

Relazione annuale sulla bonifica sanitaria in Lombardia nel 2000  
*di L. Bonfanti*

Considerazioni sulla interpretazione di sieropositività nei confronti del virus  
aftoso  
*di F. De Simone*

Metodi statistici in epidemiologia  
*di M. Tranquillo, G.F. Greppi*

## Relazione annuale sulla bonifica sanitaria in Lombardia nel 2000

L'attività di bonifica sanitaria per l'anno 2000 sul territorio della Regione Lombardia, è stata caratterizzata, oltre che dalla normale attività di controllo, anche dall'attuazione di due piani straordinari. Il primo piano, che prevede un approfondimento diagnostico per i casi di tubercolosi rilevata al macello in fase ispettiva (mod.10/33), è stato attivato a seguito di numerose segnalazioni, alla visita post-mortem, di lesioni tubercolari in assenza di costanti riscontri di positività alla successiva prova intradermica in allevamento. Il supplemento di indagine, che come già prevede la normativa comunitaria, comporta sempre il prelievo al macello degli organi interessati dalle lesioni per il successivo esame istologico e la prova biologica e colturale, ha permesso di evidenziare 10 dei 17 focolai di tubercolosi denunciati. Per l'anno 2000 si è verificata la perdita della qualifica di provincia ufficialmente indenne da tubercolosi per Lodi e Pavia con conseguente revoca della qualifica di territorio ufficialmente indenne per l'intera regione. Il secondo piano straordinario riguarda il controllo della brucellosi bovina con i prelievi del latte di massa in tutte le aziende da produzione. Tale controllo prevede tre prelievi di latte con cadenza trimestrale e nel quarto trimestre il controllo sierologico così come previsto dalla normativa vigente. Questo controllo più frequente è stato attuato con l'intento di prevenire la diffusione della malattia in partenza da focolai primari, in considerazione della rapidità di diffusione della brucellosi e in prospettiva del raggiungimento dei parametri richiesti per l'ottenimento della qualifica comunitaria. Infatti già da quest'anno alcune province della Regione Lombardia potranno presentare la documentazione per l'ottenimento del riconoscimento di territorio ufficialmente indenne da brucellosi ai sensi del D.L.vo 196/99. Passando ad analizzare i dati della bonifica sanitaria, sul territorio regionale quest'anno si è verificato un incremento del numero delle aziende bovine e dei relativi capi. Complessivamente si è passati da 22.802 aziende nel 1999 a 23.177 per l'anno 2000 con un effettivo di 1.757.169 capi (tabella 1). L'aumento del numero delle aziende potrebbe essere collegato non tanto ad un'inversione del trend, che negli ultimi anni ha sempre registrato un calo di attività, ma più probabilmente è collegato all'impegno profuso dai Servizi Veterinari delle AA.SS.LL. per l'attuazione dell'anagrafe bovina che ha permesso di individuare molte più aziende d'ingrasso, e relativi capi presenti, rispetto al passato. Nella tabella 2 sono sintetizzati i dati relativi ai focolai delle malattie infettive oggetto di bonifica sanitaria 2000.

**Tabella 1.** Patrimonio zootecnico lombardo nel 2000

	Allevamenti	Capi
bovini	23.177	1.757.169
bufalini	20	3.778
ovini	3.396	103.007
caprini	4.166	59.189
misti ovicaprini	1.902	-
totale allev. ovicaprini	9.464	162.196

**Tabella 2.** Focolai segnalati sul territorio regionale a seguito di denunce comunicate dai Servizi Veterinari delle AA.SS.LL.

Malattia	Focolai rimasti periodo precedente	Denunce Registrate			Focolai estinti nel periodo
		N.Mod.1	N. capi presenti	N. capi infetti	
Tubercolosi	6	18	2.233	235	14
Brucellosi Bovina Bufalina	2	12	2.303	67	7
Brucellosi Ovina Caprina	0	2	560	3	1
Leucosi Enzootica Bovina	43	27	3.556	68	43

### TUBERCOLOSI BOVINA

#### Consuntivo

Sono stati sottoposti a prova tubercolinica 1.168.861 capi bovini e bufalini per un totale di 16.788 aziende (tabella 3). Il patrimonio bovino censito dalle AA.SS.LL. non risulta interamente controllato per quanto riguarda l'effettuazione delle prove tubercoliniche negli animali da riproduzione in quanto la provincia di Sondrio effettua tali controlli solo ogni due anni. Per tale provincia, considerato che per più di sei anni consecutivi il tasso di infezione nelle aziende bovine è stato inferiore allo 0,1%, quest'anno la Regione Lombardia inoltrerà al Ministero della Sanità la pratica per l'ottenimento della qualifica di territorio ufficialmente indenne da TBC ai sensi della normativa comunitaria.

