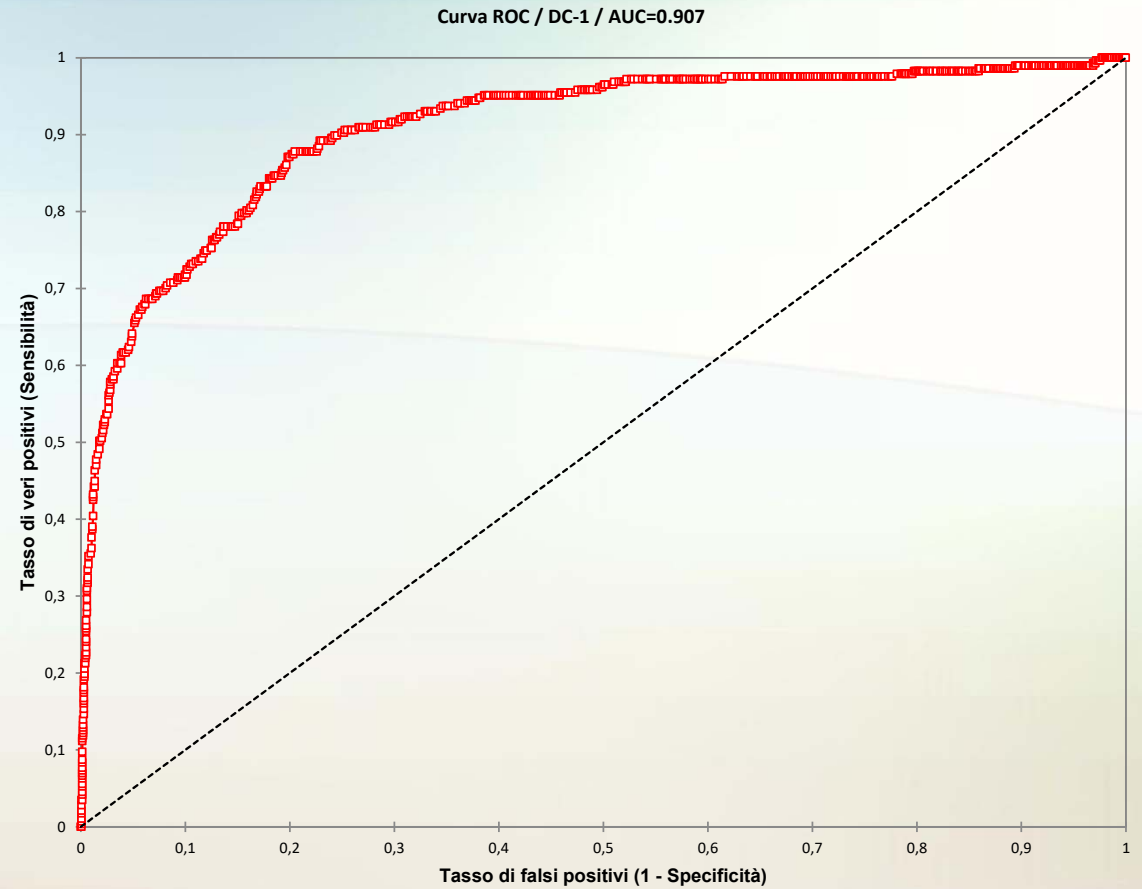


Tutti i  
campioni



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

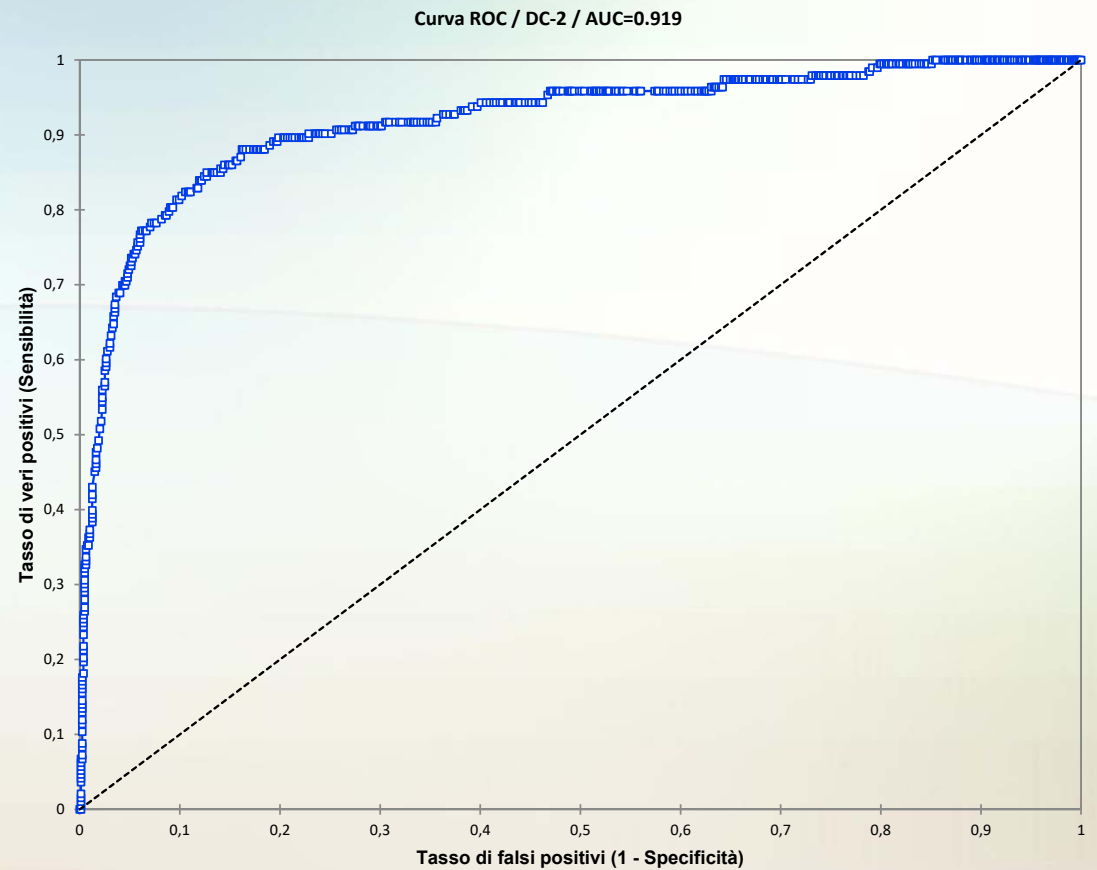
