

Inaffidabilità di un test rapido per la valutazione della protezione anticorpale verso i vaccini core del cane e del gatto



Introduzione. Le attuali linee guida per la corretta vaccinazione del cane e del gatto raccomandano la somministrazione delle vaccinazioni *core* con vaccini vivi attenuati (MLV) a tutti i cani e a tutti i gatti con una cadenza generalmente triennale, ma molti sono i fattori che possono incidere sul successo di una vaccinazione: testare quindi la protezione vaccinale titolando gli anticorpi specifici è sicuramente una pratica migliore del richiamo vaccinale di routine effettuato alla cieca.

Scopo del lavoro. Lo scopo di questo studio è stato quello di analizzare T-Check®, un test *in-clinics* in commercio in Italia per la determinazione della protezione del cane e del gatto verso le malattie prevenibili mediante vaccinazioni *core*.

Materiali e metodi. Sono state eseguite diverse prove di validazione (prova quantità, tempo lettura, tempo dal prelievo, intertest) per confermare l'attendibilità dei risultati ottenuti, che sono poi stati confrontati con quelli di un altro test *in-clinics* di riferimento (VacciCheck) considerato il gold standard dei test rapidi.

Risultati. Il test ha restituito in ogni prova risultati discordanti tra loro e con quelli del VacciCheck, in quest'ultimo caso con una percentuale di concordanza nulla o modesta per tutte le malattie considerate. Inoltre, il test utilizza una soglia di positività molto alta (peraltro non riportata sulle istruzioni del kit) per cui risultano non protetti cani e gatti che invece lo sono con tutti gli altri test disponibili.

Discussione. A fronte dei risultati ottenuti dal nostro studio relativi all'affidabilità del T-Check® in entrambe le sue versioni cane e gatto, se ne sconsiglia l'utilizzo nella pratica veterinaria.

Paola Dall'Ara^{1*},
Med Vet PhD,
DIVAS

Camilla Vitali²,
Med Vet

Cecilia Lasagna²,
Med Vet

¹ Professore associato, Medico Veterinario, Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali (DIVAS), Università degli Studi di Milano

² Medico Veterinario libero professionista, Milano

*Corresponding Author (paola.dallara@unimi.it)

Ricevuto: 22/03/2022 - Accettato: 24/05/2022

INTRODUZIONE

Le attuali linee guida per la corretta vaccinazione del cane e del gatto pubblicate dalla WSAVA¹ e sostenute da molte altre associazioni veterinarie (AAHA², ABCD³, AAFP⁴) raccomandano la somministrazione delle vaccinazioni *core* a tutti i cani e a tutti i gatti con una cadenza generalmente triennale una volta completata la prima serie vaccinale dei cuccioli e dei gattini e aver eseguito il richiamo annuale. Tuttavia, nella quasi totalità dei casi queste vaccinazioni vengono eseguite con vaccini vivi attenuati (*Modified Live Vaccines*, MLV) che, proprio per le loro caratteristiche intrinseche, sono in grado di conferire una protezione di durata anche maggiore, come dimostrato da numerosi studi⁵⁻¹¹.

La vaccinazione subisce l'influenza di diversi fattori (legati al vaccino utilizzato, all'animale immunizzato o al patogeno responsabile) e non sempre funziona come dovrebbe.

Allo stesso tempo, però, molti sono i fattori legati al vaccino (Box 1), all'animale (Box 2) o al patogeno (Box 3) che possono incidere sul successo di una vaccinazione (Tabella 1), e di conseguenza anche un soggetto vaccinato può non risultare correttamente protetto. Le vaccinazioni, infatti, non sono mai efficaci al 100% e, anche quando somministrati correttamente, i vaccini non inducono la stessa efficace immunità in tutti gli animali che li ricevono. Poiché l'immunità è influenzata da diversi fattori, il *range* della risposta anticorpale in una grande popolazione casuale di animali segue una distribuzione normale: questo significa che la maggior parte degli animali risponderà alla vaccinazione mostrando una risposta anticorpale adeguata, qualcuno avrà una risposta eccellente e qualcun altro scarsa, rimanendo quindi privo di protezione nonostante la vaccinazione^{6,12}.

BOX 1

Cause di insuccesso vaccinale legate al vaccino

Alcuni dei casi di insuccesso vaccinale possono essere il risultato di una scorretta manipolazione del vaccino: un vaccino vivo potrebbe infatti inattivarsi per una impropria conservazione o per la disinfezione del sito di inoculo prima dell'iniezione, oppure ancora per il ricorso a una dose inferiore a quella raccomandata⁶. Inoltre, tutti i vaccini devono essere mantenuti a una temperatura refrigerata (2-8 °C, ottimale 5 °C) dal momento della produzione a poco prima del loro utilizzo negli ambulatori veterinari, non interrompendo mai la cosiddetta "catena del freddo", pena una possibile perdita di efficacia^{6,12,18}.

BOX 2

Cause di insuccesso vaccinale legate all'animale

Per il buon successo di una vaccinazione gioca un ruolo chiave l'età al momento del primo ciclo di vaccinazioni del cucciolo e del gattino. In questi animali, infatti, il trasferimento degli **anticorpi di derivazione materna** (*Maternally-Derived Antibodies*, MDA) può essere considerato un'arma a doppio taglio: da un lato, infatti, questi sono essenziali per la loro sopravvivenza, e senza di essi i neonati andrebbero rapidamente incontro a infezioni spesso letali; dall'altro, però, la presenza di elevate concentrazioni di MDA inibisce lo sviluppo di una risposta immunitaria attiva (come quella conseguente a vaccinazione) fino a quando la loro quantità non scende a un livello sufficiente da permettere una corretta stimolazione immunitaria. Il tasso di crescita corporea contribuisce alla velocità di degradazione dell'immunità materna: i cuccioli di grossa taglia eliminano gli MDA più velocemente rispetto ai cuccioli di taglia piccola⁶.

Nei soggetti adulti possono invece influire negativamente sull'efficienza vaccinale stati di **immunodepressione** (immunodeficienze primarie o secondarie), **malnutrizione** (obesità o denutrizione), **stress** o **condizioni patologiche croniche**, ma anche l'**età avanzata**. Vi sono infine dei soggetti cosiddetti **non-responder** congenitamente incapaci di riconoscere determinati antigeni (di campo o vaccinali) e quindi non in grado di sviluppare una risposta protettiva verso uno o, molto più raramente, più patogeni o più valenze vaccinali: due razze che frequentemente hanno questa caratteristica sono il **Dobermann** (scarsa risposta soprattutto verso la parvovirosi) e il **Rottweiler** (scarsa risposta soprattutto verso la parvovirosi e la rabbia)^{1,6,18,19,20,21}.