Oltre alle prove classiche di intradermo-reazione, anche quest'anno è stato utilizzato il test del gamma interferon per la diagnosi della tubercolosi bovina (tabella 4).

**Tabella 3.** Quadro riasuntivo dell'attività di bonifica sanitaria per tubercolosi bovina bufalina nel 2000

	Allevamenti	Capi
Patrimonio controllabile	16.788	1.168.861
Patrimonio controllato nel periodo di riferimento	14.772	1.145.349
Controlli svolti (ingressi/prove)	18.851	1.175.682
Risultati infetti	22	717
Capi infetti abbattuti		689
Allevamenti in cui è stato effettuato abbattimento totale	5	
Capi non infetti abbattuti		439
Segnalazioni di lesioni tubercolosi alla macellazione ordinaria		75
Allevamenti ufficialmente indenni da TBC	16.776	
Allevamenti infetti al 31/12	9	

**Tabella 4.** Province che hanno utilizzato il test del gamma interferon per la diagnosi della tubercolosi bovina

Provincia	Numero conferenti	Campioni	Positivi
Brescia	20	1.855	152
Lodi	18	2.623	256
Bergamo	8	165	48
Milano	3	516	43
Pavia	1	15	14
Varese	1	1	0

#### *Programma 2001*

Per l'anno 2001 l'attività di controllo della tubercolosi dovrà essere intensificata per poter al più presto riottenere la qualifica per quei territori della regione che nel corso del 2000 hanno evidenziato una prevalenza dell'infezione superiore ai valori soglia previsti dal D.M. 592/95.

Pertanto si continuerà ad applicare il piano straordinario già in vigore per l'anno 2000 per i casi di tubercolosi evidenziati al macello in sede ispettiva.

Si intensificheranno i controlli delle movimentazioni animali che risultano spesso la causa della diffusione delle malattie infettive.

Inoltre la scrivente U.O. Veterinaria, in collaborazione con l'O.E.V.R., l'Istituto Zooprofilattico di Brescia e i Servizi Veterinari delle AA.SS.LL., predisporrà un piano straordinario di controllo per la TBC negli allevamenti.

In considerazione della necessità di eradicare la malattia, si torna a ribadire la scelta dell'abbattimento totale degli animali presenti nelle aziende sedi di focolai.

#### **BRC BOVINA**

##### *Consuntivo*

Le prove diagnostiche sono state effettuate sul totale degli allevamenti da riproduzione e sul relativo

patrimonio bovino e bufalino sopra i dodici mesi di età per un totale di 16.403 aziende e 907.476 capi (tabella5). I dati relativi all'attività svolta nell'ambito del piano straordinario di controllo della BRC bovina sono riportati nella tabella 6, si precisa che nei casi di positività confermata, il Servizio Veterinario delle ASL ha provveduto alla rapida esecuzione di sopralluoghi in azienda ed al prelievo di campioni di sangue e latte dai singoli capi per l'individuazione dei soggetti positivi.

Anche per i focolai di brucellosi come per la tubercolosi nella quasi totalità dei casi si sono applicate misure di abbattimento totale dei capi presenti negli allevamenti infetti.

Viste la documentazione inoltrata da parte dei Servizi Veterinari delle AA.SS.LL., la Regione Lombardia inoltrerà al Ministero della Sanità le pratiche per l'ottenimento della qualifica di territorio ufficialmente indenne da brucellosi bovina ai sensi del D.L.vo 196/99 per le province di Sondrio, Como, Varese e Brescia. Questo porterà ad effettuare con cadenza quadriennale i controlli sierologici per la brucellosi e permetterà la libera circolazione degli animali sul territorio comunitario.

#### *Programma 2001*

Per l'anno 2001 si proseguirà nell'attuazione del piano straordinario di controllo con l'obiettivo di perseguire anche per le altre province presenti sul territorio regionale l'ottenimento della qualifica comunitaria.

Verranno pertanto effettuati tre prelievi, con cadenza trimestrale, sul latte di massa di tutte le aziende da produzione presenti sul territorio, al quarto controllo verrà effettuata la prova sierologica.

