



ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO



**CRN Brucellosi**

Centro di Referenza Nazionale

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

**“La Brucellosi tra diagnostica e ricerca”, Teramo 11-12 ottobre 2012**

**Tiziana Di Febo**



## *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

- Sud America, Asia: Biovar 1
- Stati Uniti, Australia, Cina: Biovar 1, Biovar 3
- Europa: Biovar 2

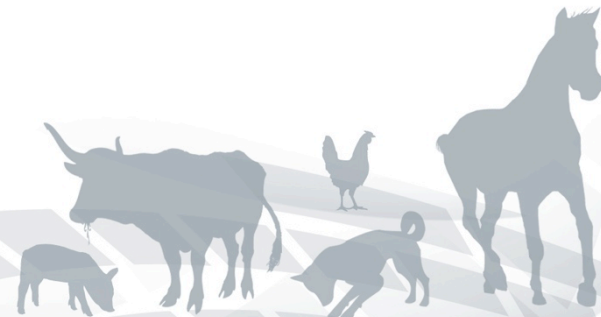


# *Brucella suis* in Italia

## *Bibliografia*

- **1983-1984: Toscana, Riserva di San Rossore**
- Studio sulla popolazione di daini (*Dama dama*) e cinghiali
- 4 daini ed 1 cinghiale positivi per *Brucella* spp. alla FdC, ma negativi al plate agglutination test
- I 5 sieri sono stati considerati falsi positivi

Giovannini A., Cancellotti F.M., Turilli C. & Randi E. 1988. Serological investigation for some bacterial and viral pathogens in fallow deer (*Cervus dama*) and wild boar (*Sus scrofa*) of the San Rossore Preserve, Tuscany, Italy. *J. Wildl. Dis.*, **24** (1), 127-132.



# *Brucella suis* in Italia

## *Bibliografia*

- **1995 - Italia meridionale:** isolamento di *B.suis* biovar 2 da una lepre (importazione lepri dall'Est Europa )
- **2000 - Sardegna:** isolamento di *B.suis* biovar 2 in un allevamento di maiali
- **2002 - Piemonte:** isolamento di *B.suis* biovar 1 da cinghiali

Dondo A., Grattarola C., Gennero S., Zoppi S. & Di Giannatale E. 2003. Osservazioni preliminari sulla presenza di *Brucella suis* biovar 1 nel cinghiale in Piemonte. *Progr. Vet.*, **3**, 112-116.

Quaranta V., Farina R., Poli A., Cerri D. & Palazzo L. 1995. Sulla presenza di *Brucella suis* biovar 2 nella lepre in Italia. *Selezione Veterinaria*, **36**: 953-958.



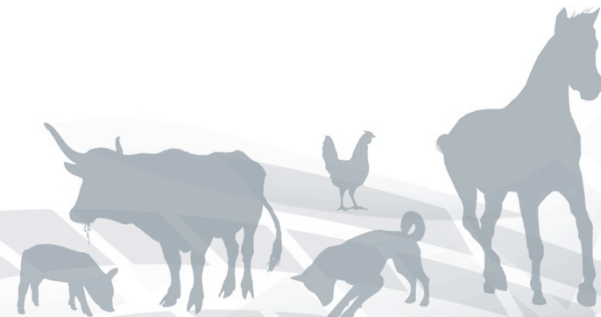
# *Brucella suis* in Italia

## *Bibliografia*

- **2001-2007 Piemonte:** studio di sorveglianza sulle popolazioni di cinghiali.
- Isolamento di *B. suis* biovar 2.

Bergagna S., Zoppi S., Ferroglio E., Gobetto M., Dondo A., Di Giannatale E., Gennero M.S. & Grattarola C. 2009. Epidemiologic survey for *Brucella suis* biovar 2 in a wild boar (*Sus scrofa*) population in Northwest Italy. *J. Wildl. Dis.*, **45** (4), 1178-1181.

Gennero M.S., Grattarola C., Bergagna S., Zoppi S., Barbaro A. & Dondo A. 2006. Trend of *Brucella suis* infection in wild boar in Piedmont Region (2002-2005). *Epidémiol. et santé anim.*, **49**, 59-62.

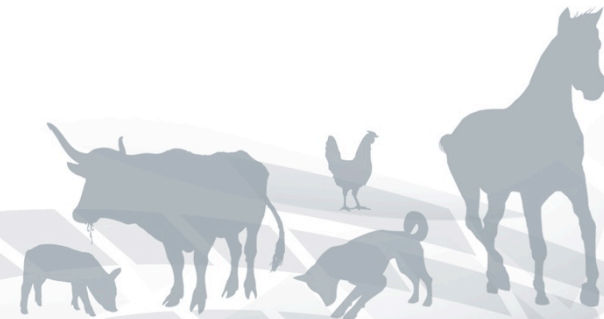


# *Brucella suis* in Italia

## *Bibliografia*

- **2003 Toscana:** studio di sorveglianza sulle popolazioni di cinghiali.
- Tutti i cinghiali testati sono risultati negativi per *Brucella* al test Rosa Bengala e all'ELISA indiretta.

