

Uso della chemiluminescenza per la diagnosi della brucellosi bovina e ovina mediante ELISA indiretta e competitiva

Manuela Tittarelli⁽¹⁾, Barbara Bonfini⁽¹⁾, Romolo Salini⁽¹⁾, Maria Magliulo⁽²⁾, Massimo Guardigli⁽²⁾ & Aldo Roda⁽²⁾

Riassunto

I metodi ufficiali previsti dal Piano nazionale di eradicazione della brucellosi bovina ed ovi-caprina sono la sieroaagglutinazione rapida (SAR) con l'antigene acidificato al Rosa Bengala e la fissazione del complemento (FDC). Nella attuale fase del piano di eradicazione non è infrequente imbattersi in risultati di difficile interpretazione ottenuti con i test ufficiali, pertanto è necessario poter disporre di test aggiuntivi che presentino livelli di specificità e di sensibilità più elevati. A questo scopo sono stati validati due metodi ELISA, indiretto (i-ELISA CL) e competitivo (c-ELISA CL), mediante l'utilizzo di un substrato chemiluminescente per la determinazione di anticorpi anti-*Brucella* in siero bovino ed ovino. I metodi si basano sulla rivelazione degli anticorpi anti-*Brucella*, contenuti nel siero, mediante la catalisi di un substrato enzimatico chemiluminescente (sistema luminolo/H₂O₂/enhancer), da parte della perossidasi coniugata ad anticorpi secondari anti-IgG, nella i-ELISA CL, o al monoclonale anti-LPS, nella c-ELISA CL. Sulla base dei risultati ottenuti, per l'i-ELISA CL è stato stabilito un valore di *cut-off*, espresso come percentuale di positività (PP), del 60% per i sieri bovini e del 37,5% per quelli ovini; con questo valore di *cut-off* si ottiene una sensibilità ed una specificità del test del 100% per i sieri bovini, e una sensibilità

del 100% e una specificità del 99,8% per quelli ovini. Per la c-ELISA CL è stato scelto un *cut-off*, espresso come percentuale di inibizione (PI), del 30% per i sieri bovini e del 40% per quelli ovini, che assicura valori di sensibilità e specificità del 100% in entrambi i casi.

Parole chiave

Animali, Bovini, Brucellosi, Chemiluminescenza, ELISA, Ovini, Sierologia.

Introduzione

La strategia di lotta alla brucellosi bovina ed ovi-caprina nell'ambito dell'Unione Europea si pone l'obiettivo di eradicare l'infezione, ossia di eliminare dal proprio territorio la malattia e il relativo agente eziologico (4). Il raggiungimento di tale obiettivo è perseguito attraverso l'individuazione e l'abbattimento di tutti gli animali positivi sierologicamente e/o batteriologicamente, il divieto di vaccinazione e il raggiungimento dello stato sanitario di "Ufficialmente Indenne", sia degli allevamenti sia dei territori dell'Unione Europea.

I metodi ufficiali previsti dal Piano nazionale di eradicazione della brucellosi bovina ed ovi-caprina sono la sieroaagglutinazione rapida (SAR) con l'antigene acidificato al Rosa Bengala e la fissazione del complemento (FdC) (1, 2, 3).

(1) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale', Via Campo Boario, 64100 Teramo, Italia
m.tittarelli@izs.it

(2) Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Bologna, Via Belmeloro 6, 40126 Bologna, Italia

Nella attuale fase del piano di eradicazione non è infrequente imbattersi in risultati di difficile interpretazione ottenuti con i test ufficiali, pertanto è necessario poter disporre di test aggiuntivi che presentino livelli di specificità e di sensibilità più elevati.

La chemiluminescenza consiste nell'emissione di radiazioni luminose nel visibile o nel vicino visibile (lunghezza d'onda compresa nell'intervallo 300-800 nm) dopo che elettroni eccitati mediante una reazione chimica esoergonica ritornano allo stato fondamentale (7).