**Tabella 5.** Quadro riassuntivo dell'attività di bonifica sanitaria per brucellosi bovina nel 2000

	Allevamenti	Capi
Patrimonio controllabile	16.403	907.476
Patrimonio controllato nel periodo di riferimento	16.403	907.476
Controlli svolti (ingressi/prove)	26.284	954.784
Risultati infetti	13	83
Capi infetti abbattuti		242
Vaccinati		0
Allevamenti in cui è stato effettuato abbattimento totale	3	
Capi non infetti abbattuti		220
Allevamenti ufficialmente indenni da BRC	16.396	
Allevamenti indenni da BRC	0	
Allevamenti infetti al 31/12	4	

**Tabella 6.** Campioni di latte di massa aziendale prelevati trimestralmente

Anno 2000	Ring Test (prova dell'anello)			
	Eseguiti	Positivi	Dubbi	Negativi
Campioni pervenuti 10.810	10.760	39	297	10.381
	ELISA (Kit pronto uso del commercio + kit prod. interna)			
	Eseguiti	Positivi	Dubbi	Negativi
	9.765	7	4	9.754

## **LEUCOSI BOVINA**

### *Consuntivo*

Per quanto riguarda la LEB, nel corso dell'anno 2000 sono state sottoposte a controllo sierologico 16.403 aziende per un totale di 907.476 capi (tabella 7). I dati relativi alla leucosi bovina non appaiono così confortanti come per la brucellosi, anche se nel corso degli ultimi anni si è manifestato una tendenza favorevole per quanto riguarda il numero dei focolai denunciati sul territorio.

Infatti si è passati dai 302 focolai denunciati nel 1996 ai 42 dell'anno 2000 pari allo 0,25% delle aziende presenti. Di conseguenza si ritiene, per quanto riguarda la LEB che l'opportunità di procedere agli

abbattimenti totali dovrà essere valutata caso per caso. La distribuzione dei focolai di LEB è particolarmente variabile sul territorio della Regione Lombardia tanto che quest'anno per Brescia sarà possibile inoltrare la richiesta di attribuzione della qualifica di provincia indenne da leucosi bovina ai sensi del D.M. 2 maggio 1996, n.358. Per le province di Lecco, Sondrio, Como e Varese la Regione Lombardia inoltrerà al Ministero della Sanità le pratiche per l'ottenimento della qualifica di territorio ufficialmente indenne da leucosi bovina ai sensi del D.L.vo 196/99.

#### *Programma 2001*

Per l'anno 2001 l'impegno dei Servizi Veterinari dovrà essere indirizzato verso un controllo più efficace della malattia e alla salvaguardia degli allevamenti indenni con un maggior controllo sulle movimentazioni degli animali. Oltre a ciò per l'anno 2001 l'obiettivo è di poter utilizzare la metodica del controllo del latte di massa come supplemento d'indagine, nelle aziende bovine da produzione per poter effettuare un controllo più efficace della malattia e permetterne così la definitiva eradicazione.

A tal proposito si ritiene opportuno fornire i dati pervenuti dall'I.Z.S. di Brescia delle analisi effettuate sugli stessi campioni prelevati per la prova del ring test (tabella 8).

Per una completa valutazione delle potenzialità del test risulta necessario disporre di allevamenti positivi soprattutto per verificare la sensibilità del kit ed in particolare il numero di capi positivi minimo necessario per essere individuato sulla massa di latte dell'intero allevamento.

**Tabella 7.** Quadro riassuntivo dell'attività di bonifica sanitaria per leucosi bovina bufalina nel 2000

	<b>Allevamenti</b>	<b>Capi</b>
Patrimonio controllabile	16.403	907.476
Patrimonio controllato nel periodo di riferimento	16.403	907.476
Controlli svolti (ingressi/prove)	24.818	949.062
Risultati infetti	42	124
Capi infetti abbattuti		173
Allevamenti in cui è stato effettuato abbattimento totale	2	
Capi non infetti abbattuti		130
Allevamenti indenni da LEB	16.365	
Allevamenti infetti al 31/12	19	

**Tabella 8.** Test sperimentale di utilizzo di un Kit pronto uso del commercio su campioni di latte di massa da allevamenti casualmente selezionati tra quelli pervenuti (eseguito presso il rep. Virologia Specializzata dell'IZS di BS)

<b>Anno 2000</b>	<b>Leucosi Bovina Enzootica (Kit ELISA pronto uso del commercio)</b>		
	Positivi	Dubbi	Negativi
Eseguiti			
8.018	0	1	8.017

## **BRC OVI-CAPRINA**

### *Consuntivo*

Il patrimonio controllabile è stato per intero sottoposto ad indagine sierologica per quanto riguarda la brucellosi ovicaprina.

Le aziende testate sono state 9.463 per un totale di 151.482 capi (tabella 9). Anche quest'anno è stato effettuato il doppio controllo sierologico, prima e dopo la monticazione, su tutti gli animali di allevamenti che hanno praticato l'alpeggio. Grazie all'impegno dei colleghi operanti sul territorio è stato possibile mantenere un efficace controllo delle greggi vaganti che anche per l'anno 2000 non hanno evidenziato alcun caso di brucellosi negli animali che si muovono, per motivi di pascolo, sul territorio della Regione Lombardia. Solo due allevamenti stanziali sono risultati positivi alla prova della brucellosi; pertanto anche per l'anno 2000 la situazione epidemiologica appare favorevole.