BOX 3

Cause di insuccesso vaccinale legate al patogeno

Anche quando un buon vaccino stimola un'efficace immunità in un animale immunocompetente, un patogeno può a volte superare le difese immunitarie. Una carica molto elevata o ceppi insolitamente virulenti di un patogeno possono infatti causare malattia in animali che sarebbero stati immuni a cariche inferiori o a ceppi meno virulenti. Inoltre, nonostante le vaste ed approfondite ricerche che vengono effettuate prima della messa in commercio di un vaccino per assicurare la protezione di un'elevata percentuale dei soggetti vaccinati, in alcuni casi l'emergere di derive genetiche nei microrganismi *wild type* può influire negativamente sull'efficacia vaccinale^{6,22}; l'attuale pandemia di Covid-19 rappresenta un esempio calzante di una situazione di questo tipo.

Oggi il medico veterinario dispone di validi strumenti rapidi, economici e affidabili che gli permettono una vaccinazione su misura per ogni singolo paziente, evitando di vaccinare alla cieca cani e gatti verso le malattie prevenibili mediante vaccinazioni core.

Date queste premesse, testare la protezione vaccinale titolando gli anticorpi specifici di ogni singolo animale è sicuramente una pratica migliore rispetto al richiamo vaccinale di routine effettuato alla cieca. In questi ultimi anni sono stati sviluppati diversi test rapidi cosiddetti “*in-clinics*”, molti dei quali disponibili anche in Italia, proprio per determinare in modo veloce il titolo anticorpale specifico e decidere di conseguenza se vaccinare o rivaccinare un cane o un gatto per le patologie considerate core. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare le *performances* di T-Check®, uno di questi nuovi test *in-clinics* in commercio in Italia per la determinazione della protezione del cane e del gatto verso le malattie prevenibili mediante vaccinazioni core. Per far ciò abbiamo eseguito diverse prove di validazione per confermare l’attendibilità dei risultati ottenuti, confrontandoli poi con quelli di un altro test rapido di riferimento.

MATERIALI E METODI

Il kit preso in esame è il T-Check® (versione Dog e versione Cat), sviluppato dall’azienda statunitense Life Science-DX. Tale test permette la ricerca semiquantitativa degli anticorpi IgG specifici per l’epatite infettiva (*Canine Adenovirus-1* – CAV-1), la parvovirosi (*Canine Parvovirus* tipo 2 – CPV-2) e il cimurro (*Canine Distemper Virus* – CDV) per il cane, e per la panleucopenia (*Feline Panleukopenia Virus* – FPV), la rinotracheite virale (*Feline Herpesvirus-1* – FHV-1) e la calicivirosi (*Feline Calicivirus* – FCV) per il gatto.

T-Check può essere usato esclusivamente con sangue fresco intero (1 goccia) prelevato da non più di 10 minuti; non può quindi essere usato né con plasma né con siero. Si tratta di un test basato sulla tecnica immunocromatografica con migrazione a flusso laterale, ma il suo funzionamento ricorda più un dipstick che un immunocromatografico classico. Una goccia di sangue fresco viene infatti inserita in una provetta contenente un tampone nella quale, dopo una delicata agitazione, si inserisce la striscia reattiva con adesivi gli antigeni dei patogeni di interesse: inizia così la migrazione del campione. Quando gli eventuali anticorpi in esso contenuti incontrano l’antigene per il quale sono specifici, si formano degli immunocomplessi che, continuando a migrare, incontrano un anticorpo marcato (coniugato) dando così origine a delle bande colorate nella tonalità del grigio, la

Tabella 1 - Fattori legati al vaccino, all’animale e al patogeno in grado di interferire con la vaccinazione.

| FATTORI LEGATI A: | | |
|---|-----------------------------------|-----------------------------|
| Vaccino | Animale | Patogeno |
| Tipo (infettivo - non infettivo) | Età | Procedure di sanitizzazione |
| Specifici antigeni/ceppi | Sesso | Flusso d’aria |
| Adjuvanti | Taglia | Sovraffollamento |
| Condizioni di ricostituzione | Stato di salute | Virulenza del ceppo |
| Modalità di somministrazione | Genetica (<i>non-responder</i>) | Carica infettante |
| Dose | Stress | |
| Somministrazione contemporanea di più vaccini | Stato nutrizionale | |
| | Immunodeficienze primarie | |

[Dall’Ara, 2020]

cui intensità viene letta confrontandola con la banda di controllo: se le bande del campione sono più scure della banda di controllo, l’animale risulta protetto. I risultati si leggono dopo 5-10 minuti (Figura 1). I kit sono singoli, contenuti in scatole da 10. Nella Tabella 2 sono riportati i criteri interpretativi del T-Check®, mentre nella Tabella 3 sono riportati i valori di sensibilità e specificità del test riportati dalla ditta produttrice. È opportuno sottolineare che questo è l’unico test sul mercato italiano che non riporta i valori soglia utilizzati per la definizione della protezione, fondamentali invece per la corretta interpretazione dei risultati ai fini dell’impostazione dell’approccio vaccinale più corretto.

La sensibilità di un test è la sua capacità di identificare i soggetti che presentano la malattia (realmente positivi), mentre la specificità di un test è la sua capacità di identificare i soggetti che non presentano la malattia (realmente negativi).

Per la validazione del dispositivo sono state condotte diverse prove con 18 campioni di cane (uno poi non considerato in quanto il dispositivo T-Check non si è attivato) e con 12 campioni di gatto utilizzando 30 dispositivi della versione cane e altrettanti della versione gatto; la maggior parte delle prove è stata eseguita su entrambe le versioni del kit (cane e gatto), mentre alcune



Figura 1 - T-Check® Dog e Cat.

Tabella 2 - Criteri interpretativi del T-Check®.

| Valore scala colorimetrica | | Colore | Interpretazione |
|----------------------------|----------|--|---|
| Controllo + | Campione | Inferiore a quello del controllo positivo | Negativo o scarsa risposta Assenza di protezione |
| Controllo + | Campione | Uguale o superiore a quello del controllo positivo | Risposta positiva |

[Dall'Ara, 2020]

Il valore soglia di un test rappresenta il cut-off del test: in caso di test per valutare la protezione, valori al di sopra del cut-off indicano che gli animali sono ben protetti, mentre valori al di sotto del cut-off indicano che gli animali non hanno una buona protezione verso quel patogeno e sono quindi a rischio di contrarre la malattia.