Una delle più importanti applicazioni dei metodi chemiluminescenti è lo sviluppo di metodi immunologici che utilizzano traccianti chemiluminescenti per la diretta marcatura di anticorpi o antigeni oppure traccianti enzimatici e substrati chemiluminescenti: i marcatori enzimatici hanno il vantaggio, rispetto alla marcatura degli anticorpi o degli antigeni, di permettere l'amplificazione e la stabilizzazione del segnale, consentendo di ottenere limiti di rivelazione estremamente bassi (10).

Tra i composti chemiluminescenti maggiormente utilizzati in campo analitico vi è il luminolo (9), la cui molecola è costituita da due anelli adiacenti: il primo, aromatico, non subisce variazioni durante la reazione chemiluminescente, mentre il secondo, eterociclico non aromatico, viene ossidato e, ritornando allo stato fondamentale, restituisce l'energia di eccitazione sotto forma di fotoni. Il luminolo richiede perossido di idrogeno e può essere catalizzato da ioni metallici e da enzimi come la perossidasi.

In questo studio sono stati validati due metodi ELISA, indiretto (i-ELISA CL) e competitivo (c-ELISA CL), mediante l'utilizzo di un substrato chemiluminescente per la determinazione di anticorpi anti-*Brucella* in siero bovino ed ovino. I metodi si basano sulla rivelazione degli anticorpi anti-*Brucella*, contenuti nel siero, mediante la catalisi di un substrato enzimatico chemiluminescente (sistema luminolo/H₂O₂/enhancer), da parte della perossidasi coniugata ad anticorpi secondari anti-IgG, nella i-ELISA CL, o al monoclonale anti-LPS, nella c-ELISA CL.

Materiali e metodi

Pannello di sieri

Per la validazione del test è stato utilizzato un pannello composto da 1.500 sieri così ripartiti:

- 745 sieri di bovino provenienti da allevamenti indenni da brucellosi delle Regioni Abruzzo, Basilicata, Calabria, Liguria, Sardegna e Veneto
- 43 sieri di bovino provenienti da 12 allevamenti delle Regioni Abruzzo, Calabria e Molise infetti da brucellosi, nei quali era stata isolata *Brucella* spp.
- 636 sieri di ovino provenienti da allevamenti indenni da brucellosi della Regione Sardegna
- 76 sieri di ovino provenienti da allevamenti delle Regioni Abruzzo, Calabria e Sicilia infetti da brucellosi, nei quali era stata isolata *Brucella* spp.

Esami sierologici

Tutti i campioni di siero sono stati testati per verificare la presenza di anticorpi mediante SAR e FdC, utilizzando antigeni prodotti con il ceppo 99 *Brucella abortus* biovar 1 (*Veterinary Laboratories Agency*, Weybridge), secondo quanto descritto nel *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines* (13). L'analisi mediante ELISA competitiva (c-ELISA) è stata effettuata secondo quanto descritto da Portanti *et al.* (8).

Descrizione del metodo i-ELISA con rivelazione chemiluminescente

Il test è stato effettuato utilizzando micropiastre a 96 pozzetti F16 Black PolySorp (NUNC™, Danimarca) adsorbite con 100 µl per pozzetto di antigene lipopolisaccaridico liscio (s-LPS) di *Brucella abortus* 99 (Weybridge) prodotto dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" (IZS A&M) secondo la tecnica descritta da Hendry *et al.* (6) e diluito 1:3.500 in tampone carbonato-bicarbonato 0,05M, pH 9,6.

Le piastre, dopo incubazione per una notte a +4°C, sono state lavate tre volte con tampone fosfato salino 0,01 M + 0,05% Tween 20, pH 7,2 (PBST) ed ulteriormente incubate per 2 ore a +4°C con 250 µl per pozzetto di blocking solution (PBS 0,1 M + 1% polivinilpirrolidone). Dopo tre cicli di lavaggio, 100 µl/pozzetto di

ciascun campione sono stati distribuiti in duplicato, diluendoli 1:50 in PBS. Come standard positivi di riferimento sono stati utilizzati siero nazionale standard (SNS) positivo per brucellosi da bovino e siero standard positivo per brucellosi da ovino prodotti dall'IZS A&M; come standard negativi di riferimento sono stati utilizzati il Siero Standard Negativo per brucellosi da bovino e il siero standard negativo per brucellosi da ovino, provenienti da allevamenti Ufficialmente Indenni da brucellosi e prodotti dall'IZS A&M. Entrambi sieri sono stati esaminati come i sieri in esame e conservati in bottiglie da 1 ml liofilizzati.

