

# Standardizzazione di un test ELISA indiretto per la ricerca di anticorpi brucellari nel latte di bufala (*Bubalus bubalis*) in Italia

Manuela Tittarelli, Barbara Bonfini, Fabrizio De Massis, Armando Giovannini & Massimo Scacchia

## Riassunto

È stata valutato un test ELISA indiretto per rilevare la presenza di anticorpi brucellari nel latte di bufala (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758). L'accuratezza della prova è stata valutata su latte proveniente da allevamenti bufalini campani. Sono stati impiegati 100 campioni negativi provenienti da dieci allevamenti ufficialmente indenni della provincia di Salerno e 30 campioni positivi provenienti da tre allevamenti della provincia di Caserta con animali positivi ai test ufficiali e presenza di *Brucella abortus* biovar 1. La sensibilità della prova è stata del 100% (intervallo di confidenza [IC] del 90,8%-100%) e la specificità sui campioni di latte individuale è stata del 98% (IC 93%-99,4%). Al fine di simulare campioni di latte di massa provenienti da allevamenti infetti a varie prevalenze di infezione, sono state analizzate diluizioni da 1:10 a 1:100 di campioni di latte positivo in latte negativo. La probabilità di rilevare anticorpi in campioni di latte positivo è risultata superiore al 50% fino alla diluizione 1:50 in latte negativo. Considerando la consistenza media nazionale degli allevamenti bufalini, la probabilità di individuare l'infezione in un allevamento, ricorrendo alla prova ELISA su latte di massa, è risultata del 50% (IC 33,1%-66,9%) qualora nel latte di massa fosse presente il latte di un solo animale infetto.

## Parole chiave

*Brucella abortus*, Brucellosi, Bufalo, ELISA, Italia, Latte.

## Introduzione

In Italia, la legge vigente per l'eradicazione della brucellosi bovina e bufalina (7) è basata su test sierologici. Le prove di siero-agglutinazione rapida con antigene acido al Rosa Bengala (SAR) e di fissazione del complemento (FDC) vengono effettuate semestralmente su campioni di sangue individuale.

Per i bufali (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758), sono state applicate, nelle regioni italiane con alta prevalenza di brucellosi animale (Calabria, Campania, Puglia e Sicilia), speciali misure di controllo. In queste regioni è stata valutata la possibilità dell'uso di test sul latte in aggiunta ai test sierologici (8). Secondo le linee guida della task force nazionale per la brucellosi, per aumentare la sensibilità del sistema di controllo messo in atto, i test sul latte dovrebbero essere effettuati periodicamente.

In questo contesto, l'utilizzo di un test ELISA indiretto che individui la presenza di anticorpi anti-*Brucella* sul latte di massa di bufalo potrebbe aumentare la sensibilità del sistema diagnostico. Oltre alla sua elevata sensibilità, il test ELISA per la semplicità di esecuzione consente di eseguire il test anche su prelievi ripetuti a breve distanza di tempo, con la

conseguente possibilità di effettuare una diagnosi precoce dei focolai di brucellosi.

In un precedente studio (4), gli autori hanno presentato i risultati dello sviluppo e della validazione di un metodo ELISA per il latte di massa bovino (m-ELISA), standardizzato secondo quanto previsto dall'annesso C del Regolamento della Commissione (EC) 535/2002 del 21 marzo 2002 (2).

Il presente studio ha avuto lo scopo di standardizzare il metodo m-ELISA, già descritto per il latte di vacca (4), anche per i campioni di latte di bufala, determinando il cut-off, la sensibilità e la specificità del test per questa specie.

In genere, nelle attività di campo, i test sul latte non sono effettuati sui campioni di latte individuale ma su quello di massa. Pertanto, per simulare i campioni di latte di massa provenienti da allevamenti infetti con diverse prevalenze d'infezione sono state utilizzate anche diluizioni da 1:10 a 1:100 di campioni di latte positivo, in latte negativo, impiegando il metodo già descritto negli studi precedenti (4, 9).