### Programma 2001

Per poter proseguire nel mantenimento del livello sanitario raggiunto negli anni deve essere costantemente tenuto controllo attento ed accurato sugli allevamenti e sulle movimentazioni.

A tal proposito si rammenta che è in corso la predisposizione del programma di controllo delle movimentazioni degli animali previsto dal decreto 2 gennaio 2001 che prevede l'obbligo dell'anagrafica per gli allevamenti ovicaprini che si spostano sul territorio della regione per motivi di alpeggio e pascolo vagante.

L'attivazione del programma da parte dei Servizi Veterinari delle AA.SS.LL. risulterà uno strumento importante per il monitoraggio delle greggi e il controllo delle movimentazioni degli animali sul territorio regionale.

Si ringraziano tutti coloro che anche per quest'anno, con la loro collaborazione, hanno permesso l'attuazione dei piani di bonifica che, sebbene negli ultimi tempi altri tipi di emergenze possano averli fatti apparire desueti, rappresentano sempre un momento fondamentale di controllo della sanità animale e, di riflesso, il fondamentale strumento di prevenzione delle malattie all'uomo.

**Tabella 9.** Quadro riassuntivo dell'attività di bonifica sanitaria per brucellosi ovicaprina nel 2000

	Allevamenti	Capi
Patrimonio controllabile	9.463	151.482
patrimonio controllato nel periodo di riferimento	9.463	151.482
Controlli svolti (ingressi/prove)	9.768	177.277
Risultati infetti	2	3
Capi infetti abbattuti		3
Vaccinati		0
Allevamenti in cui è stato effettuato abbattimento totale	0	
Capi non infetti abbattuti		
Allevamenti ufficialmente indenni da BRC	9.427	
Allevamenti indenni da BRC	0	
Allevamenti infetti al 31/12	1	

## Considerazioni sulla interpretazione di sieropositività nei confronti del virus aftoso

In Italia, storicamente (fino al 1991) e tradizionalmente, i controlli sierologici per afta concernevano l'accertamento della presenza e del titolo d'anticorpi per verificare l'avvenuta vaccinazione

In seguito, tranne l'episodio aftoso del 1993, la sierologia ha avuto un ruolo marginale tranne riassumere eccezionale importanza negli ultimi mesi.

Le modalità in sierologia dell'afta derivano da due "bibbie":

- il "Manual of Standards for Diagnostic tests and vaccines" dell'OIE;
- l'attività di Commissioni e la vigente Legislazione Comunitaria.

Da sempre le regole sono dettate da scienziati del Laboratorio Mondiale di Referenza (WRL) di Pirbright (UK), che hanno avuto una larga parte nell'orientare e decidere il pensiero scientifico in materia.

Nell'ultimo ventennio il WRL ha eseguito notevoli sforzi per standardizzare la diagnostica (specialmente la sierologia, non solo dell'afta ma anche della MVS) tramite un piano collaborativo tra WRL e FAO cui hanno partecipato i più importanti laboratori di Referenza Europei e stranieri.

Circa un ventennio orsono la prova sierologica fondamentale era costituita dalla Sieroneutralizzazione (SN), consistente nel verificare se il siero in esame inibisce o no una vera e propria micro-infezione "in vitro" (sistema di virus infettante e cellule sensibili). Questa reazione è ancora molto reputata però essa soffre d'incapacità di distinguere tra anticorpi da vaccinazione, da infezione o da sostanze neutralizzanti non anticorpali (aspecificità che causano falsa positività).

In seguito è stata introdotta l'ELISA che, pur soffrendo degli stessi difetti della SN, possiede vantaggi di praticità, costo, automazione ecc. molto superiori alla SN e pertanto universalmente utilizzata. Essa è realizzabile in una vasta serie di varianti tecniche che la hanno portata, per ogni laboratorio, a frammentarsi in una miriade di differenti arrangiamenti.

Il primo tentativo di standardizzazione sierologica con "formula a monotipia" (che prevedeva l'impiego di reagenti, l'applicazione di metodi, la valutazione dei risultati ecc. assolutamente identici per tutti i laboratori), ha dimostrato che era impossibile incanalare la variabilità inter-laboratori entro limiti accettabili.