Le piastre, dopo incubazione di 1 ora a temperatura ambiente, sono state lavate 3 volte con PBST e, successivamente, incubate per 1 ora con 100 µl/ pozzetto di anticorpo anti-IgG di specie marcato con perossidasi di rafano (Sigma-Aldrich Corporation, St Louis, Missouri) diluito 1:40 000 in PBS. Terminata l'incubazione, le piastre sono state nuovamente lavate e quindi sono stati aggiunti 100 µl/pozzetto di substrato chemiluminescente SuperSignal® ELISA Femto (Pierce, Rockford, Illinois), basato su di un sistema luminolo/H₂O₂/enhancer. Il segnale, espresso in conteggi per secondo (CPS), è stato immediatamente misurato mediante un luminometro per micropiastre Victor3™ Multilabel Counter modello 1420 (Perkin-Elmer, Fremont, California).

Dai valori del segnale chemiluminescente è stata calcolata la percentuale di positività (PP) del campione in relazione allo standard positivo di riferimento con la seguente formula:

$$PP = (\text{media CPS campione}/\text{media CPS siero positivo riferimento}) \times 100.$$

Descrizione del metodo c-ELISA con rivelazione chemiluminescente

Il test è stato condotto utilizzando il kit commerciale prodotto dall'IZS A&M (8), utilizzando piastre a 96 pozzetti F16 Black PolySorp, diluendo l'anticorpo monoclonale anti-*Brucella* spp. coniugato con perossidasi (MAb-HRP) 1:1.000 in tampone di diluizione.

Dopo incubazione e lavaggio del MAb-HRP, sono stati aggiunti 100 µl/pozzetto di substrato chemiluminescente SuperSignal® ELISA Femto e il segnale, espresso in CPS, è stato immediatamente misurato mediante il luminometro Victor3™ Multilabel Counter modello 1420.

Dai valori del segnale chemiluminescente è stata calcolata la percentuale di inibizione (PI) del campione in relazione al valore di CPS del controllo MAb-HRP con la seguente formula:

$$PI = (\text{media CPS campione}/\text{media CPS controllo MAb-HRP}) \times 100.$$

Analisi statistica

Il valore ottimale di *cut-off*, sulla base di valori attesi di sensibilità e specificità diagnostica, è stato determinato attraverso la curva ROC (*receiver operator characteristic*) (5, 11).

Per i valori di sensibilità e di specificità sono stati calcolati gli intervalli di confidenza al 95% utilizzando la distribuzione di probabilità Beta ($s+1, n-s+1$), dove s è il numero totale dei campioni positivi e n è il numero totale dei campioni esaminati.

Risultati

In Tabella I è riportata la provenienza dei sieri esaminati con i metodi chemiluminescenti e le altre prove sierologiche.

Sulla base dei risultati ottenuti con la i-ELISA CL, è stato stabilito un valore di *cut-off*, espresso come PP, del 60% per i sieri bovini (Figura 1) e del 37,5% per quelli ovini (Figura 2); questo determina una sensibilità ed una specificità del test del 100% per i sieri bovini, e una sensibilità del 100% e una specificità del 99,8% per quelli ovini (Figura 3 e 4).

Sulla base dei risultati ottenuti con la c-ELISA CL, è stato stabilito un valore di *cut-off*, espresso come PI, del 30% per i sieri bovini (Figura 5) e del 40% per quelli ovini (Figura 6) che determina una sensibilità e una specificità del test del 100% sia per i sieri bovini sia per quelli ovini (Figura 7 e 8).