## Materiali e metodi

### Campioni di latte

I campioni di latte negativo sono stati prelevati da 100 animali provenienti da 10 allevamenti bufalini ufficialmente indenni da brucellosi della provincia di Salerno. Gli animali sono stati contemporaneamente saggiati mediante test SAR e FDC, eseguiti in accordo con le direttive del Manuale OIE (13).

I campioni di latte positivo sono stati prelevati da 30 animali provenienti da tre allevamenti della provincia di Caserta infetti da *Brucella abortus* biovar 1. Tutti i campioni di latte sono stati conservati a -20°C fino all'esecuzione della prova.

Utilizzando il metodo già descritto in precedenti lavori (4, 9), i 30 campioni provenienti da animali infetti sono stati esaminati a varie diluizioni con latte negativo (da 1:10 a 1:100), al fine di valutare la sensibilità del metodo per i campioni di latte di massa.

### Standard di referenza

Sono stati prodotti controlli standard di riferimento: controllo fortemente positivo (C++) e controllo debolmente positivo (C+), aggiungendo gamma globuline seriche purificate di bufalo (provenienti da animale infetto) in un pool di campioni di latte negativo. Lo standard di riferimento negativo (C-) è stato prodotto utilizzando un campione di latte di massa bufalino proveniente da un allevamento ufficialmente indenne da brucellosi. Gli animali da cui è stato prelevato il latte per comporre il pool di latte negativo, sono risultati tutti negativi ai test sierologici ufficiali (SAR e FDC), eseguiti secondo le direttive descritte nel Manuale OIE (13).

La standardizzazione del kit m-ELISA è stata realizzata secondo quanto previsto dalla Decisione della Commissione 2008/984/EC del 10 dicembre 2008 (3), utilizzando i tre sieri standard dell'OIE (fortemente positivo, debolmente positivo e negativo) diluiti in latte negativo.

I controlli standard di riferimento sono stati liofilizzati in aliquote da 1,5 ml.

### m-ELISA

Per il test m-ELISA sono state utilizzate micropiastre NUNC-immuno™ Plate PolySorp™ Surface (NUNC™, Danimarca) attivate con 100 µl per pozzetto di antigene LPS diluito in tampone carbonato-bicarbonato 0,06 M pH 9,6, e incubate per una notte a temperatura ambiente. Dopo lavaggio con tampone salino (PBS 0,01M+ 0,05% Tween 20, pH 7,2, PBST), le piastre sono state saturate con 200 µl PBS + 1% di estratto di lievito e incubate per 1 h a temperatura ambiente. Dopo ulteriore lavaggio, ciascun campione è stato esaminato in duplicato dispensando 100 µl di latte per pozzetto. Dopo incubazione e lavaggio, in ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di anticorpo monoclonale anti-IgG bovine coniugato con perossidasi. Dopo un'ulteriore incubazione di 30 minuti a 37°C e lavaggio con PBST, in tutti i pozzetti sono stati aggiunti 100 µl di TMB (3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine) (Sigma, USA) e le piastre sono state incubate per 30 minuti a temperatura ambiente. La reazione è stata arrestata con 50 µl di acido solforico 0,5N e la

densità ottica risultante (DO) è stata misurata con un lettore per micropiastre alla lunghezza d'onda di 450 nm.

I risultati dei campioni, espressi come percentuale di positività (PP), sono stati calcolati utilizzando le DO medie, con la seguente formula:

$$PP = \frac{DO \text{ media campione} - DO \text{ media (C-)}}{DO \text{ media (C++)} - DO \text{ media (C-)}} \times 100$$

## Dati demografici

I dati demografici della popolazione italiana di bufali sono stati forniti dalla Banca Dati Nazionale (BDN).

## Analisi statistica

Il valore ottimale di cut-off è stato determinato utilizzando le curve ROC (*receiver operating characteristic*) (5, 10) con i valori di PP dei campioni di latte esaminati. Il valore di cut-off ottenuto è stato quindi utilizzato per calcolare il valore soglia positivo/negativo. I campioni di latte sono stati classificati positivi con valore di PP maggiore o uguale al valore soglia, negativi in caso contrario. La ripetibilità e la riproducibilità del metodo, espressi come coefficiente di variazione percentuale (CV%), sono stati determinati analizzando, rispettivamente, 33 e 66 repliche di un campione positivo.

