

# VALUTAZIONE SULL'IMPIEGO DELLA PROVA ELISA SUL LATTE DI MASSA PER LA SORVEGLIANZA DELLA LEUCOSI BOVINA ENZOOTICA IN EMILIA-ROMAGNA

Prima dell'utilizzo routinario del test ELISA sul latte massa per la sorveglianza della LBE in una Regione ufficialmente indenne, si è ritenuto opportuno effettuare un'indagine per valutare l'efficienza e l'efficacia di questo metodo di controllo.

M. TAMBA\*, E. FONI\*, R. LEONELLI\*, M. DOTTORI\*, M. RENZI\*, L. GELMINI\*, S. GUAZZETTI\*\*, P. CORDIOLI\*

\*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Emilia-Romagna "B. Ubertini", Brescia

\*\*Azienda USL di Reggio Emilia - Servizio Veterinario

E-mail: mtamba@bs.izs.it

## RIASSUNTO

*L'Emilia-Romagna dopo aver raggiunto la qualifica di territorio ufficialmente indenne dal LBE ha attivato un piano di sorveglianza che prevede l'impiego di un test ELISA sul latte di massa. Allo scopo di valutare l'efficienza e l'efficacia di questo test, in un campione di 492 aziende da latte sono stati confrontati i risultati ottenuti dall'ELISA sul latte di massa e dal controllo sierologico individuale (AGID) dei capi di età superiore a 24 mesi. Nell'indagine sono stati prelevati 504 campioni di latte di massa e 25.303 campioni di sangue. Il test ELISA sul latte di massa ha mostrato una specificità del 99,8% e una sensibilità in grado di rilevare aziende con prevalenza del 2-5%. Mediamente l'80% dei capi di età superiore a 24 mesi è risultato in lattazione durante l'indagine. Gli autori ritengono che il controllo annuale del latte con il test ELISA permetta il mantenimento della qualifica sanitaria e l'individuazione precoce degli eventuali allevamenti infetti.*

(English summary p. 6)

**PAROLE CHIAVE:** *Leucosi Bovina Enzootica, latte di massa, sorveglianza, ELISA.*

**L**a Leucosi Bovina Enzootica (LBE) è una malattia infettiva trasmissibile sostenuta da un virus appartenente alla famiglia delle *Retroviridae*. I bovini risultano naturalmente sensibili alla malattia che si manifesta con linfocitosi persistente e/o con la formazione di linfosarcomi. Negli allevamenti bovini da latte l'infezione causa significative perdite economiche legate sia alle diminuite produzioni [4], sia alle limitazioni imposte alla commercializzazione di animali da vita [6]. Dal 1996 la LBE è oggetto di un piano nazionale di eradicazione basato sul controllo sierologico individuale dei bovini di età superiore a 12 mesi e sulla macellazione dei capi risultati sieropositivi [6]. Attraverso l'applicazione di tale piano la prevalenza dell'infezione si è progressivamente ridotta su tutto il territorio nazionale [7]. In particolare la Regione Emilia-Romagna nel mese di marzo 2003 è stata dichiarata territorio ufficialmente indenne da LBE avendo raggiunto i parametri richiesti dalla normativa comunitaria (Dir. 64/432/CEE): 99,8% degli allevamenti indenni da infezione da almeno tre anni; prevalenza annua di allevamenti infetti inferiore allo 0,2% e nessun caso di tumore dovuto a LBE negli ultimi tre anni. In seguito al conseguimento di tale obiettivo si è ritenuto opportuno attivare un piano di sorveglianza, volto al mantenimento della qualifica raggiunta, che prevede tra l'altro anche il controllo sierologico con cadenza annuale del latte di massa per il mantenimento della qualifica di allevamento ufficialmente

indenne da LBE. Dal momento che in letteratura non sono riportate molte esperienze su questa modalità di sorveglianza, si è ritenuto opportuno effettuare un'indagine con lo scopo di confrontare l'efficacia (sensibilità, specificità e concordanza) e l'efficienza tra la prova sul latte di massa mediante ELISA e il controllo sierologico individuale.

## MATERIALI E METODI

### Durata dell'indagine

L'indagine si è svolta nell'arco dell'anno 2004. I campioni sono stati prelevati dai Servizi Veterinari delle Aziende USL nell'ambito dei controlli periodici previsti dal piano di sorveglianza regionale.

### Aziende esaminate

La valutazione dell'impiego del test ELISA sul latte di massa è stata svolta attraverso un'indagine a campione. Per tale scopo sono state selezionate 500 aziende bovine da latte delle circa 5.700 esistenti in Emilia-Romagna. Il campione di aziende è stato stratificato per Provincia e classe di consistenza in modo da essere rappresentativo di tutta la Regione.