Tabella 3 - Sensibilità e specificità del T-Check®.

| | Sensibilità | Specificità |
|---------------------------|-------------|-------------|
| CANE | | |
| Parvovirosi (CPV-2) | 96% | 98% |
| Cimurro (CDV) | 94% | 97% |
| Epatite infettiva (CAV-1) | 97% | 95% |
| GATTO | | |
| Panleucopenia (FPV) | 94% | 97% |
| Rinotracheite (FHV-1) | 94% | 97% |
| Calicivirosi (FCV) | 96% | 96% |

sono state realizzate solo con una delle due versioni (Box 4 e Box 5).

Per ogni campione erano disponibili i dati di segnalamento (specie, razza, sesso, età, stato di salute) e l'anamnesi vaccinale. Tali campioni rappresentano la parte rimanente di campioni raccolti da cani e gatti di proprietà a scopo diagnostico o per controlli sanitari di routine con il consenso informato del proprietario. Non è quindi necessaria un'approvazione formale del Comitato Etico sulla base delle linee guida dell'Università degli Studi di Milano (Decisione CE 29 Ottobre 2012, rinnovata con protocollo n° 02-2016).

L'elenco delle prove eseguite (con specifica della tabella corrispondente dei Risultati), lo scopo e le modalità di realizzazione e i campioni utilizzati per ciascuna di queste sono riassunti nella Tabella 4.

BOX 4**Prova immersione**

Con l'esecuzione dei primi test di validazione, si sono ottenuti risultati poco convincenti che hanno sollevato dei dubbi riguardo l'affidabilità del kit e hanno portato a chiedere la consulenza del Prof. Pierantonio Biondi (illustre chimico, che cogliamo l'occasione per ringraziare) che ha consigliato di effettuare diverse prove mirate, allo scopo di identificare quali potessero essere i fattori condizionanti gli anomali risultati ottenuti. Oltre a quelle descritte nel testo, effettuate su entrambe le tipologie di kit, un'altra prova è consistita nell'immergere completamente la striscia reattiva (dipstick) nella soluzione di sangue e tampone per controllare l'eventuale comparsa di bande reattive indipendentemente dalla corretta migrazione del campione.

Questa prova, ripetuta su 3 campioni ematici di cane solo con il kit T-Check® Dog, non ha fornito alcun risultato, in quanto i dispositivi non si sono attivati, producendo un risultato non leggibile.

BOX 5**Prova del tempo lettura**

Durante lo svolgimento dello studio con T-Check® Cat è stato notato che all'aumentare del tempo trascorso dal momento dell'inserimento della striscia reattiva nella soluzione sangue-tampone al momento della lettura della stessa, talvolta la linea controllo e/o le linee test modificavano la propria colorazione. Per alcuni campioni, la lettura è stata ripetuta in 3 momenti differenti (a 5, 7 e 10 minuti dall'inserimento della striscia nella soluzione sangue-tampone), comunque sempre rispettando le indicazioni del kit che prevedono una lettura tra i 5 e i 10 minuti dall'inserimento. Per questa prova sono stati valutati 8 soggetti, 5 dei quali hanno restituito risultati discordanti tra loro, confermando che all'aumentare del tempo può aumentare l'intensità di grigio di una o più bande, compresa quella del controllo: quindi leggere a 5 minuti o a 10 minuti può dare risultati ben diversi tra loro. Anche se non è stato eseguito uno studio *ad hoc*, è stato possibile estendere questo concetto anche al T-Check® Dog.

Tabella 4 - Elenco delle prove eseguite (con specifica della tabella corrispondente dei Risultati), scopo e modalità di realizzazione e campioni utilizzati.

| Nome della prova e tabella corrispondente | Scopo e modalità di realizzazione | N° di campioni |
|---|--|---|
| Prova preliminare (Tabella 5) | Valutare la validità dei risultati ottenuti seguendo alla lettera le istruzioni del kit: - pipetta monouso fornita nel kit - lettura entro i 10 minuti dal prelievo | 7 campioni di cane 7 campioni di gatto |
| Prova quantità (Tabella 6) | Testare 4 differenti quantità di sangue di un medesimo soggetto prelevate e dispensate con strumenti diversi: - una goccia prelevata con la pipetta del kit - 10 µl, 20 µl e 30 µl prelevati con una pipettrice da laboratorio | 3 campioni di cane 3 campioni di gatto |
| Prova tempo dal prelievo (Tabella 7) | Valutare se il fattore tempo interferisce sui risultati del test: - inserimento della goccia di sangue nella soluzione tampone dopo 1, 5 e 9 minuti dal momento del prelievo - lettura sempre allo scadere dei 10 minuti | 3 campioni di cane 3 campioni di gatto |
| Prova intertest (Tabella 8) | Valutare la ripetibilità dei risultati ottenuti: - stesso campione testato su 3 dispositivi diversi alle condizioni d'uso del kit | 1 campione di cane 3 campioni di gatto |
| Prova immersione (Box 4) | Controllare l'eventuale comparsa di bande reattive indipendentemente dalla corretta migrazione del campione: - totale immersione della striscia reattiva nella soluzione di sangue e tampone | 3 campioni di cane |
| Prova del tempo lettura (Box 5) | Valutare se all'aumentare dei minuti aumenta l'intensità di grigio di una o più bande - le indicazioni del kit prevedono una lettura tra i 5 e i 10 minuti; - 3 letture diverse a 5, 7 e 10 minuti | 8 campioni di gatto |
| Confronto con VacciCheck (Tabelle 9 e 10) | Valutare la corrispondenza dei risultati ottenuti con quelli di un test rapido di riferimento (gold standard) - calcolo della concordanza con la K di Cohen | 17 campioni di cane 12 campioni di gatto |

Al **controllo positivo** di ogni singolo dipstick, pari al valore soglia di ogni singola malattia, è stato assegnato di volta in volta un valore espresso con diversi “+” (da 1 a 3). Un animale è stato quindi considerato **protetto** per una malattia quando la banda corrispondente del campione (valutata anch’essa con un punteggio da 1 a 3 “+”) aveva un’intensità di grigio maggiore o uguale rispetto al controllo; un animale è stato invece considerato **non protetto** quando la banda del campione aveva un’intensità di grigio inferiore rispetto a quella della banda del controllo, indicando il risultato con “±” (banda presente ma molto pallida) oppure con “-” (banda non visibile).

Il kit purtroppo non riporta il titolo anticorpale del controllo positivo considerato come soglia di protezione: di conseguenza, gli animali sono stati considerati semplicemente protetti o non protetti. In una seconda fase dello studio è stato contattato il produttore del kit e sono stati richiesti i valori soglia per ogni singola malattia. La discussione dei risultati alla luce dei valori soglia noti è riportata più avanti.