Per l'analisi di ciascun livello di diluizione, è stata applicata un'inferenza Bayesiana (11, 12). Per ciascun livello di diluizione è stato calcolato il 95% dell'Intervallo di credibilità bayesiano (IC) della sensibilità. I risultati dell'inferenza Bayesiana sono stati valutati in relazione alla possibile applicazione del test in condizioni di campo in Italia, considerando le dimensioni degli allevamenti, il numero atteso di animali da latte che contribuiscono a formare il latte di massa e la prevalenza attesa nel caso limite di un singolo animale infetto produttore di latte.

Un modello d'analisi di regressione logistica è stato usato per calcolare la probabilità di ottenere un risultato positivo in relazione al logaritmo delle diluizioni di latte. Il numero di risultati positivi e negativi è stato utilizzato

come variabile di output e il logit delle diluizioni di latte come variabile predittiva. La bontà di adattamento del modello è stata valutata mediante il metodo di Osius e Rojek (6).

## Risultati

Il calcolo della curva ROC ha fornito un valore di cut-off pari a 17,1 PP, valore in relazione del quale la sensibilità e la specificità del test m-ELISA sono risultate, rispettivamente, 100% (IC 90,8%-100%) e 98% (IC 93%-99,4%) (Figure 1 e 2).

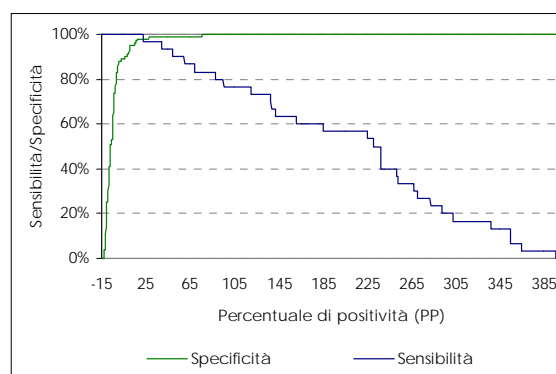


Figura 1  
Curva ROC del test m-ELISA calcolata su 100 campioni individuali di latte negativo e 30 campioni individuali di latte positivo

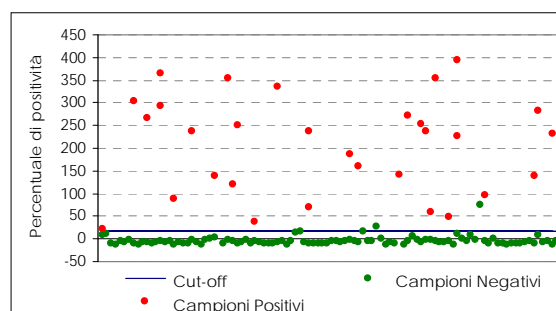


Figura 2  
Distribuzione dei valori di Percentuale di positività (PP) del test m-ELISA su 100 campioni individuali di latte negativo e 30 campioni individuali di latte positivo (Cut-off = 17.1)

La distribuzione dell'incertezza relativa alla sensibilità e alla specificità, in relazione alle dimensioni del campione, sono rappresentate, rispettivamente, nelle Figure 3 e 4. I test di

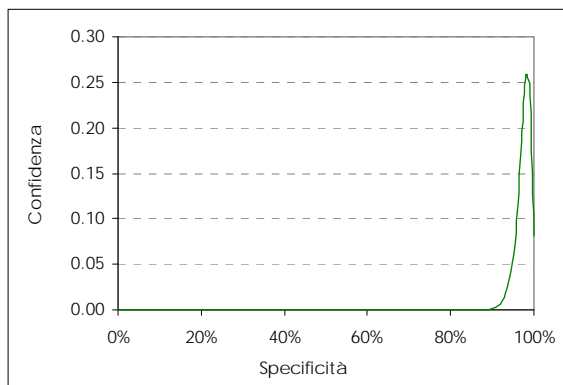


Figura 3  
Sensibilità del test m-ELISA su 30 campioni individuali di latte positivo