Nelle aziende selezionate è stato effettuato in contemporanea un prelievo del latte di massa e un prelievo di sangue individuale da tutti i bovini di età superiore a 24 mesi presenti in allevamento. Al momento del sopralluogo in allevamento veniva compilata una scheda nella quale venivano riportati il numero totale di bovini presenti e il numero di vacche in lattazione.

I campioni di latte sono stati esaminati mediante un test ELISA sviluppato e validato dall'IZSLER [2]. I campioni di sangue sono stati esaminati mediante immunodiffusione su gel di agar (AGID), secondo la procedura prevista dal Piano nazionale di eradicazione (DM 358/1996).

### Concordanza

La concordanza tra l'esito della prova sierologica individuale e sul latte di massa è stata valutata mediante il calcolo dell'indice *Kappa* di concordanza [12].

### Specificità

Per il calcolo della specificità del test ELISA sul latte di massa è stata considerata libera da LBE l'azienda già in possesso della qualifica sanitaria di allevamento ufficialmente indenne nella quale tutti i bovini sopra 24 mesi hanno mostrato esito negativo all'AGID.

### Sensibilità

Per il calcolo della sensibilità del test ELISA sul latte di massa è stata considerata infetta da LBE l'azienda nella quale almeno un animale ha dato esito positivo all'AGID.

In considerazione della bassa prevalenza di LBE nella Regione, per facilitare l'ingresso nel campione di aziende infette è stato predisposto un elenco di 95 aziende a rischio perché risultate sede di focolaio nel periodo 1998-2003. Tutte le aziende da latte di tale elenco dovevano essere esaminate.

## RISULTATI

### Aziende e campioni esaminati

Il controllo contemporaneo di latte e sangue ha riguardato complessivamente 492 delle 500 aziende previste inizialmente. In tabella 1 sono riassunti, suddivisi per provincia e classe di consistenza, gli allevamenti esaminati.

Il campione appare rappresentativo della situazione regionale sia per quanto riguarda la distribuzione su territorio regionale delle aziende bovine da latte, sia per quanto riguarda la loro consistenza.

Delle 95 aziende a rischio, 27 non sono state esaminate perché chiuse o senza animali e 24 perché non avevano animali in lattazione (allevamenti da ingrasso, di sole manze o linea vacca-vitello). Delle restanti, 42 aziende sono state sottoposte ad esame; di queste, 41 avevano già acquisito la qualifica di allevamento ufficialmente indenne da LBE, mentre una era ancora sede di focolaio in via di risanamento.

Complessivamente sono stati prelevati ed esaminati 504 campioni di latte e 25.303 campioni di sangue.

Le positività hanno riguardato 2 campioni di latte, prelevati in due diverse aziende e 9 campioni di sangue relativi ad un'unica azienda, già riconosciuta infetta e in risanamento dal 1997.

### Stima dei capi controllati attraverso il prelievo del latte di massa

Il controllo sugli animali in lattazione implica un controllo su una parte dell'allevamento e non su

tabella 1. Distribuzione per Provincia e classe di consistenza (capi presenti) delle aziende bovine da latte esaminate.

PROVINCIA	TOTALE AZIENDE DA LATTE	AZIENDE ESAMINATE PER CLASSE DI CONSISTENZA		
		1-49	50-99	≥100
PIACENZA	70	34	16	20
PARMA	143	68	39	36
REGGIO EMILIA	150	75	38	37
MODENA	99	52	22	25
BOLOGNA	30	16	7	7
TOTALE CAMPIONE	492	245	122	125
EMILIA ROMAGNA	5.696	2.673	1.523	1.500

tutti i capi presenti. In Emilia-Romagna la percentuale di capi controllati mediante il latte di massa varia in funzione della grandezza dell'allevamento da poco più del 60% nelle aziende più piccole a circa il 50% nelle aziende oltre i 100 capi (tabella 2). Se però consideriamo il rapporto tra gli animali in lattazione e quelli di età superiore a 24 mesi, considerati la popolazione bersaglio per la sorveglianza della LBE dalla normativa comunitaria e nazionale (D.Lgs. 196/1999), constatiamo che in media questo rapporto è intorno all'80% per tutte le aziende (tabella 3). Osservando l'andamento della mediana di tale rapporto (figura 1) si può notare che le due popolazioni sono praticamente coincidenti nelle aziende fino a 20 capi, decrescendo fino a valori intorno all'80% nelle aziende superiori ai 50 capi.