Tutti i risultati ottenuti nelle prove del T-Check® sono stati poi confrontati con quelli ottenuti mediante ImmunoComb VacchiCheck® (più semplicemente VacchiCheck) nella sua versione Canine o Feline. VacchiCheck è un test *in-clinics* di comprovata validità (prodotto dall’azienda israeliana Biogal e commercializzato in Italia in esclusiva da Agrolabo), ed è l’unico oggi ad essere stato approvato da diverse autorità regolatorie nel mondo^a per la valutazione della protezione del cane e del gatto verso le loro tre specifiche malattie prevenibili mediante vaccinazioni *core*.

^a USDA (United States Department of Agriculture)/FDA (Food and Drug Administration) negli USA, CFIA (Canadian Food Inspection Agency in Canada), MAFF (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries) in Giappone, ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) in Brasile e molte altre.

La concordanza tra i due test è stata misurata in base alla K di Cohen. La **K di Cohen** è un indice statistico che permette di calcolare l’accordo reale oltre il caso tra due test: il calcolo restituisce valori compresi tra -1 (massimo disaccordo) e +1 (massimo accordo): la concordanza può quindi essere nulla, scarsa, modesta, moderata, buona o eccellente (<http://www.quader-nodiepidemiologia.it/>)

Per calcolare la concordanza tra due test, dei quali nessuno dei due rappresenta il gold standard, è possibile ricorrere alla K di Cohen, coefficiente statistico che stima l’accordo oltre il caso tra i risultati ottenuti.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Prova preliminare su alcuni campioni di cane e di gatto

Inizialmente il test è stato provato su 7 campioni di cane e 7 di gatto allo scopo di valutare la validità dei risultati ottenuti seguendo alla lettera le istruzioni del kit: il quantitativo di sangue fresco inserito nella provetta contenente il tampone è stato misurato con la pipetta monouso fornita nel kit ed è stato testato entro i 10 minuti successivi al prelievo (in un tempo compreso tra i 5 e i 9 minuti dal prelievo) (Tabella 5).

Risultato atteso: risultati variegati dipendenti dal diverso stato vaccinale dei singoli animali (al momento non noto).

Risultato ottenuto: per diversi campioni di cane e di gatto i risultati hanno mostrato la **stessa strana tendenza**, ovvero sia un’intensità di grigio, a livello delle singole bande di reazione, direttamente proporzionale alla vicinanza con il “pad” assorbente immerso nel campio-

Tabella 5 - Prova preliminare sui primi 7 campioni di cane e di gatto.

| CANE | C+ | CPV-2 | CDV | CAV-1 | GATTO | C+ | FPV | FHV-1 | FCV |
|------|----|-------|-----|-------|-------|----|-----|-------|-----|
| CN1 | + | + | ++ | +++ | GT1 | + | ++ | - | ++ |
| CN2 | + | ++ | +++ | +++ | GT4 | + | + | + | + |
| CN3 | + | + | ++ | +++ | GT6 | + | + | ++ | +++ |
| CN4 | + | ++ | +++ | +++ | GT7 | + | + | ++ | +++ |
| CN5 | + | ++ | +++ | +++ | GT8 | + | - | ++ | ++ |
| CN6 | + | + | ++ | +++ | GT9 | + | + | - | + |
| CN13 | ++ | + | +++ | +++ | GT11 | + | ++ | - | +++ |

Grigio chiaro = banda con un’intensità di colore inferiore a quella del corrispondente controllo.
Grigio scuro = assenza di una banda visibile.

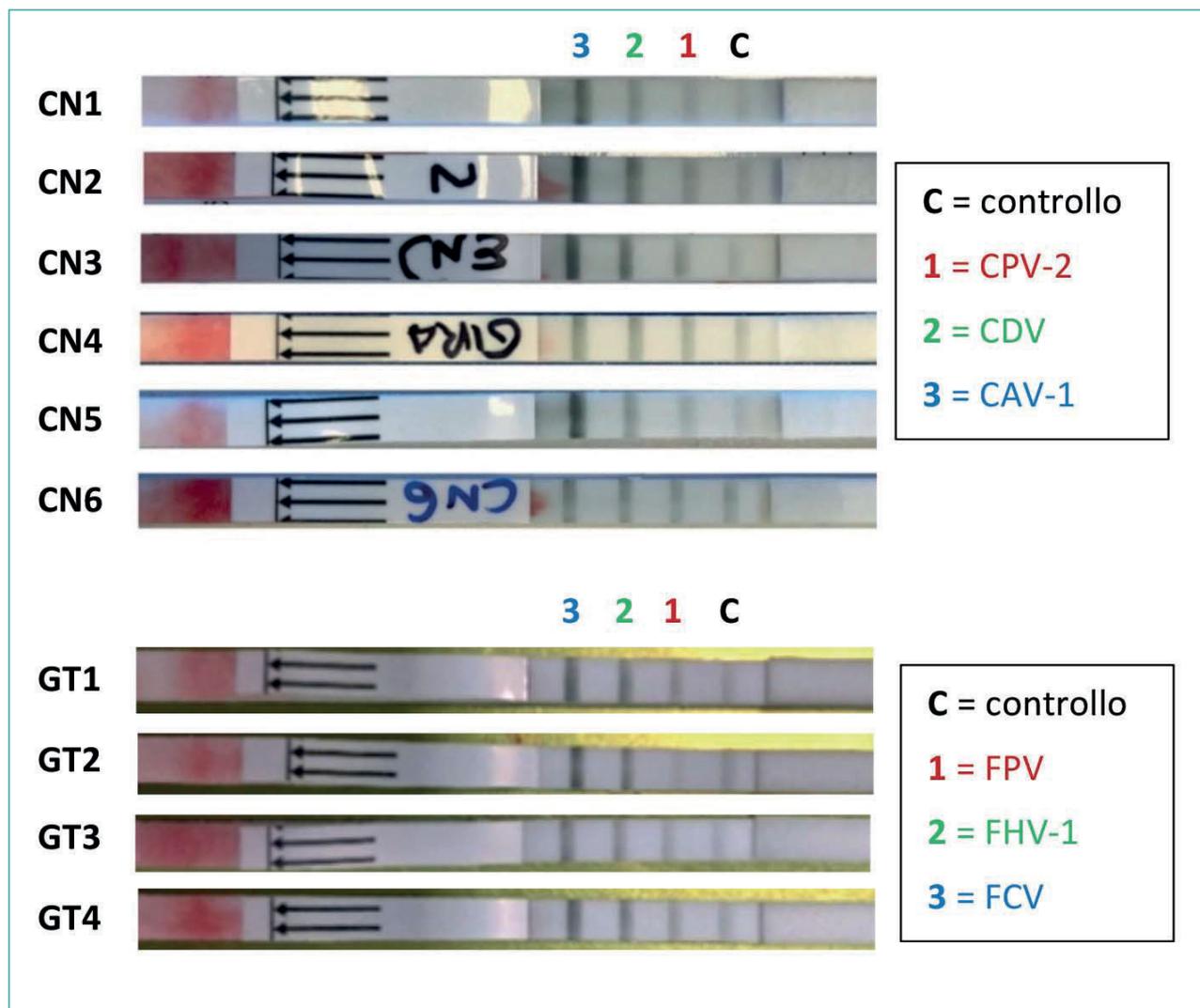


Figura 2 - Esempi di risultati ottenuti con il T-Check® Dog (sopra) e Cat (sotto): come si può vedere le bande più intense sono sempre quelle più vicine al pad che viene immerso nella soluzione tampone contenente il campione, indipendentemente dalla malattia.