# DSCC primi 100 gg



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

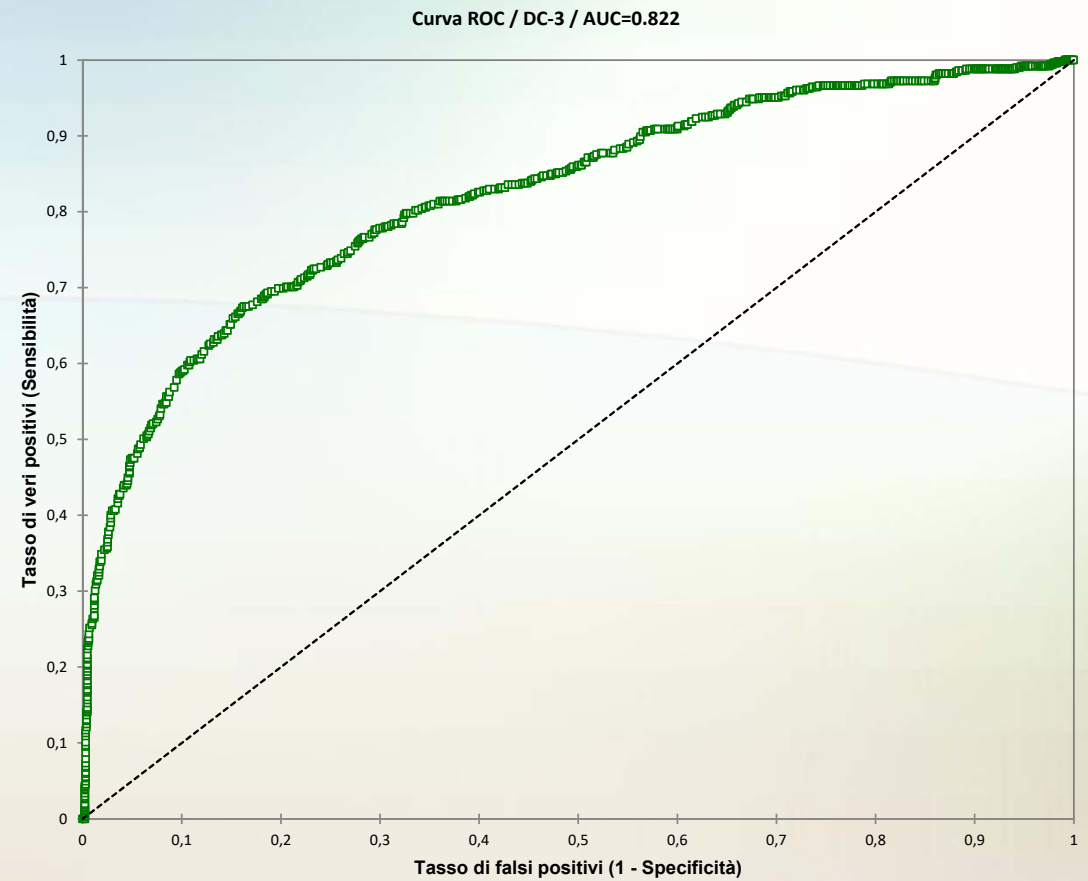
# Dsc

## 100-200 giorni



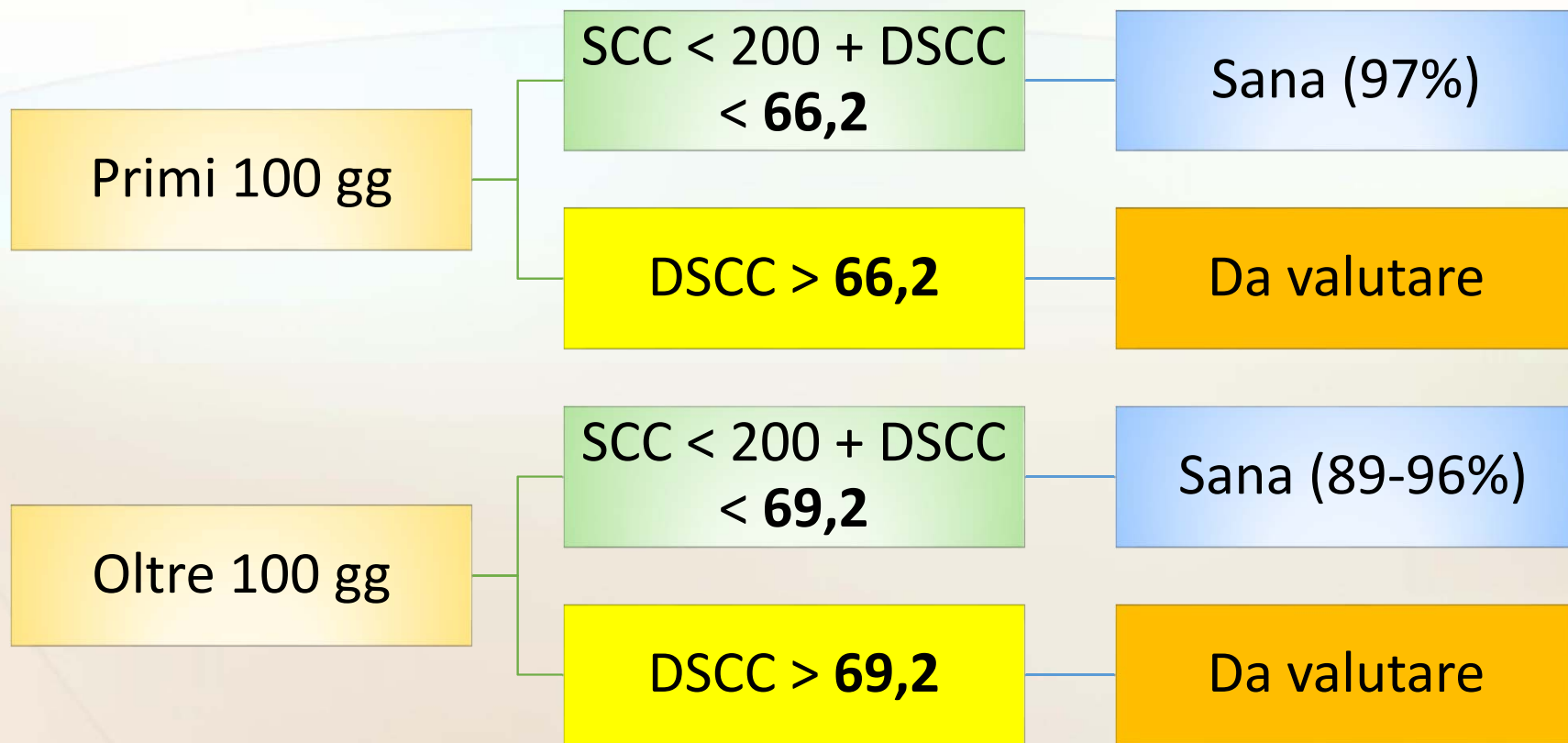
DC-2	Sensibilità	Specificità	VPP	VPN	LR+	LR-
69.200	0.850	0.873	0.619	0.960	6.697	0.172

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...