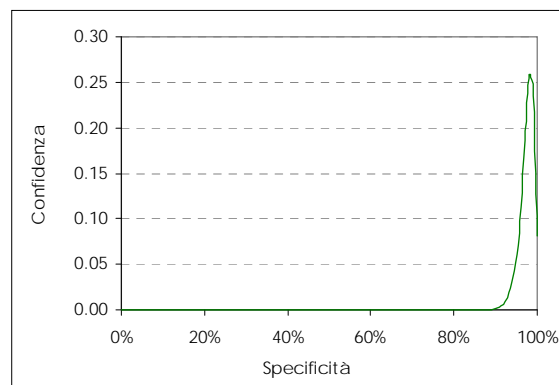


Figura 4  
Specificità del test m-ELISA su 100 campioni individuali di latte negativo

ripetibilità e riproducibilità hanno assunto, rispettivamente, valori del 2,6% e 2,9%.

I risultati delle diluizioni in latte negativo dei 30 campioni di latte infetto individuale, espressi come percentuale di campioni correttamente identificati come positivi alla diluizione data, sono riportati in Tabella I e Figura 5, con i rispettivi IC al 95%.

I risultati delle diluizioni dei campioni di latte hanno mostrato che la probabilità di individuare anticorpi è pari al 50% fino alla diluizione 1:50.

La probabilità di ottenere un risultato positivo in relazione alla diluizione del campione (latte individuali positivi) ha seguito un modello di regressione logistica definito da un'intercetta ( $\beta_0$ ) = 4,152 (Errore Standard [ES]=0,68;  $p < 0,001$ ) e una log diluizione ( $\beta_1$ ) = 2,59 (ES = 0,402;  $p < 0,001$ ) (Figura 6). Il modello è risultato significativo all'analisi di devianza ( $p < 0,001$ ), così come alla valutazione della bontà di adattamento ( $p = 0,388$ ).

## Discussione e conclusioni

Il Centro di Referenza Nazionale per le brucellosi, nell'ambito di uno dei suoi compiti istituzionali, ha standardizzato un test ELISA specifico per il latte di bufala (8). Il test m-ELISA sviluppato ha mostrato una sensibilità del 100% quando utilizzato su campioni di latte individuale. In merito è necessario tener conto dell'ampio intervallo di confidenza calcolato per la distribuzione dei risultati positivi (IC 90,8%-100%) a causa del campionamento utilizzato. Uno dei maggiori vantaggi dell'utilizzo del test ELISA nelle attività di eradicazione della brucellosi è il suo utilizzo su campioni di latte di massa. Pertanto, è importante definire l'effetto della diluizione dei campioni di latte sulle performance del test.

Tuttavia, quando si valutano i risultati dell'inferenza bayesiana in relazione a una possibile applicazione del test in condizioni di

Tabella I

Percentuali di campioni di latte correttamente individuate come positive dal test m-ELISA a differenti diluizioni, con limiti di credibilità superiore e inferiore al 95%

Diluizioni	1:1	1:10	1:20	1:30	1:40	1:50	1:60	1:70	1:80	1:90	1:100
LCS	100%	90%	75%	73%	73%	67%	61%	61%	51%	41%	34%
%	100%	80%	60%	57%	57%	50%	43%	43%	33%	23%	17%
LCI	91%	63%	42%	39%	39%	33%	27%	27%	19%	12%	7%

LCS limite di credibilità superiore al 95%  
LCI limite di credibilità inferiore al 95%

campo, devono essere considerati la dimensione degli allevamenti (in termini di numero medio di animali in lattazione componenti gli allevamenti) e la prevalenza nel caso ipotetico di un singolo animale infetto produttore di latte.