ne diluito nel tampone: in altre parole, la banda più scura (corrispondente al CAV-1 per il cane e a FCV per il gatto) era sempre quella più vicina al pad, e la più chiara quella più lontana (corrispondente al CPV-2 per il cane e FPV per il gatto); la banda intermedia (corrispondente al CDV per il cane e FHV-1 per il gatto) aveva un'intensità di grigio intermedia (Figura 2).

Conclusioni: il test non ha quasi mai restituito risultati dipendenti dai singoli soggetti in quanto la vicinanza con il pad assorbente ha spesso rappresentato il fattore responsabile della maggiore intensità di colore delle bande.

Prova quantità

In questa prova sono state testate 4 differenti quantità di sangue di un medesimo soggetto prelevate e dispensate con strumenti diversi.

Le istruzioni del T-Check® richiedono l'inserimento di una goccia di sangue appena prelevato all'interno della soluzione tampone utilizzando la pipetta fornita dal kit; dal momento però che le dimensioni di una goccia di sangue non sono mai perfettamente identiche, abbiamo voluto provare a utilizzare, oltre alla pipetta del kit, anche pipettatrici di precisione (da laboratorio) tarate su 3 diverse quantità (10 µl, 20 µl e 30 µl), allo scopo di evidenziare eventuali cambiamenti nei risultati al mutare della quantità di sangue testata. Questa prova è stata eseguita con campioni di 3 cani e di 3 gatti (Tabella 6).

Risultato atteso: nessun cambiamento utilizzando strumenti diversi.

Risultato ottenuto: inaspettatamente, utilizzando differenti quantità di sangue di uno stesso soggetto, sempre nell'ordine di una goccia, il test ha restituito risultati differenti tra loro.

Tabella 6 - Prova quantità.

| CANE | Quantità | C+ | CPV-2 | CDV | CAV-1 |
|-------|----------|-----|-------|-------|-------|
| CN15 | 1 goccia | ++ | +++ | ± | +++ |
| | 10 µl | ++ | ± | +++ | +++ |
| | 20 µl | ++ | +++ | ± | +++ |
| | 30 µl | ++ | ++ | +++ | +++ |
| CN16 | 1 goccia | ++ | ± | +++ | +++ |
| | 10 µl | +++ | + | +++ | +++ |
| | 20 µl | ++ | +++ | +++ | +++ |
| | 30 µl | + | ++ | +++ | +++ |
| CN18 | 1 goccia | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | 10 µl | ++ | ± | +++ | +++ |
| | 20 µl | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | 30 µl | ++ | +++ | +++ | +++ |
| GATTO | Quantità | C+ | FPV | FHV-1 | FCV |
| GT4 | 1 goccia | + | + | + | + |
| | 10 µl | + | + | + | + |
| | 20 µl | + | + | + | + |
| | 30 µl | + | - | ++ | ++ |
| GT9 | 1 goccia | + | + | - | + |
| | 10 µl | + | + | + | + |
| | 20 µl | + | + | + | + |
| | 30 µl | + | - | ++ | +++ |
| GT11 | 1 goccia | + | ++ | + | +++ |
| | 10 µl | + | + | ++ | ++ |
| | 20 µl | + | + | ++ | ++ |
| | 30 µl | + | - | ++ | +++ |

Grigio chiaro = banda con un'intensità di colore inferiore a quella del corrispondente controllo.

Grigio scuro = assenza di una banda visibile.

Conclusione: anche con variazioni minime della quantità di sangue testato, **T-Check® restituisce spesso risultati discordanti tra loro** sia nella versione cane sia in quella gatto.

Prova tempo dal prelievo

Per valutare se il fattore tempo potesse interferire sui risultati del test, in questa prova uno stesso campione di cane o di gatto è stato testato secondo tempistiche differenti rispetto al momento del prelievo, ma comunque sempre entro e non oltre i 10 minuti dal prelievo, come richiesto dal kit.

Le analisi sono state condotte inserendo una goccia di sangue nella soluzione tampone dopo 1, 5 e 9 minuti dal momento del prelievo; per tutti, la lettura è stata eseguita allo scadere dei 10 minuti. Questa prova è stata eseguita con campioni di 3 cani e di 3 gatti (Tabella 7).

Risultato atteso: nessun cambiamento utilizzando tempi diversi entro i 10 minuti dal prelievo.

Risultato ottenuto: utilizzando tempi diversi rispetto al momento del prelievo per uno stesso soggetto, il test ha restituito risultati differenti tra loro.

Conclusione: pur rimanendo sempre entro i 10 minuti dal momento del prelievo, **T-Check® restituisce spesso risultati discordanti tra loro** sia nella versione cane sia in quella gatto.

Prova intertest

In questa prova uno stesso campione è stato testato su più dispositivi T-Check® (3 per ogni soggetto) seguendo le condizioni d'uso imposte dal test stesso. Questa prova è stata eseguita con campioni di 1 cane e di 3 gatti (Tabella 8).

Risultato atteso: medesimo risultato su tutti i kit utilizzati per un singolo soggetto.

Risultato ottenuto: i risultati sono stati concordanti per il cane e per 1 dei due gatti, mentre sono stati discordanti per gli altri 2 gatti, in un caso (GT1) passando addirittura da non protetto a ben protetto per FHV-1. Purtroppo per il cane, avendo in precedenza eseguito prove aggiuntive rispetto al gatto (es., prova immersione), avevamo terminato i test a disposizione: visti i risultati del gatto, tuttavia, non ci saremmo stupite di ottenere risultati discordanti anche per questa specie.

Conclusione: pur mantenendo le stesse condizioni operative, **T-Check® restituisce spesso risultati discordanti** quando si testa lo stesso campione su dispositivi diversi.