Tabella I
 Sieri utilizzati per la validazione

Specie	Abruzzo	Basilicata	Calabria	Liguria	Molise	Sardinia	Sicily	Veneto	Total
Bovini	86	74	66	221	13	49	0	279	788
Ovini	65	0	5	0	0	636	6	0	712

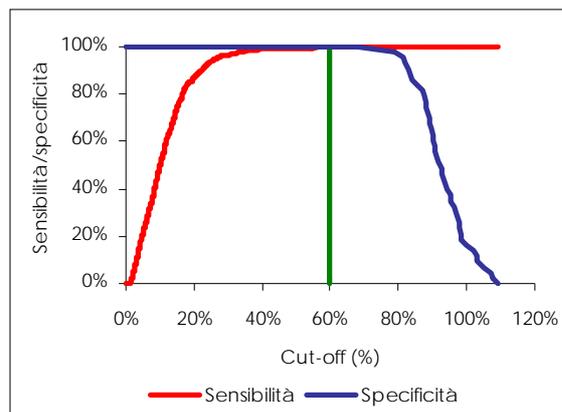


Figura 1
 Cut-off del metodo ELISA indiretto con rivelazione chemiluminescente (i-ELISA CL) calcolato in funzione dei diversi valori di sensibilità e specificità dei sieri bovini

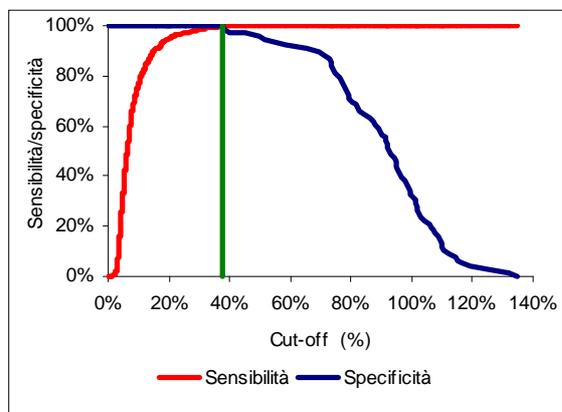


Figura 2
 Cut-off del metodo ELISA indiretto con rivelazione chemiluminescente (i-ELISA CL) calcolato in funzione dei diversi valori di sensibilità e specificità dei sieri ovini

I risultati dei 745 sieri bovini negativi e dei 636 sieri ovini negativi esaminati alle prove SAR, FDC, i-ELISA, c-ELISA, i-ELISA CL e c-ELISA CL sono riportati in Tabella II.

I risultati dei 43 sieri bovini positivi e dei 76 sieri ovini positivi esaminati alle prove SAR, FDC, c-ELISA, i-ELISA, i-ELISA CL e c-ELISA CL sono riportati in Tabella III.

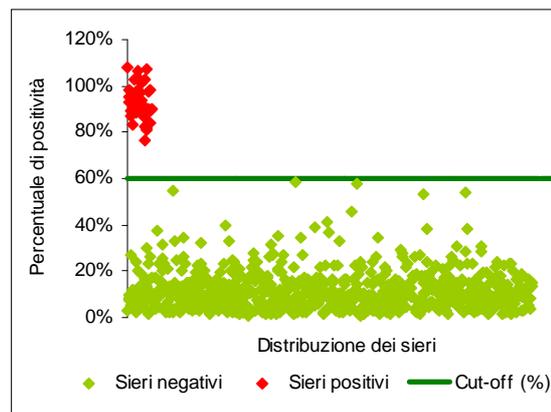


Figura 3
 Distribuzione delle percentuali di positività (PP) dei sieri bovini

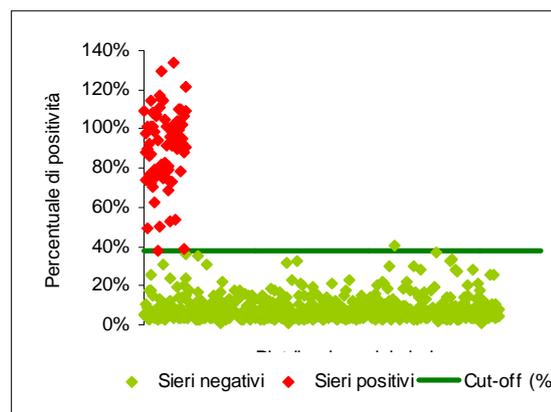


Figura 4
 Distribuzione delle percentuali di positività (PP) dei sieri ovini

In Tabella IV sono riportati gli intervalli di confidenza al 95% per i valori di sensibilità e specificità calcolati per i due metodi chemiluminescenti.