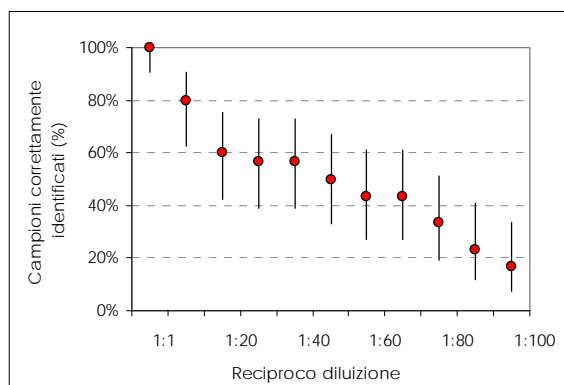


Figura 5 Risultati delle diluizioni di 30 campioni individuali di latte positivo (percentuale di campioni correttamente identificati come positivi dal test m-ELISA e intervalli di credibilità al 95%)

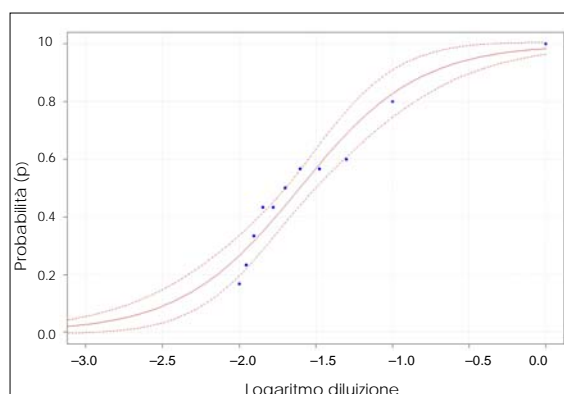


Figura 6 Modello di regressione logistica e intervalli di credibilità al 95% di diluizioni di campioni individuali di latte positivo in latte negativo e probabilità di ottenere un risultato positivo al test m-ELISA

Quando utilizzato su campioni diluiti, la sensibilità del test m-ELISA è risultata pari al 50% (IC 33,1%-66,9% alla diluizione 1:50 (Tabella I; Figura 5). La probabilità di identificare l'infezione in un singolo animale da latte di massa risulta, pertanto, superiore al 50% fino alla diluizione 1:50. Questo scenario potrebbe anche riguardare il caso di un singolo bufalo infetto produttore di latte in un allevamento in cui 50 bufali sono in lattazione.

Comunque, in considerazione della fertilità osservata sperimentalmente nel bufalo da alcuni autori (46,7%; IC 38,9%-54,6%) (1) tale scenario sarebbe rappresentato dall'analisi del latte di massa proveniente da un allevamento composto da 107 capi (IC 92 - 129 capi).

Qualora si considerasse la dimensione media degli allevamenti di bufali in Italia, a ottobre 2010, pari a 121 animali con un minimo di un capo nella provincia autonoma di Bolzano e un massimo di 180 capi nella regione Campania (Figura 7), utilizzando il test m-ELISA la probabilità di individuare allevamenti con un solo animale infetto che contribuisce a comporre il latte di massa sarebbe del 50%, con un range che va dal 100% di Bolzano al 33% della Campania.

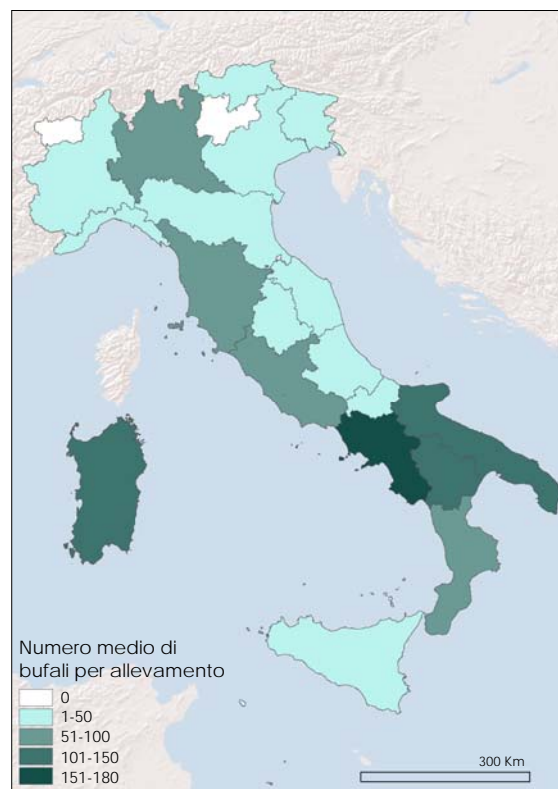


Figura 7 Distribuzione del numero di bufali per allevamento nelle regioni Italiane

La semplicità di esecuzione del test m-ELISA, comunque, consente di effettuare esami ripetuti che possono incrementare la sensibilità del sistema diagnostico adottato e, quindi, permettere l'individuazione precoce di focolai di brucellosi. Ulteriori studi sono necessari per

stimare l'incremento del sistema diagnostico, in termini di sensibilità, in seguito a ripetuti campionamenti di latte di massa.