Confronto con VacciCheck

Tutti i risultati ottenuti con il T-Check® Dog e Cat sono stati confrontati con quelli ottenuti con il VacciCheck® rispettivamente Canine e Feline che, ricordiamo, è l'unico kit *in-clinics* ufficialmente approvato dalle autorità regolatorie di diversi paesi (vedi Introduzione) grazie alla sua attendibilità. Come già anticipato, però, il T-Check® (versione cane o gatto) non riporta i valori soglia utilizzati per la definizione della protezione, ma solo i criteri interpretativi che permettono solo la distinzione dei soggetti positivi (protetti) da quelli negativi (non protetti) senza una quantificazione, neanche approssimativa, del titolo anticorpale relativo.

Conoscere i valori soglia di un kit, qualunque esso sia, è invece fondamentale per la corretta interpretazione dei risultati ai fini dell'approccio vaccinale più corretto. Abbiamo quindi deciso di contattare l'azienda Life

Science-DX chiedendo di conoscere i valori soglia utilizzati nel kit e li abbiamo messi a confronto con quelli del VacciCheck® e di diversi altri kit *in-clinics* in commercio in Italia per la valutazione della protezione vaccinale del cane e, quando possibile, del gatto (Tabella 9). Come si può vedere, i valori soglia del T-Check® sono molto più elevati (almeno di un titolo, a volte addirittura di due) rispetto a quelli di tutti gli altri kit analoghi e a quelli suggeriti da tutte le linee guida vaccinali a livello mondiale. Ne consegue che i soggetti considerati “protetti” dal T-Check® lo saranno anche con tutti gli altri test, mentre quelli considerati “non protetti” dal T-Check® potrebbero invece avere comunque una più che buona copertura anticorpale come sostenuto da diverse fonti autorevoli^{1-4,6,9,13-17} e da tutti gli altri kit rapidi: questi soggetti rappresentano di fatto dei “falsi negativi”, che indurrebbero il veterinario ad agire di conseguenza eseguendo delle vaccinazioni *core* non necessarie.

Nella Tabella 10 (10a cane, 10b gatto) è riportato il numero di soggetti risultati protetti o non protetti in base ai valori soglia dei due test e la concordanza tra questi calcolata in base alla K di Cohen. Come si può vedere, in tutti i casi i due test hanno mostrato una concordanza nulla o modesta: in particolare, per le **malattie del cane modesta** per parvovirosi ed epatite infettiva e **nulla** per cimurro, per **tutte e tre le malattie del gatto sempre nulla**. Per meglio valutare l’affidabilità del T-Check®, abbiamo voluto provare, a titolo puramente speculativo, ad alzare i valori soglia del VacciCheck® e utilizzare anche per questo quelli molto più elevati utilizzati dal T-Check®: a seguito di questa prova, i dati discordanti tra T-Check® e VacciCheck® sono addirittura aumentati e la concordanza è diventata nulla per tutte le malattie considerate.

A supportare l’inattendibilità del T-Check® vi è anche l’analisi dei risultati in base all’**anamnesi vaccinale** (qui non riportata per motivi di spazio): soggetti non vaccinati o vaccinati da oltre 10 anni, risultati non protetti con il VacciCheck® come ci si poteva aspettare, sono risultati invece ben protetti con il T-Check®.

Sulla carta, il test *in-clinics* presente sul mercato italiano T-Check® Dog o Cat consente di valutare in maniera semplice e rapida la copertura anticorpale dei cani e dei gatti nei confronti delle malattie prevenibili mediante vaccinazioni *core*. Ma fin dalle prime prove eseguite, il test è risultato poco affidabile, producendo risultati discordanti quando ripetuti su campioni dello stesso soggetto e quasi identici per campioni prelevati da soggetti con anamnesi e segnalamento molto diversi: sembra infatti poco realistico che un cane vaccinato 4 mesi prima possa avere la stessa protezione anticorpale di un cane mai vaccinato, o che un gatto giovane possa avere la stessa protezione di un gatto anziano che nella vita

Tabella 7 - Prova tempo dal prelievo.

| CANE | Tempo | C+ | CPV-2 | CDV | CAV-1 |
|-------|----------|-----|-------|-------|-------|
| CN10 | 1 minuto | ++ | +++ | + | +++ |
| | 5 minuti | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | 9 minuti | ++ | +++ | + | +++ |
| CN12 | 1 minuto | +++ | + | +++ | +++ |
| | 5 minuti | ± | ± | +++ | +++ |
| | 9 minuti | ++ | + | +++ | +++ |
| CN13 | 1 minuto | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | 5 minuti | - | - | +++ | +++ |
| | 9 minuti | ++ | + | +++ | +++ |
| GATTO | Tempo | C+ | FPV | FHV-1 | FCV |
| GT5 | 1 minuto | + | + | ++ | ++ |
| | 5 minuti | + | - | ++ | ++ |
| | 9 minuti | + | + | ++ | ++ |
| GT7 | 1 minuto | + | + | ++ | +++ |
| | 5 minuti | + | + | ++ | +++ |
| | 9 minuti | + | + | ++ | +++ |
| GT12 | 1 minuto | + | + | ++ | ++ |
| | 5 minuti | + | - | ++ | ++ |
| | 9 minuti | + | + | ++ | ++ |

Grigio chiaro = banda con un’intensità di colore inferiore a quella del corrispondente controllo. Grigio scuro = assenza di una banda visibile.

Tabella 8 - Prova intertest.

| CANE | Tempo | C+ | CPV-2 | CDV | CAV-1 |
|-------|----------|-----|-------|-------|-------|
| CN18 | kit n. 1 | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | kit n. 2 | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | kit n. 3 | +++ | +++ | +++ | +++ |
| GATTO | Tempo | C+ | FPV | FHV-1 | FCV |
| GT1 | kit n. 1 | + | ++ | - | ++ |
| | kit n. 2 | + | + | + | + |
| | kit n. 3 | + | + | ++ | ++ |
| GT6 | kit n. 1 | + | + | ++ | +++ |
| | kit n. 2 | + | + | ++ | +++ |
| | kit n. 3 | + | + | ++ | +++ |
| GT8 | kit n. 1 | + | - | ++ | ++ |
| | kit n. 2 | + | + | + | + |
| | kit n. 3 | + | + | + | ++ |

Grigio chiaro = banda con un’intensità di colore inferiore a quella del corrispondente controllo. Grigio scuro = assenza di una banda visibile.