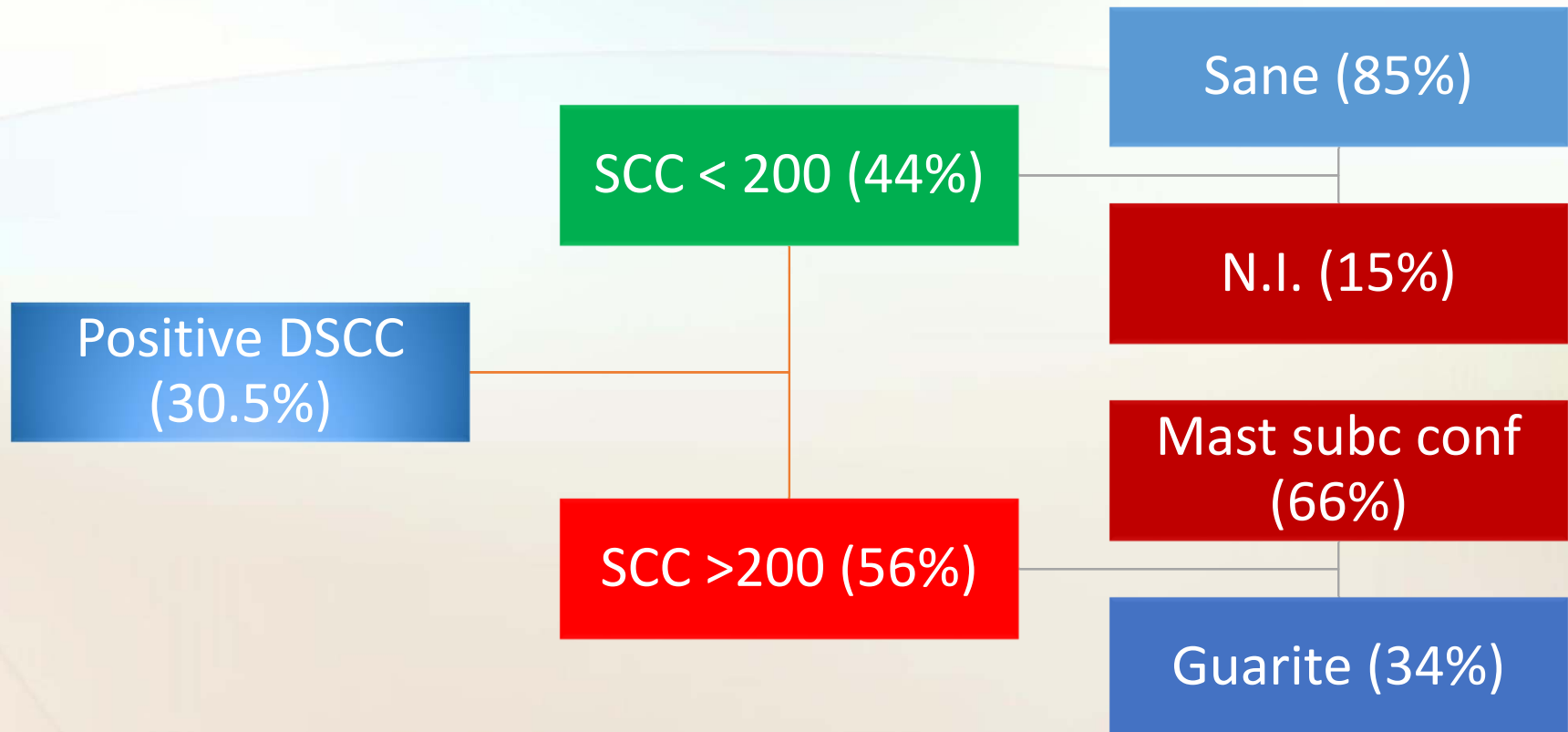




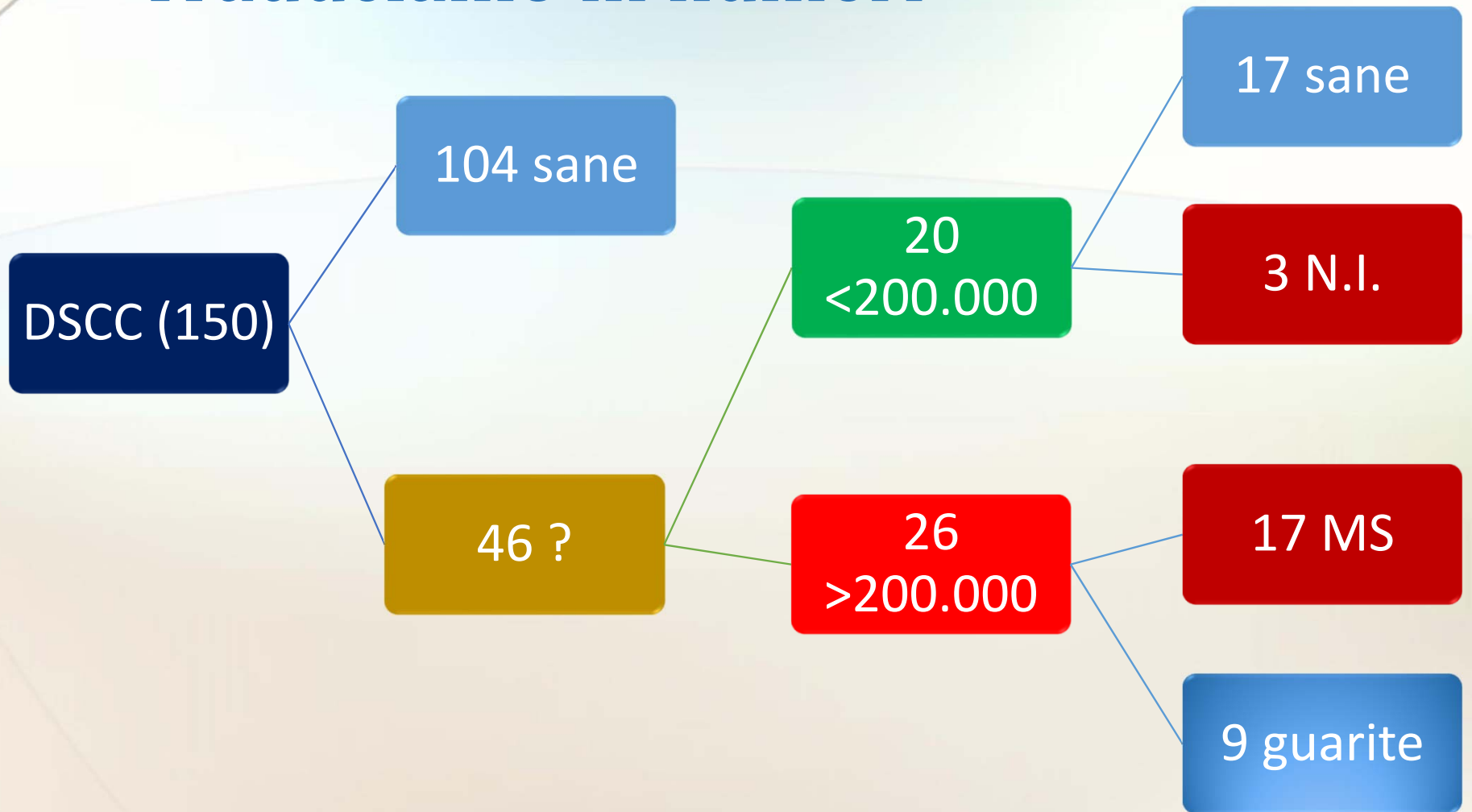
# Passo successivo

- 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.