In seguito, la diversificazione metodologica creatasi con l'introduzione dell'ELISA, ha portato all'adozione di una "formula a restrizione" in cui ogni laboratorio può usare i metodi che preferisce purché calibrati su due standard fondamentali:

- il Siero di Referenza debole Positivo, che determina la soglia minima di positività della reazione ma che deve risultare sempre positivo (quindi un positivo 100% e non un positivo nella metà dei test eseguiti, ossia 50%), e

- il Siero di Referenza Positivo che deve risultare positivo in un certo range prestabilito di reattività (ovviamente più elevato del precedente).

Qualsiasi metodo si utilizzi per esaminare sieri animali (specialmente quelli dei ruminanti) per anticorpi antiaftosi, rivelerà che, un certo numero di questi che devono essere a considerati negativi per storia ed assenza di contatti con virus infettante o vaccino antiaftoso, reagirà a titolo da considerare basso, paragonabile al range "soglia" del Siero di Referenza debole Positivo.

D'altro canto, se si procede sperimentalmente a vaccinare o infettare con afta animali del tutto negativi per storia e per sierologia, si noterà che un certo numero di animali sierconvertirà con titoli molto bassi, estremamente vicini a detta "soglia".

Se s'innalza la soglia è possibile la perdita di veri sieropositivi e se la si abbassa si provoca un aumento insostenibile di bassi titoli falso positivi: questo avviene per tutti i metodi sierologici ma, nella sierologia dell'afta e nei ruminanti, esiste un notevole "overlap" tra sierologia positiva specifica e quella aspecifica.

Il disturbo provocato dalla naturale e aspecifica tendenza dei sieri di ruminanti a reagire con gli antigeni aftosi e che causa questa "fastidiosità" sierologica, costituisce un elemento abbastanza trascurabile in tempi e circostanze non sospetti es. lo scambio di animali in ambito Comunitario ed assenza di afta da tutto il territorio U.E.

In tempi non sospetti cade anche l'ipotesi che i titoli che si osservano possano essere causati da vaccinazione, che ovviamente non ha senso praticare.

Il contrario avviene in caso di segnalazione di focolai che, per quante misure siano adottate, dimostrano una capacità di diffusione preoccupante.

Anche l'ipotesi di uso illegale di vaccini ritorna nella massima considerazione: in Italia questo avvenne nel 1993 quando si ritrovarono, in allevamenti bufalini, contenitori di vaccino antiaftoso di tipo "O" prodotto in Romania.

In tempi di epidemia nessun titolo, per quanto verosimilmente aspecifico, può essere ignorato. Il reperimento

di titoli ELISA vicini al titolo soglia, potrebbe corrispondere all'esordio della malattia, ossia il passaggio da status sieronegativo a sieropositivo. Se il titolo non subisce variazioni di rilievo e permane debole si potrebbe trattare di un "carrier".

Abitualmente questi primi risultati "dubbi", sono seguiti dall'impiego di altre prove sierologiche e da altri prelievi. Raramente essi sono chiariti da altre prove sierologiche o da altri prelievi (tutte le prove sierologiche sono soggette al fenomeno di reattività aspecifica e perciò raramente risolvono il problema): non si può escludere in modo assolutamente certo che gli animali con sierologia "fastidiosa" non siano "carrier", con l'indesiderabile potenzialità di un'imprevedibile riattivazione ad azione infettiva.

Alla fine di tutti gli esami e ri-prelievi di animali con siero presentante titoli deboli non si chiarisce in genere quasi nulla sulla potenziale natura di "carrier", con tutte le implicazioni delle difficoltà che si incontrerebbero per l'abbattimento dei numerosi animali che dovrebbero essere giudicati "carrier" per i deboli titoli riscontrabili e non ulteriormente chiaribili. La "fastidiosità", considerata nel modo più severo, condurrebbe ad una "falcidiosità" chiaramente insostenibile perché basata sull'assunto (solo teorico) che, ad ogni debole reattività, corrisponda un "carrier" (in seguito si considererà questo status alla luce del nuovo test ELISA 3 ABC).

I fatti di cui sopra partono sempre dalla considerazione che la sierologia sia eseguita su animali malati di afta che, per qualche motivo, non appaiono in alcun modo "malati". Non si tiene in considerazione che, in caso di malattia, come nella maggior parte dei casi, questa sarebbe evidente e la comparsa dei sintomi fugherebbe tutti i dubbi: però è noto che gli ovini possono ammalarsi senza sintomi, che i bovini possono diventare "carrier"; i suini, sotto questo aspetto, sarebbero i più sinceri ma anche i più pericolosi poiché emettono quantità enormi di virus nell'ambiente rispetto alle altre specie; pertanto è impossibile non considerare i segnali della sierologia, pur consci che, nella stragrande maggioranza dei casi, siamo di fronte a reazioni aspecifiche.

