



ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Sviluppo di metodi immunologici innovativi per la diagnosi della brucellosi suina

Teramo, 09 luglio 2012
Mirella Luciani Tiziana Di Febo

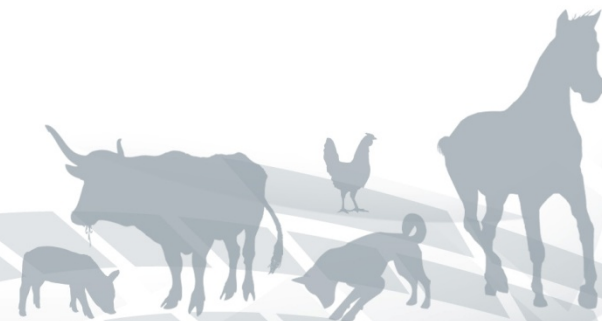
Auditorium Parco della Scienza




BRUCELLA



- Gram negativo
- Forma bacillare o cocco-bacillare
- Parassita endocellulare facoltativo
- Aerobio, immobile, asporigeno, senza capsula
- Sviluppo 20-40°C (optimum 37°C)
- Alcuni ceppi richiedono 5-10% CO₂
- Crescita lenta, necessità di terreni di coltura arricchiti
- Forma S (*smooth*) o R (*rough*) delle colonie



BRUCELLA SUIS

- 
- Biovar 1 suini
 - Biovar 2 suini, lepri
 - Biovar 3 suini
 - Biovar 4 renne
 - Biovar 5 roditori selvatici

Patogene per l'uomo: Biovar 1 e Biovar 3

Isolamento *Brucella suis* in Italia (1995-2007)

- *B. suis* bv 1 (cinghiali)
- *B. suis* bv 2 (maiali, lepri, cinghiali)

(*Dondo, 2003; Gennero, 2006; Bergagna, 2009*)





ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO


CONTROLLO BRUCELLOSI NEGLI ANIMALI



- Controllo sierologico allevamenti (bovini e bufalini età > 12 mesi, ovi-caprini età > 6 mesi): SAR, FdC
- Restrizione movimentazione greggi infette
- Abbattimento obbligatorio
- Vaccinazione (vietata in Italia)
- Legislazione eradicazione brucellosi in bovini, bufalini e ovi-caprini: DM 453/1992, DM 651/1994, DM 292/1995, DM 14/11/2006



CONTROLLO BRUCELLOSI NEI SUINI

- 
- Brucellosi suina considerata eradicata negli anni '70 e ricomparsa negli anni '90 (suini allevati all'aperto: contaminazione da lepri e cinghiali selvatici)
 - Controlli non obbligatori nei suini (solo per commercio intra-comunitario animali, seme ed embrioni): SAR



PROBLEMATICHE BRUCELLOSI SUINA:

- Carezza di dati epidemiologici disponibili
- Crescita delle popolazioni di cinghiali selvatici e loro utilizzo di ambienti antropizzati
- Aumento del rischio di contrarre la brucellosi per animali domestici e uomo
- Mancanza di test standardizzati per la diagnosi di brucellosi per la specie suina
 - Test disponibili: SAR e ELISA sviluppati per i bovini
- Mancanza di un siero suino positivo internazionale di riferimento da utilizzare per la calibrazione dei test diagnostici per la diagnosi di brucellosi suina



OBIETTIVI DEL PROGETTO

- Valutare l'utilizzo delle metodiche ELISA, da affiancare alla SAR, per la diagnosi di brucellosi nella specie suina e, in caso di risultati positivi, produrre un kit diagnostico ELISA pronto all'uso
- Sviluppare metodi innovativi sensibili e specifici per la diagnosi di brucellosi suina per la conferma dei sieri positivi





Sviluppo di metodi immunologici innovativi per la diagnosi della brucellosi suina (MSRCTE0705)

- Sviluppo e valutazione di:
 - test ELISA competitivo
 - test ELISA indiretto
 - test DELFIA (Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescence Immunoassay)
- Valutazione per l'uso con sieri suini di un test FPA commerciale validato con sieri bovini "Brucella abortus antibody test kit" DIACHEMIX



TEST ELISA E DELFIA: FASI DELLO SVILUPPO

Produzione reagenti:

- Produzione anticorpi monoclonali e loro caratterizzazione
 - ✓ MAb anti-LPS-*Brucella* (LPS di *B. melitensis* biotipo 2)
 - ✓ MAb anti-IgG suine
- Produzione antigene per il coating delle piastre
 - ✓ LPS da *Brucella suis* biovar 1 (antigene omologo)



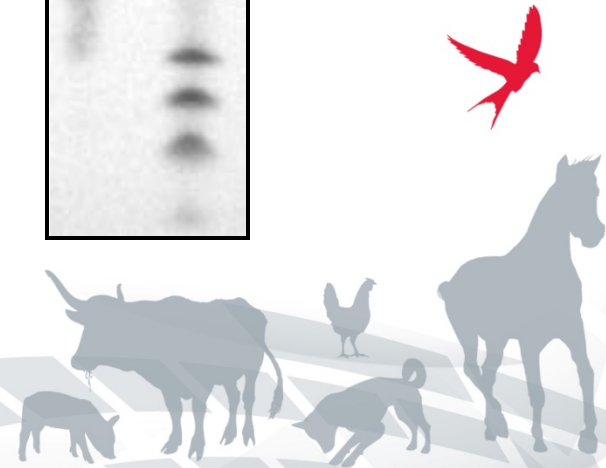
CARATTERISTICHE MA**b** 4B5A vs LPS-*Brucella*

Isotipo: IgG2a anti κ

Specificità: *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*

Western blotting: LPS di *Brucella* spp

Utilizzato per lo sviluppo di c-ELISA



CARATTERISTICHE MAb 10C2G5 vs IgG suine

Isotipo: IgG1 anti κ

Specificità: IgG suine, IgM suine

Coniugato con perossidasi e utilizzato per lo sviluppo di i-ELISA



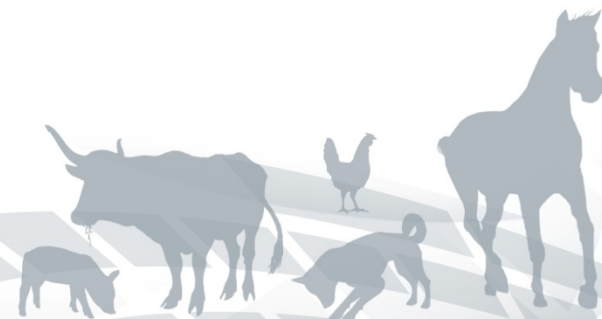
TEST ELISA E DELFIA: FASI DELLO SVILUPPO

Fase 1: Standardizzazione e definizione preliminare delle performances del test

- ✓ Ottimizzazione concentrazione reagenti (titolazioni crociate)
- ✓ Ottimizzazione tempi e temperature di incubazione
- ✓ Cut-off, Specificità diagnostica, Sensibilità diagnostica, Ripetibilità, Riproducibilità intra-laboratorio

Fase 2: Trasformazione in kit diagnostico pronto all'uso

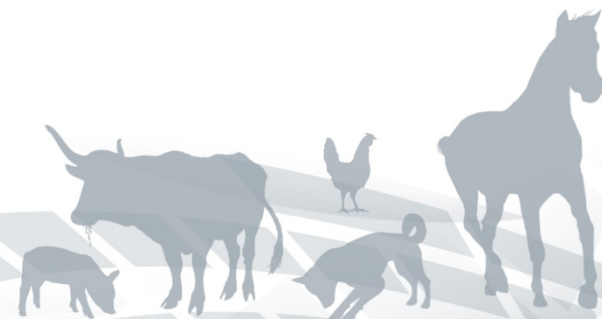
- ✓ Prove di stabilità su piastre e reagenti
- ✓ Produzione di lotti sperimentali



CAMPIONI UTILIZZATI

Nella sperimentazione e' stato utilizzato un pannello sieri di maiale e cinghiale così composto:

- 106 sieri positivi (Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; Croatian Veterinary Institute, Zagreb)
- 1036 sieri negativi (Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; Istituto G. Caporale)
- **Controllo positivo:** siero suino da infezione sperimentale con *B.suis* biovar 2