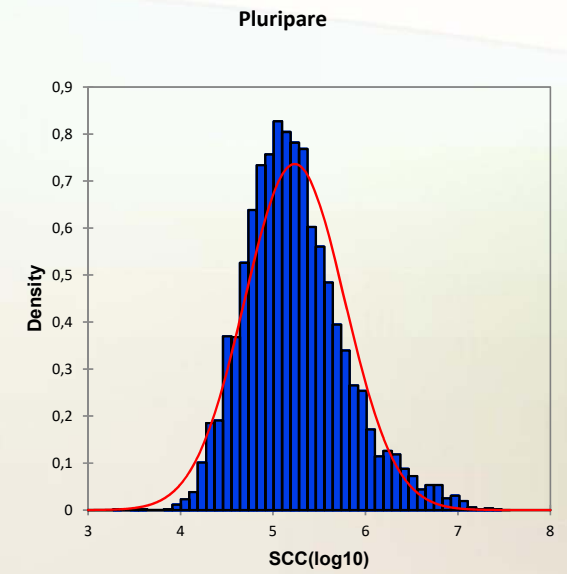
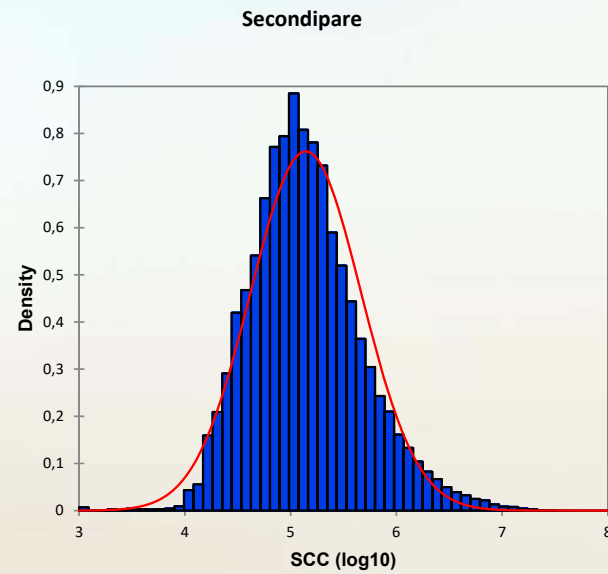
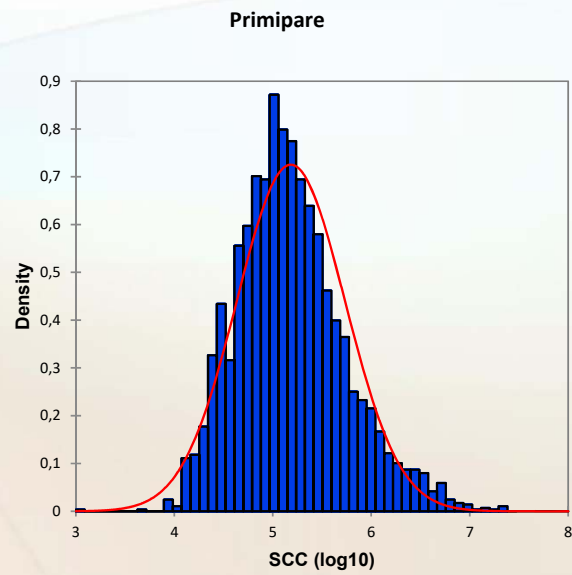
# Il quadro di riferimento



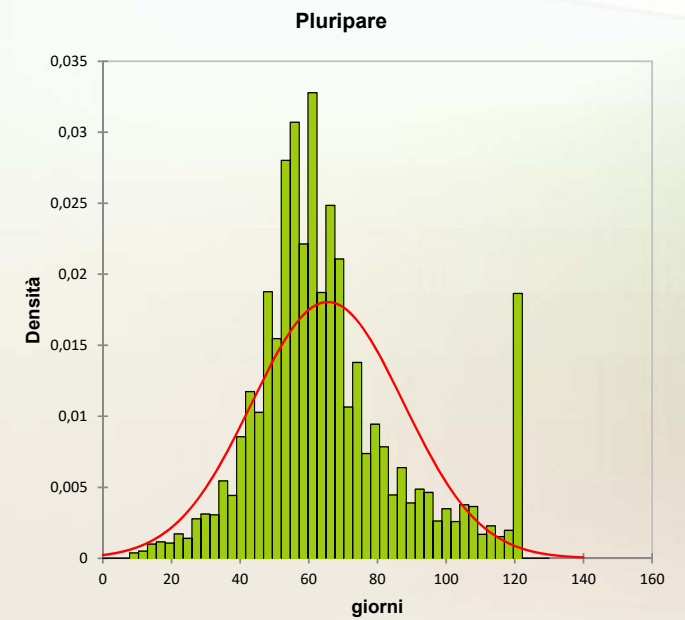
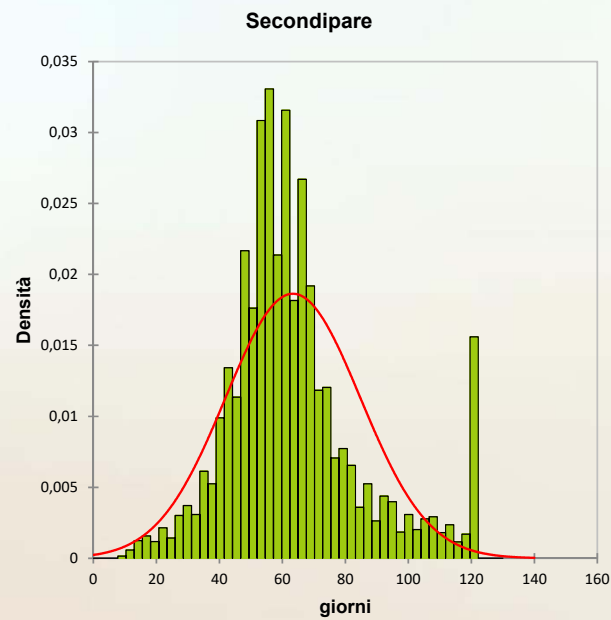
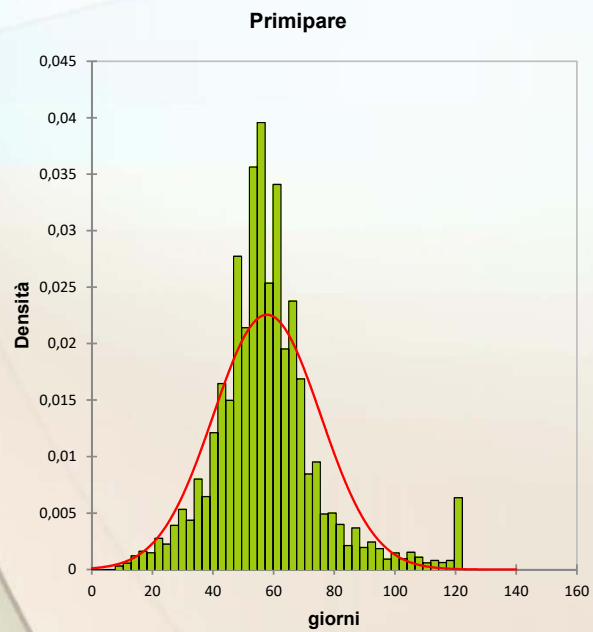
720 allevamenti di bovine da latte lombardi delle provincie di Como, Lecco, Milano, Monza, Pavia, Sondrio per un totale di 45.682 bovine.