Ebani V.V., Cerri D., Poli A. & Andreani E. 2003. Prevalence of *Leptospira* and *Brucella* antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) in Tuscany, Italy. *J. Wildl. Dis.*, **39** (3), 718-722.



# *Brucella suis* in Italia

## *Bibliografia*

- **2005-2006 Campania:** studio di sorveglianza sulle popolazioni di cinghiali.
- Alcuni cinghiali sono risultati positivi per *Brucella* spp. in ELISA competitiva.
- Positività a *Brucella suis* ???

Montagnaro S., Sasso S., De Martino L., Longo M., Iovane V., Ghiurmino G., Pisanelli G., Nava D., Baldi L. & Pagnini U. 2010. Prevalence of antibodies to selected viral and bacterial pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) in Campania Region, Italy. *J. Wildl. Dis.*, 46 (1), 316-319.



# *Brucella suis* in Italia

## *Bibliografia*

### Riassumendo...

**In Italia nel periodo 1995-2007 sono state isolate:**

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

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







# *Brucella suis in Italia*

## *Bibliografia*

 **CRN Brucellosi**  
Centro di Referenza Nazionale

## **European Food Safety Authority (EFSA)**

AA.VV. 2009. Porcine brucellosis (*Brucella suis*).

Scientific opinion of the Panel on animal health and welfare (Question No EFSA-Q-2008-665).

*EFSA Journal*, 1144, 1-112.



## 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
- Attualmente in Italia non viene effettuato un piano di sorveglianza per la brucellosi suina



# Obiettivi del progetto MSRCTE0705

- 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: 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 MAb 4B5A vs LPS-*Brucella*

Isotipo: IgG2a anti  $\kappa$

- Specificità: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*
- Nessuna cross-reazione con *Brucella ovis*
- Utilizzato nello sviluppo della c-ELISA e del test DELFIA



# Caratteristiche MAb 10C2G5 vs IgG suine

Isotipo: IgG1 anti  $\kappa$

- Specificità: IgG suine, IgM suine
- Utilizzato per lo sviluppo della i-ELISA



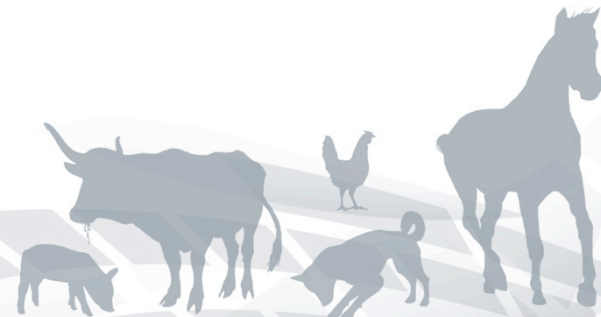
# Test ELISA e DELFIA: fasi dello sviluppo

Fase 1: Standardizzazione e definizione preliminare delle performances del test

- ✓ Ottimizzazione concentrazione reagenti (titolazioni crociate)
- ✓ Ottimizzazione tempi e temperature di incubazione
- ✓ Calcolo 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





ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

# ELISA competitiva

 **CRN Brucellosi**  
Centro di Referenza N

## Isolamento di *Brucella* (TEST A)

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

\*Limiti di confidenza al 95% di probabilità



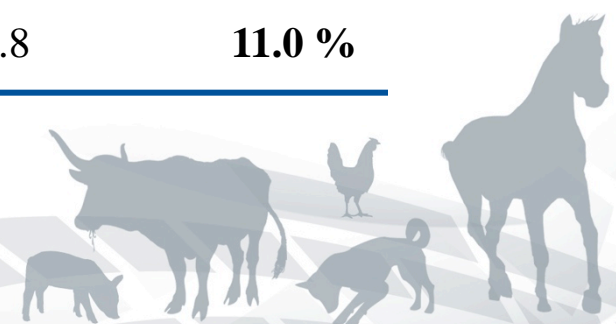
# ELISA competitiva

## RIPETIBILITA'

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

## RIPRODUCIBILITA' INTRA-LABORATORIO

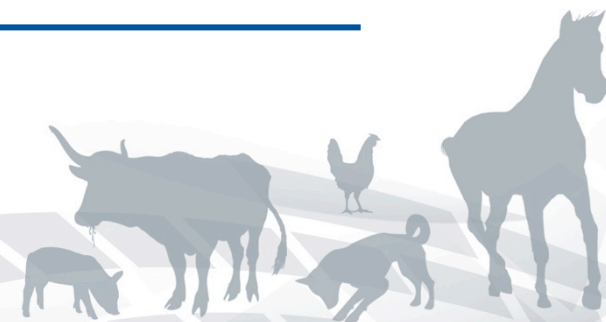
	N° repliche	Media (B/B <sub>0</sub> %)	Deviazione standard	CV%
<b>Siero positivo</b>	124	8.8	0.7	<b>8.0 %</b>
<b>Siero negativo</b>	124	107.7	11.8	<b>11.0 %</b>



# ELISA indiretta

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

\*Limiti di confidenza al 95% di probabilità



# ELISA indiretta

## RIPETIBILITA'

	N° repliche	Media (PP%)	Deviazione standard	CV% <sup>1</sup>
<b>Siero positivo</b>	132	99.2	11.7	<b>11.8 %</b>

## RIPRODUCIBILITA' INTRA-LABORATORIO

	N° repliche	Media (PP%)	Deviazione standard	CV% <sup>1</sup>
<b>Siero positivo</b>	264	104.2	13.8	<b>13.2 %</b>



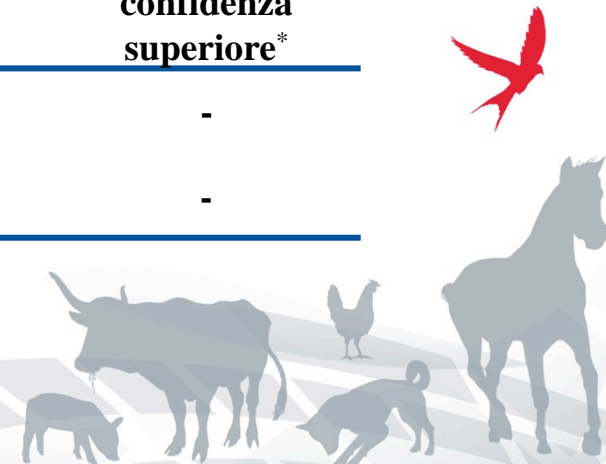
# DELFLIA

## Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescence Immunoassay

	Isolamento di <i>Brucella</i> (TEST A)			
	positivi	negativi	<i>totale</i>	
<b>DELFLIA (TEST B)</b>				
	positivi	<b>45</b>	<b>20</b>	<b>65</b>
<b>CUT-OFF: 37.0% (B/B<sub>0</sub>%)</b>	negativi	<b>15</b>	<b>192</b>	<b>207</b>
	<i>totale</i>	<b>60</b>	<b>212</b>	<b>272</b>

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

\*Limiti di confidenza al 95% di probabilità



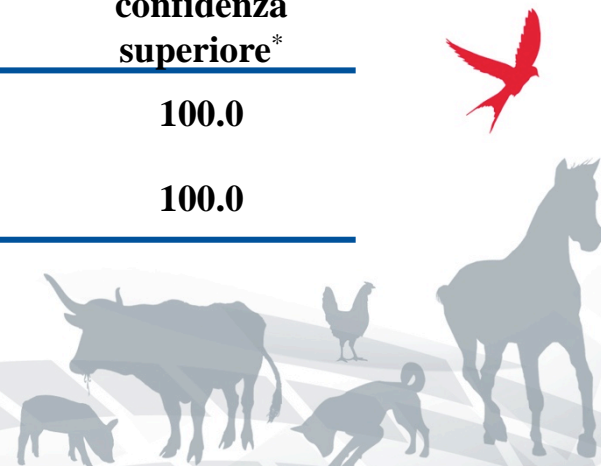
# FPA

## Fluorescence Polarization Assay

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



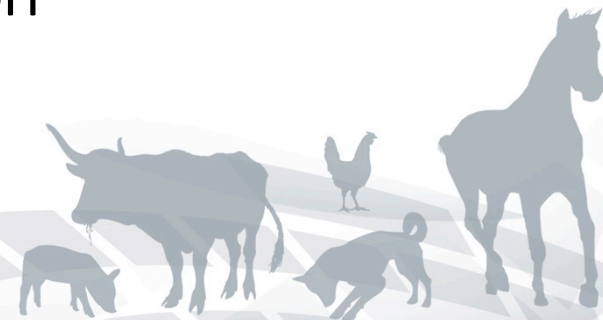
## In conclusione...

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 verrà distribuito ai laboratori





# 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**