#### Concordanza tra il controllo sierologico individuale e l'esame sul latte di massa

L'esito del test ELISA eseguita sul latte di massa è stato confrontato con il giudizio derivante dai risultati dell'AGID eseguita sui campioni ematici individuali; in tabella 4 sono stati riassunti i dati provenienti dall'indagine.

La concordanza complessiva risultata dall'indagine è pari al 0,998 (99,8%). Il *Kappa* che misura la concordanza non dovuta al caso risulta pari a 0,67, valore relativamente basso ma comunque soddisfacente. Ciò è dovuto al fatto che, a causa dell'esiguo numero di aziende infette entrate nell'indagine, i dati non sono distribuiti equamente tra esiti positivi e negativi. Di conseguenza aumenta la concordanza attesa per effetto del caso e diminuisce il valore di *Kappa* [1]. Nel caso della nostra indagine, svolta al termine del piano di eradicazione e in presenza di un unico allevamento da latte infetto da LBE sul territorio regionale, tale situazione era attesa e non controllabile.

#### Specificità della prova sul latte di massa

Uno solo dei 503 campioni prelevati nelle 491 aziende ufficialmente indenni e negative alla pro-

va sierologica individuale è risultato positivo al test ELISA eseguita sul latte di massa. La specificità della prova è pertanto risultata pari al 99,8% (limiti fiduciari 95%: 98,9%-99,99%).

#### Sensibilità della prova sul latte di massa

Nel corso dell'indagine una sola delle aziende esaminate ha avuto capi positivi all'AGID; in questa azienda il test ELISA eseguita sul latte di massa ha dato esito positivo. Si trattava di un'azienda di circa 260 capi, sede di focolaio dal 1997 e in corso di risanamento.

Nella tabella 5 sono riassunti i dati relativi all'azienda positiva. Allo scopo di aumentare gli elementi per una valutazione della sensibilità del test ELISA sul latte di massa, nella medesima tabella, sono riportati i dati relativi alla stessa azienda (Azienda A) e a un'altra azienda infetta (Azienda B) raccolti nel corso di una prova di validazione dello stesso test ELISA svolta durante l'anno precedente.

I dati raccolti non sono sufficienti a permettere una stima della sensibilità del test; deve però essere notato che il test ELISA sul latte di massa ha dato esito positivo anche quando la percentuale di infezione, calcolata sui capi esaminati in AGID, era intorno al 2-5%.

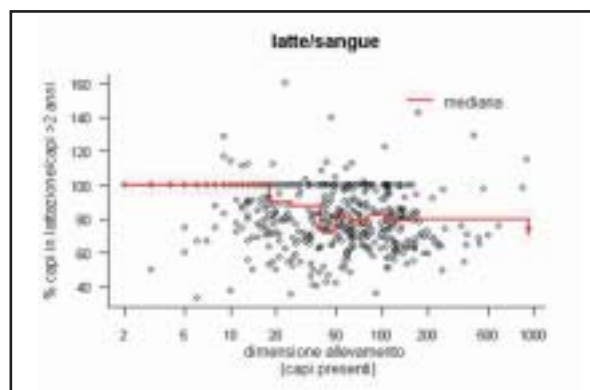


figura 1. Andamento della percentuale di capi in lattazione rispetto ai capi superiori ai 2 anni in funzione della grandezza dell'allevamento.

tabella 2. Percentuale di capi in lattazione rispetto ai capi presenti in azienda.

CLASSE DI CONSISTENZA (N. CAPI)	N. AZIENDE	MEDIA	1 QUARTILE	MEDIANA	III QUARTILE	MIN.	MAX.
1-49	245	63,3%	50,0%	63,6%	76,2%	15,2%	100%
50-99	122	55,2%	45,6%	54,1%	63,3%	23,7%	86,1%
>100	125	50,6%	41,2%	49,4%	58,0%	7,3%	82,7%
TOTALE	492	58,1%	45,1%	55,8%	68,8%	7,3%	100%

tabella 3. Percentuale di capi in lattazione rispetto ai capi superiori a 24 mesi.

CLASSE DI CONSISTENZA (N. CAPI)	N. AZIENDE	MEDIA	1 QUARTILE	MEDIANA	III QUARTILE	MIN.	MAX.
1-49	245	84,8%	72,4%	87,5%	100%	33,3%	160%
50-99	122	79,6%	69,3%	78,1%	91,8%	35,9%	113%
>100	125	78,6%	65,8%	76,9%	91,5%	49,5%	143%
TOTALE	492	82,0%	69,0%	81,2%	100%	33,3%	160%

## DISCUSSIONE

Una delle controindicazioni sulla verifica dello stato sanitario di un allevamento mediante l'esame del latte di massa è dato dal fatto che solo gli animali in lattazione sono controllati e che il contributo al latte di massa di ogni soggetto non è costante (come nei *pool*), ma varia in funzione del periodo di lattazione.