**Dobbiamo assumere un comportamento che ci permetta di abbassare il rischio al minimo, utilizzando criteri di sierologia sostenibili per ottenere un ragionevole grado di sicurezza.**

Consideriamo quattro fatti.

Il **primo** fatto risiede nella constatazione che, se pur esistono evidenze di malattia aftosa non sorretta dalla comparsa di chiara sintomatologia (ovicapriini), non altrettanto vale per il sistema immune in cui la comparsa di anticorpi specifici in caso d'infezione aftosa è un fatto pressoché certo.

La sieroconversione di animali infettati (anche se non presentanti segni clinici), è stata sempre ben rilevata nella sua tipica insorgenza temporale (da 2 a 4 giorni post-infezione) e nella veloce e sostanziosa ascesa del titolo.

Il **secondo** fatto, che è la vera novità ed il perno per quanto si propone, risiede nella ormai collaudata reazione ELISA 3 ABC, ossia una reazione ELISA in grado di identificare gli anticorpi che si formano nell'animale quando si attua un'infezione attiva da virus aftoso. Le proteine virali utilizzate per assemblare il virioni ma non facenti parte del virione o proteine non strutturali (NSP utilizzata = 3 ABC) sono immunogene ed inducono la formazione di specifici anticorpi. Quando questi sono evidenziati significa che l'animale ha sviluppato un'infezione attiva verso il virus; l'animale solo vaccinato (anticorpi verso le proteine di struttura = SP) e quello con titoli aspecifici non presenteranno questi anticorpi. Gli anticorpi anti NSP, in caso di infezione, compaiono in ritardo rispetto quelli anti-SP; il ritardo varia da 1-2 fino ad un massimo di 7 giorni, arrotondati a 10 per sicurezza.

Il **terzo** fatto è, che dal punto di vista della identificazione di "carrier", le NSP li evidenziano solo in parte. In letteratura questi sono descritti come bovini in grado di avere periodicamente e secondo lunghi intervalli temporali, delle "poussé" infettive per virus cripticamente albergato nel tessuto oro-faringeo e, come detto, periodicamente escreto infettando i malcapitati vicini. Però, in numerosissimi esami fatti nell'arco di decenni, non abbiamo mai trovato (coltura di tessuto) animali di questo tipo. Prove specifiche su bovini infetti (Albania 1996), con pro-bang (prelievo di liquido O.F.) a 2 anni post-malattia, erano tutti negativi per isolamento su Coltura di tessuto ed anche con ricerca genomica (PCR). Fatti che inducono a ritenere molto raro il fenomeno ed instaurabile in un arco di tempo piuttosto lungo, non a breve distanza temporale dal fatto infettivo come invece i circa 3 mesi da quando questa epidemia è in corso. Comunque, per evidenziare questi "ipotetici" portatori, necessiterebbero esami virologici sofisticati comunque non eseguibili su scala (sarebbe necessario esaminarli tutti).

Il **quarto** fatto è che, sebbene gli anticorpi non strutturali (NSP) fanno parte di una categoria di anticorpi differenti da quelli SP, protagonisti della sierologia aftosa classica, come in tutti i metodi sierologici esistono rare ma innegabili reazioni falso- positive e falso-negative. Queste ultime costituiscono la più sostanziosa critica al metodo, ossia la non affidabilità in caso di esame di sieri singoli. Mentre le reazioni falso-positive (inferiori all'1%), sono facilmente accertabili (ricordano per certi versi i "singleton" della MVS), quelle falso-negative possono essere accertate tramite segnali (es. il titolo strutturale SP aumenta al ri-prelievo mentre l'NSP rimane negativo) e/o evitate tramite cautele, es. il ri-prelievo eseguito su un "gruppo" di animali rimasti in contatto con quello di cui si sta accertando lo stato. Si attua un ri-prelievo dal gruppo attorno all'animale sospetto evitando così un giudizio relativo ad un animale singolo; questo vale anche per fugare, anche se solo per quel periodo, che l'animale con basso titolo SP che permane immutato sia un "carrier". La logica del prelievo e del ri-prelievo, poggia a sua volta su numeri statisticamente significativi.

Considerando i seguenti punti:

- 1) campionatura statisticamente sufficiente (5% prevalenza attesa, 95% di intervallo di confidenza);
  - 2) dinamica della produzione di anticorpi anti-proteine virali strutturali (SP);
  - 3) dinamica della produzione di anticorpi anti-proteine virali non strutturali (NSP);
  - 4) intervallo di tempo tra il primo prelievo ed il ri-prelievo di 10 giorni;
- riusciamo ad impostare una sierologia efficace.