Tabella 9 - Valori soglia dei diversi test in-clinics in commercio in Italia per la valutazione della protezione vaccinale del cane e del gatto.

| | Patogeno | T-Check ^{1,a} | VacciCheck ² | TiterChek ^{3,b,c} | Cimurro – Parvovirus Ab ^{4,b,c} | CADP Ab ^{5,c} |
|--------------|-----------------|------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|--|------------------------------|
| CANE | CPV-2 | 1:320 | 1:80 | 1:80 | 1:80 | 1:80 |
| | CDV | 1:64 | 1:32 | 1:16 | 1:32 | 1:16 |
| | CAV-1 | 1:32 | 1:16 | // | // | 1:16 |
| | Patogeno | T-Check^{1,a} | VacciCheck² | TiterChek^{3,b,c} | CDV-CPV^{4,b,c} | CADP Ab^{5,c} |
| GATTO | FPV | 1:320 | 1:80 | // | // | // |
| | FHV-1 | 1:32 | 1:16 | // | // | // |
| | FCV | 1:64 | 1:32 | // | // | // |

¹ Life Science-DX (USA). ² Biogal (Israele) con distribuzione in esclusiva in Italia da parte di Agrolabo. ³ Zoetis (USA).

⁴ Fassisi (Germania) con distribuzione in esclusiva in Italia da parte di DiagnosticaVet.

⁵ VetAll (Korea) con distribuzione in esclusiva in Italia da parte di AlphaVet. ^a Valori non dichiarati nel kit ma richiesti all'azienda produttrice.

^b Non viene valutata la valenza epatite infettiva del cane. ^c Non esiste un analogo test per il gatto.

Tabella 10 - Confronto dei risultati tra T-Check® e VacciCheck® e percentuali di concordanza per le 3 malattie del cane (10a) e del gatto (10b) prevenibili mediante vaccinazioni core.

| 10a - CANE | | | | | |
|------------------------------------|------------|----------------|---|------------|---|
| PARVOVIROSI (CPV-2) | | T-Check | | | |
| | | + | - | TOT | |
| VacciCheck | + | 5 | 0 | 5 | Concordanza complessiva 0,529 K di Cohen 0,227 concordanza MODESTA |
| | - | 8 | 4 | 12 | |
| | TOT | 13 | 4 | 17 | |
| CIMURRO (CDV) | | T-Check | | | |
| | | + | - | TOT | |
| VacciCheck | + | 8 | 2 | 10 | Concordanza complessiva 0,471 K di Cohen -0,224 concordanza NULLA |
| | - | 7 | 0 | 7 | |
| | TOT | 15 | 2 | 17 | |
| EPATITE INFETTIVA (CAV-1) | | T-Check | | | |
| | | + | - | TOT | |
| VacciCheck | + | 11 | 0 | 11 | Concordanza complessiva 0,706 K di Cohen 0,206 concordanza MODESTA |
| | - | 5 | 1 | 6 | |
| | TOT | 16 | 1 | 17 | |
| 10b - GATTO | | | | | |
| PANLEUCOPENIA (FPV) | | T-Check | | | |
| | | + | - | TOT | |
| VacciCheck | + | 6 | 2 | 8 | Concordanza complessiva 0,500 K di Cohen -0,286 concordanza NULLA |
| | - | 4 | 0 | 4 | |
| | TOT | 10 | 2 | 12 | |
| INF. DA HERPESVIRUS (FHV-1) | | T-Check | | | |
| | | + | - | TOT | |
| VacciCheck | + | 7 | 0 | 7 | Concordanza complessiva 0,583 K di Cohen 0,000 concordanza NULLA |
| | - | 5 | 0 | 5 | |
| | TOT | 12 | 0 | 12 | |
| INF. DA CALICIVIRUS (FCV) | | T-Check | | | |
| | | + | - | TOT | |
| VacciCheck | + | 9 | 0 | 9 | Concordanza complessiva 0,750 K di Cohen 0,000 concordanza NULLA |
| | - | 3 | 0 | 3 | |
| | TOT | 12 | 0 | 12 | |

ha ricevuto numerose rivaccinazioni. Il confronto con il VacciCheck[®], test *in-clinics* di comprovata validità, ha ampiamente confermato l'inaffidabilità del T-Check[®], mostrando una notevole discrepanza tra i risultati ottenuti.

Un ulteriore punto a sfavore di questo kit è l'**assenza**, nelle istruzioni dello stesso, **dei valori soglia di protezione delle diverse malattie**, essenziali per la corretta interpretazione dei risultati ai fini dell'approccio vaccinale più corretto.

Contattando il produttore del test per chiedergli informazioni riguardo ai valori di riferimento utilizzati, i valori soglia del test T-Check[®] sono risultati tutti molto più elevati rispetto a quelli di tutti gli altri test analoghi e di quelli suggeriti da tutte le linee guida internazionali e dagli esperti di settore.

Ne consegue che i soggetti considerati "non protetti" da questo test potrebbero di fatto avere comunque una copertura anticorpale sufficiente, se non addirittura buona, e rappresentare quindi dei "falsi negativi": questo por-

terebbe a decidere di vaccinare animali che non ne hanno assolutamente bisogno, rischiando così una sovravaccinazione e lo sviluppo di reazioni avverse evitabili. In conclusione, a fronte dei risultati ampiamente negativi ottenuti dal nostro studio, seppur condotto su un campione di numerosità limitata, relativi all'affidabilità del T-Check[®] in entrambe le sue versioni cane e gatto, ci sentiamo di **sconsigliarne l'utilizzo nella pratica veterinaria**.

RINGRAZIAMENTI

Le autrici desiderano ringraziare di cuore il Prof. Pierantonio Biondi dell'Università degli Studi di Milano, per averci aiutato durante la fase sperimentale di questo lavoro, mettendoci a disposizione la sua grande competenza chimica sempre con un sorriso: i suoi consigli hanno portato a una modifica "in corso d'opera" dell'impostazione della parte sperimentale, rendendola ancora più stimolante e utile per la prosecuzione delle indagini.

PUNTI CHIAVE

- I test sierologici ambulatoriali cosiddetti *in-clinics* possono valutare la presenza di anticorpi protettivi specifici per i tre patogeni principali del cane (CPV-2, CDV, CAV-1) e del gatto (FPV, FHV-1 e FCV) per i quali sono previsti i vaccini *core*.
- Test **molto sensibili** non si fanno sfuggire soggetti positivi ma sono in genere poco specifici e possono più facilmente produrre **falsi positivi**; al contrario, test **molto specifici** danno risultati certi sul patogeno coinvolto ma sono in genere poco sensibili e possono più facilmente produrre **falsi negativi**.
- Quando si ricorre a un test per valutare la protezione di un animale, è fondamentale che il test riporti i **valori soglia** considerati per le diverse malattie, per agevolare l'interpretazione dei risultati.
- Il **gold standard** è un test di riferimento definito come la migliore approssimazione possibile della presenza o dell'assenza di una determinata malattia: la validità di un test, come quello oggetto di questo studio, viene espressa dalla casa produttrice come il confronto dei risultati ottenuti con quelli che si sarebbero ottenuti con il gold standard.
- Purtroppo ad oggi manca in Italia una normativa sui dispositivi medici veterinari quali sono i test rapidi (diagnostici o di prevenzione): le uniche leggi spiegano come importarli e quali sono i requisiti minimi previsti dalla normativa generale sulla sicurezza dei prodotti commercializzati in Unione Europea, ma niente di più: quindi chi produce o distribuisce sul mercato italiano dispositivi medici veterinari deve garantire che i prodotti siano sicuri, ma non deve dimostrarne l'efficacia scientifica.