Discussione

Il piano nazionale di eradicazione della brucellosi bovina ed ovi-caprina prevede, come metodi ufficiali, la sieroaagglutinazione rapida con l'antigene acidificato al Rosa Bengala e la fissazione del complemento (1, 2,

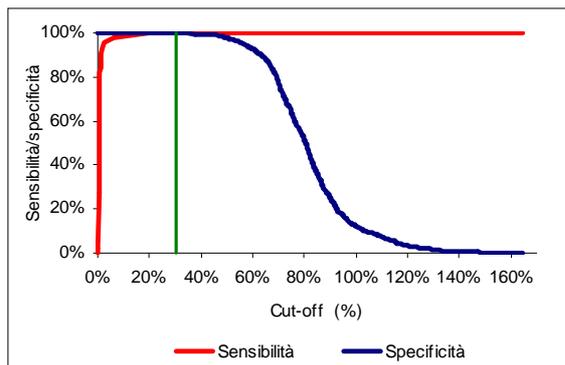


Figura 5
 Cut-off del metodo ELISA competitivo con rivelazione chemiluminescente (c-ELISA CL) calcolato in funzione dei diversi valori di sensibilità e specificità dei sieri bovini

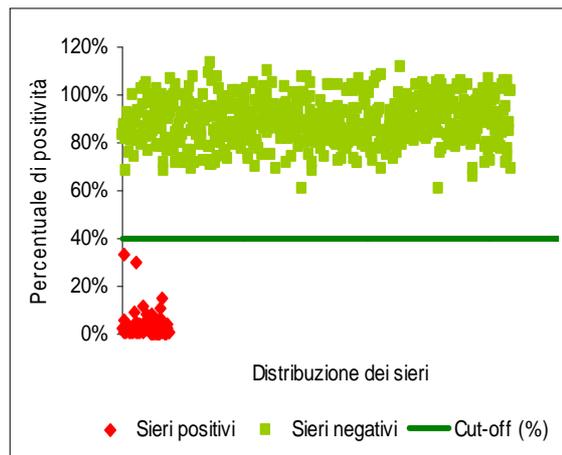


Figura 8
 Distribuzione delle percentuali di inibizione (PI) dei sieri ovini

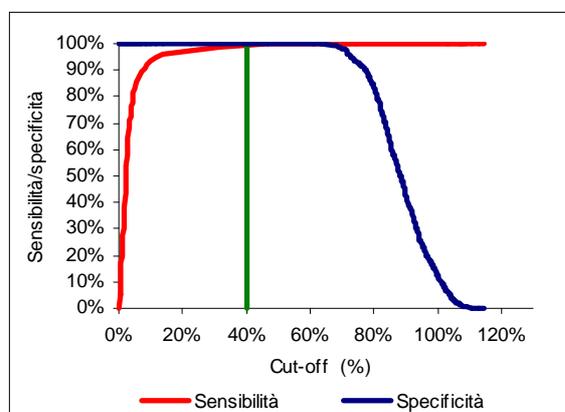


Figura 6
 Cut-off del metodo ELISA competitivo con rivelazione chemiluminescente (c-ELISA CL) calcolato in funzione dei diversi valori di sensibilità e specificità dei sieri ovini

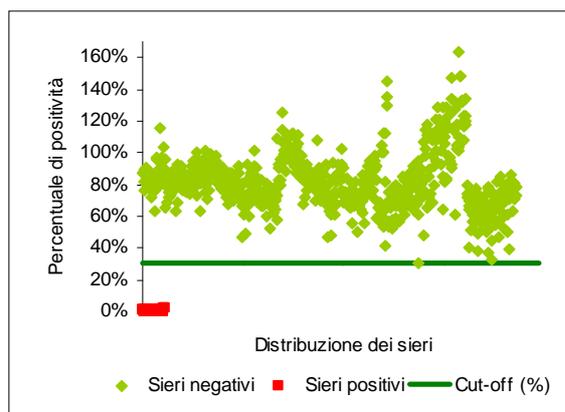


Figura 7
 Distribuzione delle percentuali di inibizione (PI) dei sieri bovini

3). La diagnosi sierologica mediante ELISA presenta, rispetto alle prove ufficiali, notevoli vantaggi sia per l'effettuazione del test sia per l'interpretazione dei risultati (8).