## Ringraziamenti

---

Si ringrazia il dott. Romolo Salini per la preziosa collaborazione relativa alla valutazione statistica.

## Bibliografia

---

1. Campanile G., Neglia G., Grassi C., Gasparri B., Di Palo R. & Zicarelli G. 2005. Influence of body condition score, blood ammonia and serum urea levels on conception rate in Italian Mediterranean buffaloes. *Ital J Anim Sci*, **4**, 313-315.
2. Commissione delle Comunità Europee (CE) 2002. Regolamento (CD) 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/EC. *Off J*, **L 080**, 23.03.2002, 22-28 ([eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:080:0022:0028:it:pdf](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:080:0022:0028:it:pdf) ultimo accesso 21 dicembre 2010).
3. Commissione delle Comunità Europee (CE) 2008. Decisione della Commissione del 10 dicembre 2008 che modifica l'allegato C della direttiva 64/432/CEE del Consiglio e la decisione 2004/226/EC per quanto riguarda i test diagnostici per la brucellosi bovina. *Off J*, **L 352**, 31.12.2008, 38-45 ([eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:352:0038:0045:it:pdf](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:352:0038:0045:it:pdf) ultimo accesso 21 dicembre 2010).
4. De Massis F., Bonfini B., Zaghini M. & Tittarelli M. 2005. Valutazione di un test ELISA indiretto per la ricerca di anticorpi brucellari nel latte bovino. *Vet Ital*, **41**, 83-89 ([www.izs.it/vet\\_italiana/2005/41\\_2/83.pdf](http://www.izs.it/vet_italiana/2005/41_2/83.pdf) ultimo accesso 21 dicembre 2010).
5. Gardner I.A. & Greiner M. 1999. Advanced methods for test validation and interpretation in veterinary medicine. Freie Universitat Berlin, 74 pp.
6. Hosmer D.W. & Lemeshow S. 2000. Applied logistic regression, 2<sup>nd</sup> Ed. John Wiley & Sons, New York, 373 pp.
7. Italia, Ministero della Salute 1994. Decreto Ministeriale 27 agosto 1994, n. 651. Regolamento concernente il piano nazionale per la eradicazione della brucellosi negli allevamenti bovini. *Gazz Uff*, **277**, 26 novembre 1994.
8. Italia, Ministero della Salute 2006. Ordinanza del Ministero della Salute 14 novembre 2006. Misure straordinarie di polizia veterinaria in materia di tubercolosi, brucellosi bovina e bufalina, brucellosi ovi-caprina, leucosi in Calabria, Campania, Puglia e Sicilia. *Gazz Uff*, **285**, 7 dicembre 2006.
9. Nielsen K., Smith P., Gall D., Perez B., Cosma C., Mueller P., Trottier J., Cote G., Boag L. & Bosse J. 1996. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in milk. *Vet Microbiol*, **52**, 165-173.
10. Siegel S. & Castellan N.J. 1988. Nonparametric statistics for the behavioral sciences, 2<sup>nd</sup> Ed. McGraw-Hill, New York. 312 pp.
11. Sivia D.S. 1996. Data analysis. A Bayesian tutorial. Clarendon Press, Oxford, 189 pp.
12. Vose D. 2000. Risk analysis: a quantitative guide, 2<sup>nd</sup> Ed. John Wiley & Sons, Chichester, 418 pp.
13. World Organisation for Animal Health (*Office International des Épizooties*: OIE) 2010. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. OIE, Paris ([www.oie.int/eng/normes/mmanual/a\\_summry.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_summry.htm) ultimo accesso 21 dicembre 2010).