Il rischio residuo è che, un animale a basso titolo SP con NSP negative, ri-prelevato, presentante lo stesso quadro, sia un "carrier" e non un aspecifico. Una volta passato dal vaglio dell'esame sierologico, l'animale potrebbe infettare altri animali in un momento indeterminabile della sua vita.

Per i motivi sopra esposti questo è un rischio minimo ma che bisogna correre, comunque non risolvibile per i motivi esposti in precedenza. Per non correre questo rischio sarebbe necessario abbattere tutti gli animali con sierologia "fastidiosa".

Lo scopo dello schema d'esame proposto (figura 1) è fatto per chiarire i deboli titoli (aspecificità) senza voler tener conto di tutte le altre possibili situazioni (che inesorabilmente appariranno) e che verranno di volta in volta decise in accordo tra le Autorità Sanitarie Veterinarie ed il CERVES.

Lo schema si basa su esame sierologico ELISA screening (SP) ed ELISA 3 ABC (NSP).

Il numero dei sieri da sottoporre ad esame dovrebbe corrispondere a un campionamento in grado di rilevare una prevalenza di sieropositività  $\geq 5\%$  con un intervallo di confidenza del 95% (max. 60 sieri). Questo numero deriva da una raccomandazione (Meeting degli Esperti di Laboratorio su Diagnosi di FMD, Bruxelles, 26 Marzo 2001) che ben si adatta (come raccomandazione) alla necessità di eseguire l'esame per NSP non su un singolo animale ma, possibilmente, anche su animali in contatto con questo (che ci mette al riparo da eventuali reazioni NSP falso-negative e da un possibile, però solo per quel momento, "carrier"), oltre ad ottemperare ad una corretta campionatura.

- Se SP è negativo: fine dell'esame

- Se positivo: ossia è riscontrata debole reattività SP (con titolo inferiore a 1/100 ma che potrebbe essere anche più alto, es. in caso di vaccinazione), ma con NSP negativo, si attua il ri-prelievo per tutti i sieri, 10 gg. dopo.

Esito del ri-prelievo:

- se fornisce titolo invariato rispetto ai precedenti (SP sotto 1/100 e NSP negativo), l'esame è concluso;

- se la situazione presenta variazioni rispetto al primo risultato si stabilisce, caso per caso, cosa fare (infezione in atto?, altro?), contando su una scala di cautele, precauzioni, approfondimenti.

Possibili livelli di approfondimento dei risultati potrebbero essere effettuati sia in laboratorio sia sul campo.

A livello di laboratorio eseguendo:

- esami sierologici dei sieri con differenti sottotipi di tipo O;

- esami sierologici con differenti tipi (es. A e C, altri...);

- esami con reazioni differenti (e.g.. Sieroneutralizzazione);

- estensione degli esami sierologici ad altri soggetti;

- estensione dell'esame alla Virologia, ovviamente alle lesioni tipiche (vescicolari se presenti) oppure al liquido oro-faringeo\* (animale in vita), tonsille (animale sacrificato).

\* Sperimentalmente il virus raggiunge rapidamente questi organi (anche se inoculato a distanza) oltre alla

superficie dorsale del palato molle, pareti del faringe, tonsille. Il liquido oro-faringeo non è visto in questo caso come materiale per la ricerca dei "carrier" in senso tradizionale ma come materiale in cui, in caso di infezione, è possibile reperire il virus più a lungo che non nelle lesioni della bocca e dei piedi.

Sul campo, garantendo:

- la precisa identificazione e prelievo corretto degli animali a stretto contatto fisico con quello che ha presentato la reazione;
- la certezza di ri-prelievo degli stessi soggetti;
- particolare attenzione alla comparsa di pur deboli segni clinici.

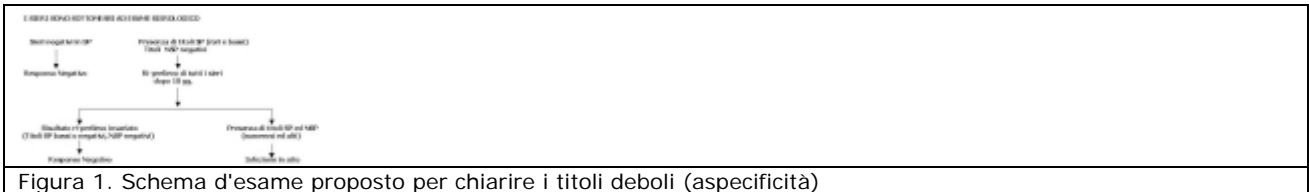


Figura 1. Schema d'esame proposto per chiarire i titoli deboli (aspecificità)