Unreliability of a rapid test for the evaluation of antibody protection against the core vaccines in dogs and cats

Summary

Introduction. *Current guidelines for the correct vaccination of dogs and cats recommend the administration of MLV core vaccines to all dogs and cats generally every three years, but there are many factors that can affect the success of a vaccination. Testing the vaccine protection by titrating specific antibodies is certainly a better practice than blind routine booster vaccination.*

Aim of the study. *The purpose of this study was to analyze T-Check[®], an in-clinics test on the market in Italy for the determination of the protection of dogs and cats against diseases preventable through core vaccinations.*

Materials and methods. *Several validation assays (quantity, reading time, time from sampling, intertest assays) were performed to confirm the reliability of the obtained results, which were then compared with those of another reference in-clinics test (VacciCheck) considered the gold standard rapid test.*

Results. *The test returned results in each test discordant with each other and with those of the VacciCheck, in the latter case with a virtually zero percentage of agreement for all the diseases considered. Furthermore, the test uses a very high positive threshold (not reported in the kit instructions), that make to consider as unprotected dogs and cats which are instead well protected.*

Discussion. *Due to the results obtained in our study relating to the reliability of the T-Check[®] in both its dog and cat versions, we strongly advise against its use in veterinary practice.*

BIBLIOGRAFIA

1. World Small Animal Veterinary Association (WSAVA). Linee guida per la vaccinazione del cane e del gatto, stilate dal Vaccination Guidelines Group (VGG) della World Small Animal Veterinary Association (WSAVA), traduzione italiana a cura di Paola Dall'Ara, 2015. Available at: <https://wsava.org/global-guidelines/vaccination-guidelines/>. Accesso al sito 15 maggio 2022.
2. American Animal Hospital Association (AAHA). AAHA Canine vaccination guidelines. 2018. Available at: <https://www.aaha.org/aaha-guidelines/vaccination-canine-configuration/vaccination-canine/>. Accesso al sito 15 maggio 2022.
3. European Advisory Board on Cat Disease (ABCD). Matrix vaccination guidelines. ABCD recommendations for indoor/outdoor cats, rescue shelter cats and breeding catteries. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 17:583-587, 2015.
4. American Animal Hospital Association (AAHA) & American Association of Feline Practitioners (AAFP) (2020): 2020 AAHA/AAFP Feline Vaccination Guidelines. *Journal of the American Animal Hospital Association*. Available at: <https://www.aaha.org/globalassets/02-guidelines/feline-vaccination-guidelines/resource-center/2020-aaha-aafp-feline-vaccination-guidelines.pdf>. Accesso al sito 15 maggio 2022.
5. Böhm M, Thompson H, Weir A, et al. Serum antibody titres to canine parvovirus, adenovirus and distemper virus in dogs in the UK which had been vaccinated for at least three years. *Veterinary Record* 154(15):457-463, 2004.
6. Dall'Ara P. Vaccini e vaccinazioni negli animali da compagnia. Milano: EDRA, 2020.
7. Mitchell S, Zwijnenberg RJ, Huang J, et al. Duration of serological response to canine parvovirus-type 2, canine distemper virus, canine adenovirus type 1 and canine parainfluenza virus in client-owned dogs in Australia. *Australian Veterinary Journal* 90(12):468-473, 2012.
8. Mouzin DE, Lorenzen MJ, Haworth JD, et al. Duration of serologic response to five viral antigens in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 224(1):55-60, 2004.
9. Schultz RD, Thiel B, Mukhtar E, et al. Age and long-term protective immunity in dogs and cats. *Journal of Comparative Pathology* 142(Suppl 1):102-108, 2010.
10. Twark L, Dodds WJ. Clinical use of serum parvovirus and distemper virus antibody titers for determining revaccination strategies in healthy dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 217(7):1021-1024, 2000.
11. Vila Nova B, Cunha E, Sepúlveda N, et al. Evaluation of the humoral immune response induced by vaccination for canine distemper and parvovirus: a pilot study. *BMC Veterinary Research* 14(1):348-356, 2018.
12. Tizard IR. Vaccines for veterinarians. St Louis: Elsevier, 2020.
13. Dall'Ara P, Labriola C, Sala E, et al. Prevalence of serum antibody titres against feline panleukopenia, herpesvirus and calicivirus infections in stray cats of Milan, Italy. *Preventive Veterinary Medicine* 167:32-38, 2019.
14. Dall'Ara P, Lauzi S, Filipe J, et al. Discrepancy between in-clinic and haemagglutination-inhibition tests in detecting maternally-derived antibodies against canine parvovirus in puppies. *Frontiers in Veterinary Science* 8(630809): 1-, 2021.
15. DiGangi BA, Gray LK, Levy JK, et al. Detection of protective antibody titers against feline panleukopenia virus, feline herpesvirus-1, and feline calicivirus in shelter cats using a point-of-care ELISA. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 13:912-918, 2011.
16. Meazzi S, Filipe J, Fiore A, et al. Agreement between in-clinics and virus neutralization tests in detecting antibodies against canine distemper virus (CDV). *Viruses* 14:517-526, 2022.
17. Killey R, Mynors C, Pearce R, et al. Long-lived immunity to canine core vaccine antigens in UK dogs as assessed by an in-practice test kit. *Journal of Small Animal Practice* 59:27-31, 2018.
18. Day MJ, Schultz RD. *Veterinary immunology: principles and practice*, 2nd ed. London: CRC Press, 2014.
19. Dall'Ara P. Tipi di vaccini e fattori che influenzano la vaccinazione. *Summa Animali da Compagnia, Speciale Profilassi* 8:7-12, 2012.
20. Dall'Ara P. Immunopatologia. In: Poli G, Dall'Ara P, Martino PA, Rosati S. Eds *Microbiologia e immunologia veterinaria*, 3a ed. Milano: EDRA, 2017, pp. 527-558.
21. Day MJ. *Clinical immunology of the dog and cat*, 2nd ed.. London: Manson Publishing/The Veterinary Press, 2008.
22. Ramsey I, Tennant B. *Clinica delle malattie infettive del cane e del gatto*. Torino: UTET, 2001.