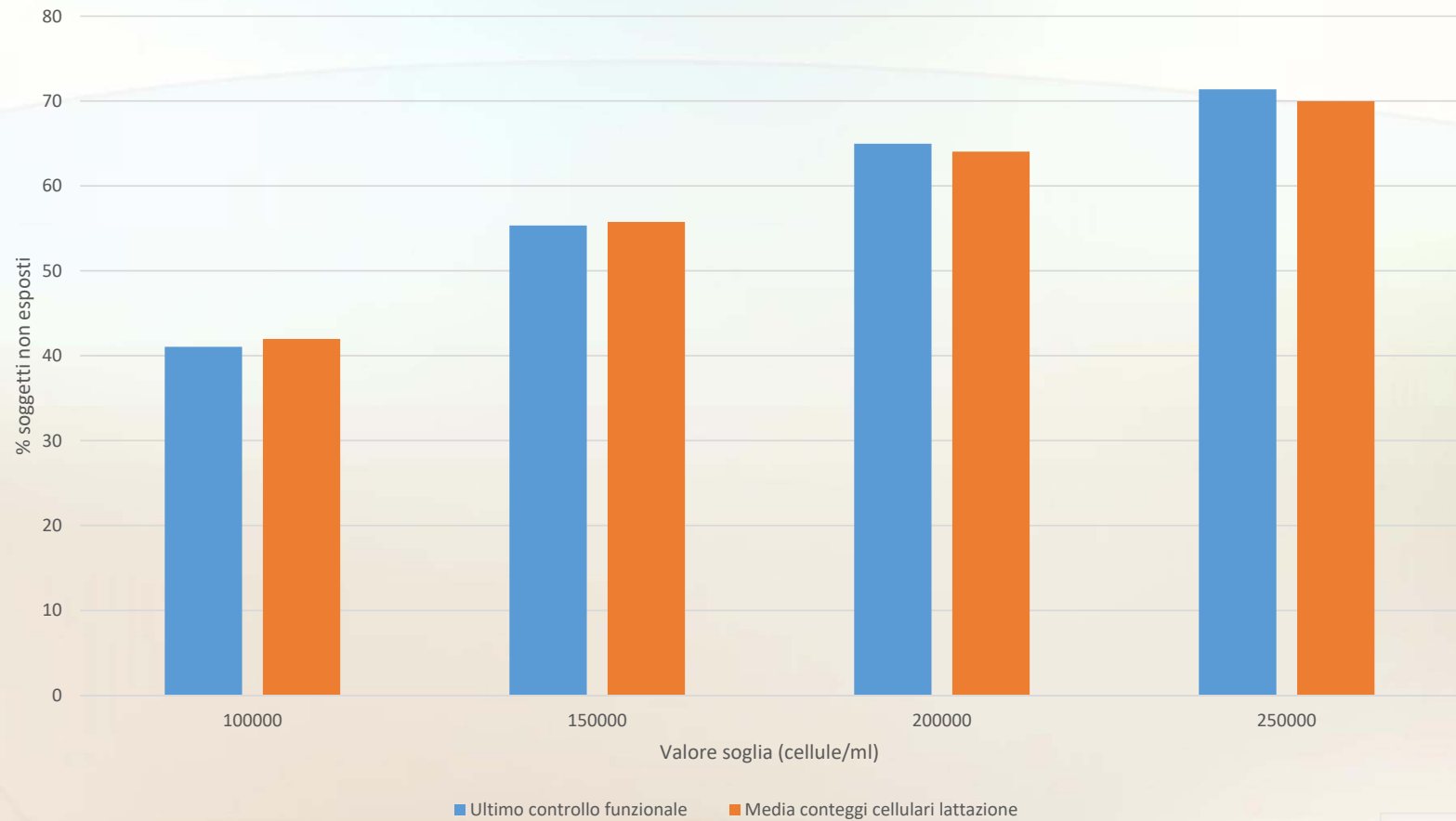
# La situazione attuale - SCC



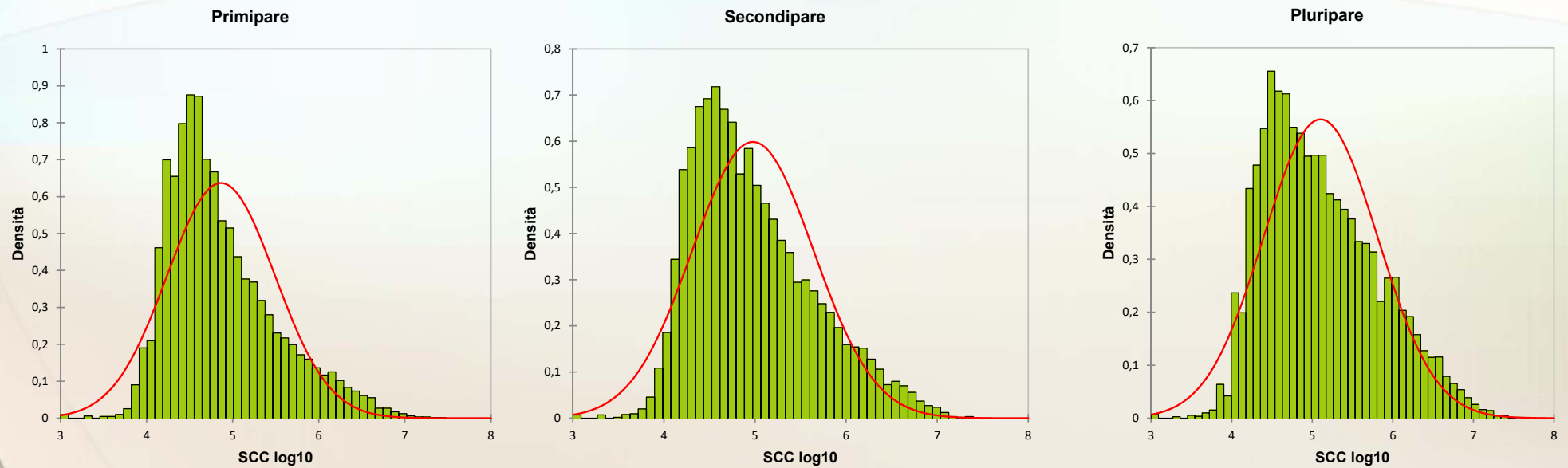
# La situazione attuale – durata asciutta



# 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 <sup>a</sup>	38,03 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	37,90 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	37,38 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>
	2	39,72 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	39,60 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	39,45 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	39,32 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>
	$\geq 3$	39,06 $\pm$ 0,11 <sup>c</sup>	38,95 $\pm$ 0,10 <sup>c</sup>	38,85 $\pm$ 0,10 <sup>c</sup>	38,73 $\pm$ 0,10 <sup>c</sup>
Lunghezza asciutta	<45 gg	36,92 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	36,80 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	36,66 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	36,54 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>
	45-60 gg	40,80 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	40,66 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	40,53 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	40,42 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>
	61-75 gg	40,47 $\pm$ 0,10 <sup>c</sup>	40,34 $\pm$ 0,10 <sup>c</sup>	40,21 $\pm$ 0,10 <sup>c</sup>	40,08 $\pm$ 0,10 <sup>c</sup>
	76-90 gg	38,56 $\pm$ 0,18 <sup>d</sup>	38,43 $\pm$ 0,18 <sup>d</sup>	38,31 $\pm$ 0,18 <sup>d</sup>	38,18 $\pm$ 0,18 <sup>d</sup>
	>90 gg	38,16 $\pm$ 0,17 <sup>d</sup>	38,06 $\pm$ 0,17 <sup>d</sup>	37,94 $\pm$ 0,17 <sup>d</sup>	37,83 $\pm$ 0,17 <sup>d</sup>
Rischio alla messa in asciutta	si	38,52 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	38,34 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	38,10 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	37,86 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