## Metodi statistici in epidemiologia

### Le misure epidemiologiche (1)

L'epidemiologia moderna è una scienza quantitativa, in quanto si prefigge tra i suoi obiettivi la misura della frequenza delle malattie nella popolazione ( misure di prevalenza e incidenza) e la misura dell'associazione tra l'evento malattia e uno o più fattori di rischio ( Rischio Relativo, Odds Ratio). Per perseguire tali obiettivi l'epidemiologia deve avvalersi necessariamente delle metodologie statistiche per tre ordini di motivi:

1. controllare la variabilità "biologica" del fenomeno sotto studio
2. controllare gli effetti di confondimento esercitato da una o più variabili, sulla stima dei parametri di frequenza o di associazione
3. esplorare la presenza di interazioni tra variabili

Aggiungiamo che la statistica, in particolare la teoria della probabilità, è fondamentale nella determinazione del numero di osservazioni, quindi della dimensione del campione, necessario per le stime di prevalenza e incidenza o per la conduzione di uno studio epidemiologico sia esso osservazionale ( studio caso-controllo; di coorte; ecc.) sia clinico ( studi clinici).

La raccolta delle informazioni sia riguardanti l'evento ( malattia) sia l'esposizione a fattori di rischio viene effettuata implementando le diverse metodologie di studio epidemiologico : studi trasversali o di prevalenza, studi caso-controllo e studi d'incidenza o di coorte. Per quanto possa sembrare a prima vista riduttivo non è lontano dalla realtà affermare che le diverse metodologie statistiche che si applicano in epidemiologia ruotano intorno ad un'organizzazione dei dati nota a tutti come tabella di contingenza o tabella 2x2.

<b>Malattia</b>		
<b>Esposizione al fattore di Rischio</b>	<b>Presente</b>	<b>Assente</b>
<b>Esposto</b>	<b>a</b>	<b>b</b>
<b>Non esposto</b>	<b>c</b>	<b>d</b>

Negli studi trasversali è possibile calcolare la Prevalenza della Malattia sia tra i soggetti esposti ( $P_{\text{esposti}} = a/a+b$ ) e tra i soggetti non esposti ( $P_{\text{non esposti}} = c/c+d$ )

La misura di associazione in questo tipo di studio è il Rapporto di prevalenza che altro non è che il rapporto tra la  $P_{\text{esposti}}$  /  $P_{\text{non esposti}}$ . Non è corretto in questo tipo di studio l'uso dell'OR ( da usare esclusivamente negli studi caso controllo). Si otterrebbe l'effetto di sovrastimare l'importanza del fattore di rischio indagato. Ad esempio, supponiamo di volere utilizzare di dati delle indagini epidemiologiche condotte nel 1997 negli allevamenti suini coinvolti nel piano di monitoraggio dell'Aujeszky e di voler studiare l'importanza del fattore di rischio "Tipologia dell'allevamento". Utilizzando i dati raccolti e organizzandoli in una tabella 2x2 avremo:

<b>Sierologia Aujeszky</b>		
<b>Esposizione al fattore di Rischio</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>
<b>Esposto</b>	<b>425</b>	<b>43</b>
<b>Non esposto</b>	<b>356</b>	<b>146</b>

Questo è un tipico studio trasversale da cui si ricavano le seguenti misure di frequenza

Prevalenza allevamenti a ciclo aperto =  $356/356+146 = 70.9$  allevamenti positivi per 100 allevamenti controllati

Prevalenza allevamenti a ciclo chiuso =  $425/425+43 = 90.8$  allevamenti positivi per 100 allevamenti controllati

Il Rapporto di prevalenza è pari a :  $P(\text{all ciclo chiuso})/P(\text{all ciclo aperto}) = 90,8/70,9 = 1,28$  . La prevalenza di allevamenti Aujeszky positivi negli allevamenti a ciclo chiuso è 1,28 volte superiore a quella che si riscontra negli allevamenti a ciclo aperto.

Utilizzando come misura di associazione l'Odds Ratio ( che si calcola semplicemente rapportando il prodotto  $axd$  al prodotto  $bxc$ ) darebbe il seguente risultato:

OR ciclo chiuso vs ciclo aperto =  $425*146/356*43=4,05$

Da cui deriva che il rischio di sieropositività negli allevamenti a ciclo chiuso è 4 volte superiore a quello degli allevamenti a ciclo aperto, sovrastimando quindi il rischio indicato dal rapporto di prevalenza.

Questa sovrastima è tanto più elevata quanto più elevata è la prevalenza della malattia oggetto dell'indagine, l'odds ratio infatti è un indicatore da usare solo in condizioni particolari come quelle che si riscontrano negli studi caso-controllo.

Da uno studio trasversale si ricava la Prevalenza della malattia semplicemente applicando la formula  $a+c$  (numero di soggetti ammalati)/ $a+b+c+d$  (popolazione osservata).