L'impiego della chemiluminescenza, caratterizzata da una maggiore rivelabilità rispetto alle più convenzionali tecniche di misura spettrofotometriche e spettrofluorimetriche (12), ha permesso di migliorare le performances dei metodi ELISA indiretto e competitivo. In particolare, comparando il livello di specificità dell'ELISA standard (indiretta e competitiva) con il metodo che utilizza il substrato chemiluminescente, differenze significative sono state identificate (IC 95% c-ELISA vs c-ELISA CL rispettivamente: 97.38%-99.17% vs 99.6%-100%); i-ELISA vs i-ELISA CL rispettivamente: 96.05%-98.35% vs 99.6%-100%). I traccianti enzimatici e i substrati chemiluminescenti permettono l'amplificazione e la stabilizzazione del segnale, consentendo di ottenere limiti di rivelazione estremamente bassi (10).

In questo studio sono stati validati due metodi ELISA, indiretto e competitivo, mediante l'utilizzo di un substrato chemiluminescente per la determinazione di anticorpi anti-*Brucella* in siero bovino ed ovino.

Dalle curve ROC sono emersi valori ottimali di *cut-off* che consentono di discriminare in modo inequivocabile i campioni positivi da quelli negativi, con conseguente aumento delle performances dei metodi.

Tabella II
Risultati della validazione dei sieri negativi

Specie	SAR		FDC		c-ELISA		i-ELISA		i-ELISA CL		c-ELISA CL		Total
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
Bovine	744	1	736	9	734	11	726	19	745	0	745	0	745
Ovine	636	0	632	4	629	7	634	2	635	1	636	0	636

SAR sieroagglutinazione rapida
 FDC fissazione del complemento
 c-ELISA *enzyme-linked immunosorbent assay* competitivo
 i-ELISA *enzyme-linked immunosorbent assay* indiretto
 c-ELISA CL *enzyme-linked immunosorbent assay* competitivo con rivelazione chemiluminescente
 i-ELISA CL *enzyme-linked immunosorbent assay* indiretto con rivelazione chemiluminescente
 - negativo
 + positivo

Tabella III
Risultati della validazione dei sieri positivi

Specie	SAR		FDC		c-ELISA		i-ELISA		i-ELISA CL		c-ELISA CL		Total
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
Bovine	1	42	0	43	1	42	0	43	0	43	0	43	43
Ovine	0	76	1	75	0	76	0	76	0	76	0	76	76

SAR sieroagglutinazione rapida
 FDC fissazione del complemento
 c-ELISA *enzyme-linked immunosorbent assay* competitivo
 i-ELISA *enzyme-linked immunosorbent assay* indiretto
 c-ELISA CL *enzyme-linked immunosorbent assay* competitivo con rivelazione chemiluminescente
 i-ELISA CL *enzyme-linked immunosorbent assay* indiretto con rivelazione chemiluminescente
 - negativo
 + positivo

Tabella IV
Sensibilità e specificità dei metodi chemiluminescenti

Test	Specie	Caratteristiche	Percentuale	Limite confidenza inferiore	Limite confidenza superiore
i-ELISA CL	Bovini	Sensibilità	100,0	93,42	100,00
		Specificità	100,0	99,60	100,00
	Ovini	Sensibilità	100,0	96,18	100,00
		Specificità	99,8	99,13	99,96
c-ELISA CL	Bovini	Sensibilità	100,0	93,42	100,00
		Specificità	100,0	99,60	100,00
	Ovini	Sensibilità	100,0	96,18	100,00
		Specificità	100,0	99,53	100,00

i c-ELISA CL *enzyme-linked immunosorbent assay* competitivo con rivelazione chemiluminescente
 i-ELISA CL *enzyme-linked immunosorbent assay* indiretto con rivelazione chemiluminescente