	no	39,44 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	39,37 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	39,37 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	39,36 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>
Stato sanitario al secondo controllo funzionale	subclinica	37,21 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	37,10 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	37,01 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	36,90 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
	sana	40,75 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	39,37 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	40,46 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	40,32 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> 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) <sup>a,1</sup>	17,66 (17,03-18,28) <sup>b</sup>	18,47 (17,87-19,08) <sup>b</sup>	19,04 (18,45-19,65) <sup>b</sup>
Secondipare	20,36 (19,23-21,53) <sup>a</sup>	21,6 (20,64-22,6) <sup>a</sup>	22,63 (21,73-23,55) <sup>a</sup>	23,52 (22,66-24,41) <sup>a</sup>
Pluripare	24,4 (22,83-26,03) <sup>a</sup>	26,34 (25,08-27,64) <sup>a</sup>	27,34 (26,22-28,49) <sup>a</sup>	28,61 (27,56-29,69) <sup>a</sup>
Totale	18,63 (18,08-19,2) <sup>a</sup>	20,27(19,78-20,77) <sup>b</sup>	21,37 (20,91-21,84) <sup>c</sup>	22,31 (21,86-22,76) <sup>d</sup>

<sup>1</sup> 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) <sup>a</sup>	16,76 (16,13-17,40) <sup>b</sup>	17,61 (17,01-18,22) <sup>b</sup>	18,35 (17,76-18,95) <sup>b</sup>
Secondipare	17,57 (16,56-18,63) <sup>a</sup>	19,36 (18,45-20,30) <sup>b</sup>	20,66 (19,79-21,56) <sup>c</sup>	21,78 (20,93-22,65) <sup>c</sup>
Pluripare	20,06 (18,73-21,46) <sup>a</sup>	22,17 (21,04-23,36) <sup>b</sup>	23,92 (22,86-25,01) <sup>c</sup>	25,67 (24,65-26,71) <sup>d</sup>
Totale	16,69 (16,17-17,22) <sup>a</sup>	18,52 (18,05-19,01) <sup>b</sup>	19,76 (19,30-20,22) <sup>c</sup>	20,93 (20,48-21,38) <sup>d</sup>