RISULTATI

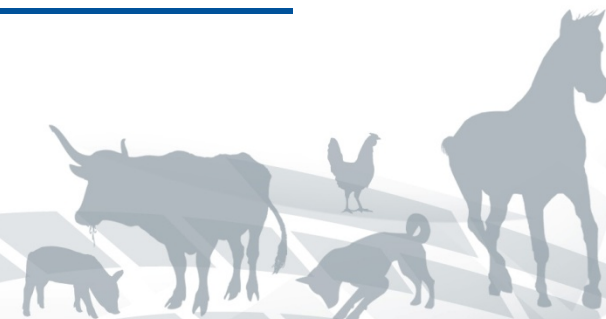




ELISA COMPETITIVA

		Isolamento di <i>Brucella</i> (TEST A)		
		positivi	negativi	<i>totale</i>
c-ELISA-Brucellosi (TEST B)	positivi	80	0	80
	negativi	0	1036	1036
	<i>totale</i>	80	1036	1116
CUT-OFF: 61.0% (B/B₀%)				
	Percentuale	Limite di confidenza inferiore	Limite di confidenza superiore	
<i>Sensibilità del TEST B</i>	100	96.4	100	
<i>Specificità del TEST B</i>	100	99.7	100	

*Limiti di confidenza al 95% di probabilità



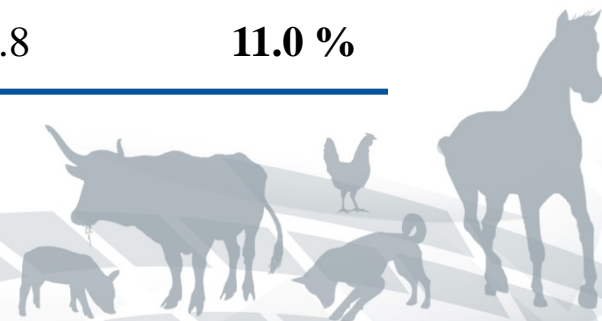
ELISA COMPETITIVA

RIPETIBILITA'

	N° repliche	Media (B/B ₀ %)	Deviazione standard	CV%
Siero positivo	44	9.1	0.7	7.7 %
Siero negativo	44	119.2	10.1	8.4 %

RIPRODUCIBILITA' INTRA-LABORATORIO

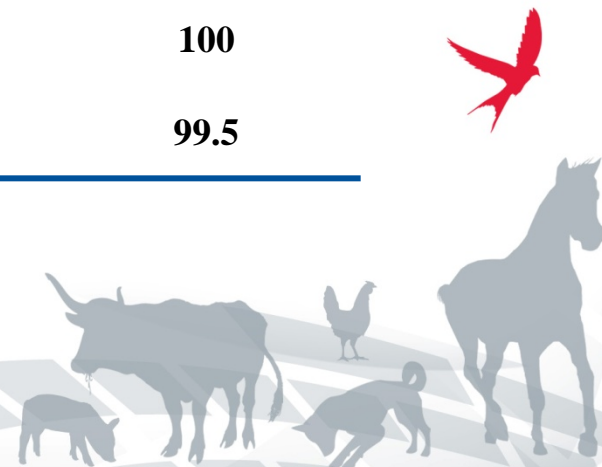
	N° repliche	Media (B/B ₀ %)	Deviazione standard	CV%
Siero positivo	124	8.8	0.7	8.0 %
Siero negativo	124	107.7	11.8	11.0 %



ELISA INDIRECTA

		Isolamento di <i>Brucella</i> (TEST A)		
		positivi	negativi	<i>totale</i>
i-ELISA-Brucellosi (TEST B)	positivi	106	9	115
	negativi	0	973	973
	<i>totale</i>	106	982	1088
CUT-OFF: 21.7% (PP%)				
	Percentuale	Limite di confidenza inferiore*	Limite di confidenza superiore*	
<i>Sensibilità del TEST B</i>		100	97.2	100
<i>Specificità del TEST B</i>		99.1	98.3	99.5

*Limiti di confidenza al 95% di probabilità



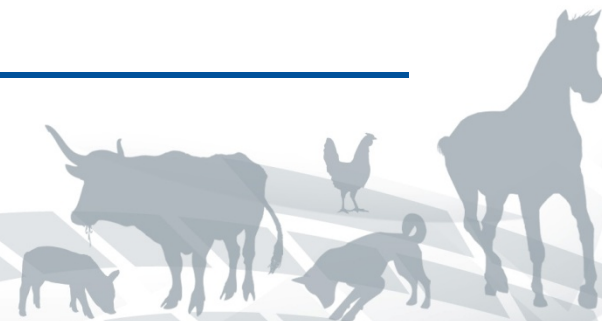
ELISA INDIRECTA

RIPETIBILITA'