In questi casi può essere opportuno aumentare la frequenza dei controlli sul latte; come già evidenziato per la Brucellosi Bovina, infatti, un sistema di sorveglianza basato su controlli ripetuti sul latte di massa risulta più efficace ed efficiente rispetto al controllo sierologico individuale effettuato con cadenza inferiore [8].

Nel caso della LBE, malattia a lenta evoluzione e con un lungo periodo di eclissi, per il mantenimento della qualifica di allevamento ufficialmente indenne da LBE la normativa comunitaria (Dir. 64/432/CEE) richiede un controllo sierologico con cadenza triennale su tutti i capi di età superiore di 24 mesi. Nella situazione dell'Emilia-Romagna è risultato che la percentuale di capi in lattazione rispetto ai capi di tale età è sempre superiore al 33% e mediamente si aggira intorno all'80% anche nelle aziende più grandi. I controlli sul latte di massa con cadenza annuale sono pertanto sufficienti a garantire che, nel corso del triennio, tutti i capi di età superiore a 24 mesi abbiano subito almeno un controllo sierologico. Tutto ciò con un notevole risparmio di risorse: una popolazione di oltre 25.000 vacche verrebbe controllata attraverso l'esame di 500 campioni di latte di massa.

La specificità della prova ELISA sul latte è risul-

tata superiore al 99%; questo dato concorda con quanto rilevato in analoghe indagini [3]. Il test ELISA sul latte di massa si conferma quindi utile per l'individuazione degli allevamenti indenni [11].

Come in altre indagini svolte in aree a bassa prevalenza di LBE [3], non è stato invece possibile stimare la sensibilità in campo della prova ELISA sul latte di massa. Nei pochi casi considerati, però, il test ELISA ha permesso di rilevare aziende con il 2-5% di sieropositività in AGID; si può quindi supporre che nella realtà dell'Emilia-Romagna, dove la consistenza media degli allevamenti da latte è intorno alle 50 vacche, la rilevazione dell'infezione sarebbe abbastanza precoce. Nella situazione epidemiologica dell'Emilia-Romagna, nella quale oltre il 99,9% degli allevamenti è ufficialmente indenne da LBE, si può presumere che la reinfezione in un allevamento con tale qualifica si possa verificare o attraverso l'introduzione di capi infetti o a causa della mancata individuazione di capi infetti ancora presenti in allevamento. Per quest'ultima ipotesi va evidenziato che nel primo anno di applicazione del piano regionale tutte le aziende da latte a rischio perché infette in passato, anche se già in possesso della qualifica sanitaria, sono state sottoposte ad un doppio controllo latte-sangue con esito favorevole.

Riguardo alle movimentazioni tra allevamenti, infine, va ricordato che il piano regionale di sorveglianza prevede movimentazioni di bovini solo se provenienti da aziende indenni. Gli animali movimentati devono sempre essere sottoposti ad un controllo sierologico entro i 30 giorni precedenti la movimentazione.

Se questi animali provengono da fuori Regione o sono transitati da stalle di sosta devono anche essere sottoposti ad un ulteriore controllo sierologico tra i 15 e i 45 giorni successivi allo spostamento.

Va infine sottolineato che il piano di sorveglianza attuato in Emilia-Romagna nelle aziende da latte è sostanzialmente equivalente a quello applicato dal 1990 in Finlandia, dove ha permesso l'eradicazione dell'infezione nel 1997 e successivamente il mantenimento della qualifica di territorio indenne da LBE [9].

tabella 4. Confronto tra gli esiti della prova eseguita sul latte di massa (ELISA) e della prova sierologica individuale (AGID) nelle aziende esaminate.

		ESITO DEL CONTROLLO SUL SANGUE		TOTALE AZIENDE
		POS.	NEG.	
ESITO DEL CONTROLLO SUL LATTE	POS.	1	1	2
	NEG.	0	490	490
		1	491	492

tabella 5. Dati riepilogativi sui controlli di latte e sangue in due aziende bovine da latte infette da LBE dell'Emilia-Romagna. Periodo 2003-2004.