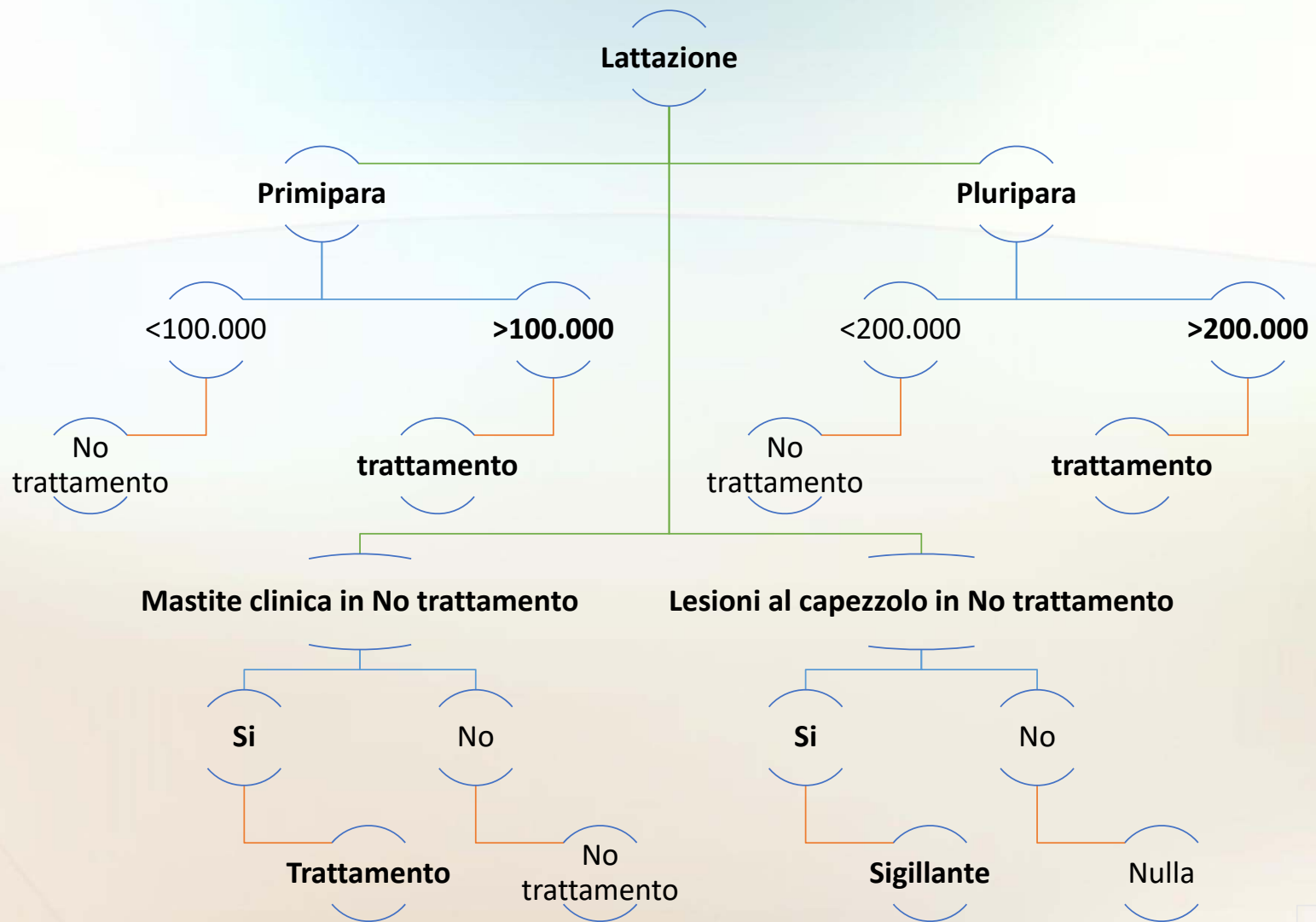
<sup>1</sup> frequenze con differente lettera sono statisticamente differenti (p<0.05)



## Take home message 2

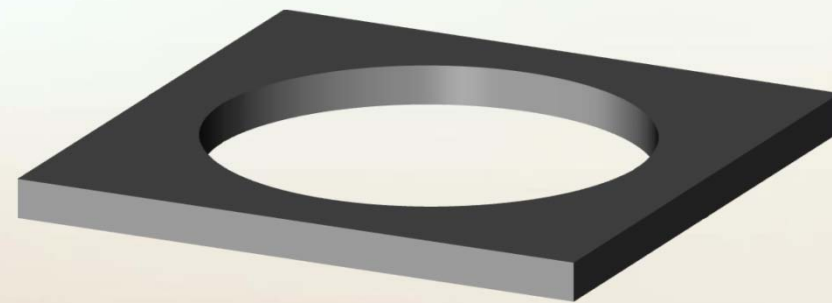
- La scelta della soglia basata sull'ultimo controllo funzionale o sulla media di lattazione non determina una significativa differenza nelle frequenze degli animali da trattare.
- Il superamento delle soglie scelte per definire se una bovina possa essere trattata o meno in asciutta sono associate ad 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](http://www.mastitalia.org)**

© A.Zecconi 2018

**Grazie !**