	N° repliche	Media (PP%)	Deviazione standard	CV% ¹
Siero positivo	132	99.2	11.7	11.8 %

RIPRODUCIBILITA' INTRA-LABORATORIO

	N° repliche	Media (PP%)	Deviazione standard	CV% ¹
Siero positivo	264	104.2	13.8	13.2 %



DELFLIA

Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescence Immunoassay

		Isolamento di <i>Brucella</i> (TEST A)		
		positivi	negativi	<i>totale</i>
DELFLIA (TEST B)	positivi	45	20	65
CUT-OFF: 37.0% (B/B₀%)	negativi	15	192	207
	<i>totale</i>	60	212	272

	Percentuale	Limite di confidenza inferiore*	Limite di confidenza superiore*
<i>Sensibilità del TEST B</i>	75.0	-	-
<i>Specificità del TEST B</i>	91.0	-	-

*Limiti di confidenza al 95% di probabilità



FPA

Fluorescence Polarization Assay

		Isolamento di <i>Brucella</i> (TEST A)		
		positivi	negativi	<i>totale</i>
FPA (TEST B)	positivi	77	0	77
CUT-OFF: 99.5 (mP)	negativi	0	750	750
	<i>totale</i>	77	750	827

	Percentuale	Limite di confidenza inferiore*	Limite di confidenza superiore*
<i>Sensibilità del TEST B</i>	100.0	96.2	100.0
<i>Specificità del TEST B</i>	100.0	99.2	100.0

*Limiti di confidenza al 95% di probabilità



IN CONCLUSIONE...

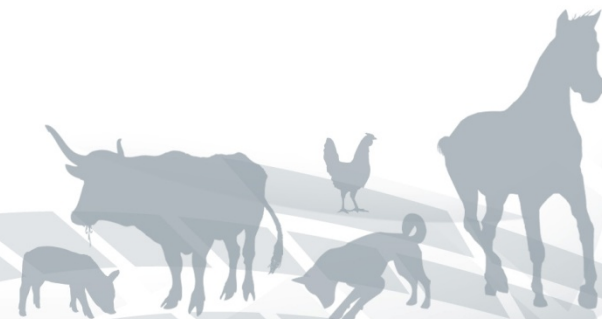
- I due test ELISA sviluppati dall'ICT e il test FPA commerciale applicato ai suini mostrano elevati valori di sensibilità, specificità ($Se = 100\%$; $Sp \geq 99.0\%$) e riproducibilità
- I tre test potrebbero essere utilizzati in parallelo come test di screening per la brucellosi suina



IN CONCLUSIONE ...

- Il test DELFIA non ha dato valori soddisfacenti di sensibilità e specificità (Se = 75.0%, Specificità = 91.0%)
- L'europro necessario per la marcatura degli anticorpi ha alti costi, inoltre sono necessari strumenti dedicati alla metodica

Per tali motivi non prevediamo un utilizzo del test DELFIA nella diagnosi di brucellosi nel prossimo futuro.



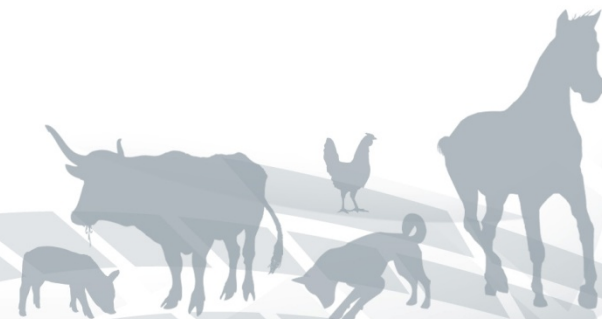
IN CONCLUSIONE ...

E' necessario comunque:

- Utilizzare i tre test su un numero più ampio di campioni per valutarne la reale performance
- Utilizzare i tre test in condizioni di campo (focolai di brucellosi suina, campioni positivi per *Yersinia enterocolitica* O:9 ma non per *Brucella* spp)

E' inoltre necessario:

- Calibrare i tre test sul siero suino positivo di riferimento OIE quando questo sarà disponibile



Development and evaluation of diagnostic tests for the serological diagnosis of brucellosis in swine

T. Di Febo, M. Luciani, O. Portanti, B. Bonfini, R. Lelli,
M. Tittarelli

Veterinaria Italiana, 2012, 48 (2)



GRAZIE PER L'ATTENZIONE