La sensibilità dei test chemiluminescenti, determinata sulla base dei risultati ottenuti analizzando i sieri provenienti da allevamenti infetti da brucellosi nei quali era stata isolata *Brucella* spp., è risultata essere del 100% per i sieri bovini e per quelli ovini, sia nella i-ELISA CL che nella c-ELISA CL. Analogamente, la specificità, determinata esaminando sieri provenienti da allevamenti Ufficialmente Indenni da brucellosi, è risultata essere del 100% per i sieri bovini e del 99,8% per quelli ovini nel metodo indiretto, e del 100% nel

metodo competitivo, sia nel caso dei sieri bovini sia di quelli ovini.

Le tecniche di rivelazione chemiluminescenti, non necessitando di alcun periodo di incubazione prima della misura, consentono di ridurre il tempo complessivo di analisi; inoltre, il trasferimento delle metodiche in micropiastre a maggiore densità (p.es. 384 pozzetti), potrebbe incrementare la produttività analitica, rendendo le procedure adatte per applicazioni HTS (*high throughput screening*).

Bibliografia

1. Anon. 1992. Decreto ministeriale 2 luglio 1992 n° 453. Regolamento concernente il piano nazionale per l'eradicazione della brucellosi negli allevamenti ovini e caprini. *Gazz Uff*, **276**, 23 novembre.
2. Anon. 1994. Decreto ministeriale 27 agosto 1994 n° 651. Regolamento concernente il piano nazionale per l'eradicazione della brucellosi negli allevamenti bovini. *Gazz Uff*, **277**, 26 novembre.
3. Anon. 1995. Decreto ministeriale 31 maggio 1995 n° 292. Regolamento recante modificazioni al Decreto ministeriale 2 luglio 1992 n° 453 concernente il piano nazionale per l'eradicazione della brucellosi negli allevamenti ovini e caprini. *Gazz Uff*, **169**, 21 luglio.
4. Commissione europea (CE) 2002. Regolamento (CE) n. 535/2002 della Commissione, del 21 marzo 2002, che modifica l'allegato C della direttiva 64/432/CEE del Consiglio e la decisione 2000/330 CE. *Off J*, **L 80**, 23/03/2002, 22-28 (eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:080:0022:0028:IT:PDF ultimo accesso 13 marzo 2008).
5. Gardner I.A. & Greiner M. 2000. Advanced methods for test validation and interpretation in veterinary medicine. Freie Universitat Berlin, UCDA VIS, 22-25.
6. Hendry D.M.F.D., M.J. Corbel & Stack R.A. 1985. *Brucella* antigen production and standardization. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Central Veterinary Laboratory, New Haw, Weybridge, 1-96.
7. Pazzagli M. 1996. La chemiluminescenza – sviluppo tecnologico ed attuali applicazioni in laboratorio. Edizioni Sorbona, Milano, 288 pp.
8. Portanti O., Tittarelli M., Di Febo T., Luciani M., Mercante M. T., Conte A. & Lelli R. 2006. Development and validation of a competitive ELISA kit for the serological diagnosis of ovine, caprine and bovine brucellosis. *J VetMed. B*, **53**, 494-498.
9. Roda A., Girotti S., Grigiolo B. & Ghini S. 1983. Bioluminescenza: teoria ed applicazioni analitiche. *Giorn Ital Chim Clin*, **8** (4), 309-369.
10. Roda A., Guardagli M., Pasini P., Mirasoli M. & Nichelini E. 2003. Recenti applicazioni della luminescenza in campo biomedico, ambientale e tossicologico. *Chim Industr*, **7**, 43-48.
11. Siegel S. & Castellan J. 1988. Nonparametric statistics. McGraw Hill Book Company, New York, 284-291.
12. Van Dyke K., Van Dyke C. & Woodfork K. (eds.) 2002. Luminescent biotechnology: instruments and applications. CRC Press, Boca Raton, 588 pp.
13. World Organisation for Animal Health (*Office International des Epizooties*: OIE) 2004. Bovine brucellosis, Chapter 2.3.1. *In* Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 5th Ed., OIE, Paris.