AZIENDA E DATA PRELIEVO	PRESENTI		TOTALE CAPI				ESITO ELISA LATTE DI MASSA
	>24 MESI	IN LATTAZIONE	ESAMINATI IN AGID	POSITIVI IN AGID	% Pos. AGID		
A 05/11/04	264	182	150	202	9	4,5%	Pos.
A 13/06/03	266	160	125	208	4	1,9%	Pos.
B 02/04/03	28	18	17	25	1	4,0%	Pos.
A 23/01/03	261	156	116	187	18	9,6%	Pos.



## CONCLUSIONI

Dall'analisi dei dati raccolti emerge che l'impiego del test ELISA su latte di massa con cadenza annuale, affiancato al controllo sistematico delle movimentazioni dei bovini da vita superiori a 12 mesi, così come previsto dal piano di sorveglianza regionale, possa permettere alla Regione Emilia-Romagna il mantenimento della qualifica sanitaria di territorio Ufficialmente Indenne da Leucosi Bovina Enzootica con un'efficienza superiore rispetto al controllo sierologico individuale.

## BIBLIOGRAFIA

1. Cicchetti D.V., Feinstein A.R., 1990. High agreement but low kappa: II. Resolving the paradoxes. *J. Clin. Epidemiol.*, 43(6): 551-558.
2. Cordioli P., Brocchi E., Lombardi G., Sacchi C., 1990. Diagnosi sierologica di Leucosi Enzootica Bovina mediante metodica ELISA con anticorpi monoclonali. *Atti S.I.S.Vet.*, 44: 869-872.
3. Eloit M., Lamy F., Glevarec M., Galaup F., Turmel R., Vigouroux A., Benet J.J., Toma B., 1990. Detection of Bovine Leukemia Virus Antibodies in Bulk Tank Milk Using an ELISA Test: Improvement of the Predictive Value of Results by Repeated Testing. *Biologicals*, 18: 19-23.
4. Erb H.N., 1987 Interrelationships among production and clinical disease in dairy cattle: a review. *Can. Vet. J.*, 28: 326-329.
5. Feinstein A.R., Cicchetti D.V., 1990. High agreement but low kappa: I. The problems of two paradoxes. *J. Clin. Epidemiol.*, 43(6): 543-549.
6. Feliziani F., Maresca C., Moriconi L., Cristofori M., Berchi R., 2004. Valutazione dell'impiego di diversi metodi diagnostici in sistemi di sorveglianza per Leucosi Bovina Enzootica attraverso un modello di simulazione matematica. *Argomenti*, 7(4): 40-44.
7. Feliziani F., Maresca C., Avetta M., Ferrarini N., Rutili D., 2005. Evoluzione della Leucosi Bovina in Italia. *L'Osservatorio*, 8(6): 4-8.
8. Giovannini A., Conte A., Petrini A., La Porta L., Nannini D., Caporale V., 2004. Comparison of serological and milk tests for bovine brucellosis using a Monte Carlo simulation model. *Vet. Italiana*, 40(1): 32-43.
9. Nuotio L., Rusanen H., Sihvonon L., Neuvonen E., 2003. Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. *Prev. Vet. Med.*, 59(1): 43-49.
10. Ridge S.E., Galvin J.W., 2005. A comparison of two ELISAs for the detection of antibodies to bovine leucosis virus in bulk-milk. *Aust. Vet. J.*, 83(7): 431-434.
11. Sargeant J.M., Kelton D.F., Martin S.W., Mann E.D., 1997. Evaluation of a bulk-milk ELISA test for the classification of herd-level bovine leukemia virus status. *Prev. Vet. Med.*, 31: 223-230.
12. Thrusfield M., 1985. *Veterinary Epidemiology*. 2nd Edition. Blackwell Science. pp.: 280-282.

## EVALUATION OF A BULK-MILK ELISA TEST FOR THE BOVINE LEUKEMIA VIRUS SURVEILLANCE IN EMILIA-ROMAGNA

**Summary** *The Emilia-Romagna Region is officially free from Enzootic Bovine Leukemia (EBL) since 2003. So a surveillance program based on bulk milk test is been carried out. To evaluate efficacy and efficiency of this kind of control, a sample of 492 dairy herds was controlled both by bulk milk ELISA and AGID performed on serum samples collected from cattle older than 24 months. 504 bulk milk and 25.303 serum samples was collected in the survey. Bulk milk ELISA showed a 99.8% specificity and a sensibility able to detect infected herds with 2-5% prevalence. On average 80% of cattle older than 24 months was milking. Authors think yearly ELISA bulk milk control suitable both to certificate a herd free form EBL and to early detect infected herds.*

**KEY WORDS:** *Enzootic Bovine Leukemia, Bulk Milk, Surveillance, ELISA.*