

Valutazione di un test ELISA indiretto per la ricerca di anticorpi brucellari nel latte bovino

F. De Massis, B. Bonfini, M. Zaghini & M. Tittarelli

Riassunto

È stata sviluppata dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo & del Molise «G. Caporale» (IZSA&M) un'ELISA indiretta per rivelare la presenza di anticorpi brucellari nel latte bovino. Il metodo prevede l'utilizzo di un anticorpo monoclonale specifico per un epitopo di IgG₁ bovino e soddisfa i requisiti stabiliti dalla Commissione Europea. L'accuratezza della prova è stata valutata su campioni di latte provenienti da allevamenti bovini abruzzesi e molisani. I campioni negativi provenivano da 1250 allevamenti ufficialmente indenni della Regione Molise. I campioni positivi provenivano da tre allevamenti delle regioni Abruzzo e Molise nei quali erano presenti animali positivi ai test ufficiali ed era stata isolata *Brucella abortus*. La specificità della prova è stata del 99,8% (con un Intervallo di Confidenza [IC] di 99,6%-99,9%), mentre la sensibilità è stata del 100% (IC 91,2%-100%). La probabilità di rivelare anticorpi in campioni di latte positivo diluito in latte negativo è superiore al 50% fino alla diluizione 1:256. Nella popolazione bovina da latte studiata con il presente lavoro, la probabilità di identificare come positivo un allevamento infetto è di 88,6% (IC 73,9% - 95,3%).

Parole chiave

Bovini - *Brucella abortus* - Brucellosi - Controllo - Enzyme-linked immunoadsorbent assay (ELISA) - Italia - Latte.

Introduzione

Il recepimento della Direttiva 97/12/CE (3), con il Decreto Legislativo n. 196 del 22 maggio 1999, introduce la possibilità per i territori e gli allevamenti di uno Stato Membro di ottenere e mantenere la qualifica di «ufficialmente indenne» da brucellosi bovina attraverso prove di laboratorio effettuate sul latte di massa.

Tale possibilità, rispetto alle prove sierologiche, determina significativi vantaggi d'ordine economico e di razionalizzazione delle risorse umane.

L'esecuzione di prove di laboratorio sul latte di massa consentirebbe di diminuire il numero di prove di laboratorio e di prelievi necessari per singolo allevamento, con il conseguente abbattimento dei relativi costi. Inoltre, mentre il prelievo per i controlli sierologici deve essere eseguito da personale veterinario (in Italia), i prelievi di latte per la diagnosi della brucellosi possono essere realizzati nell'ambito delle normali attività di controllo di qualità del latte.

L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo & del Molise «G. Caporale» (IZSA&M), in uno studio precedente, aveva standardizzato un test "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA) sul latte bovino utilizzando un anticorpo policlonale anti-IgG bovina coniugato con perossidasi (2). Il protocollo ELISA indiretta descritto nel *Manuale dei test diagnostici e vaccini per animali terrestri* dell'Office International des Epizooties (OIE) (8), tuttavia, prevede l'utilizzo di un anticorpo monoclonale anti-IgG₁ bovina come coniugato. Il Regolamento (CE) 535/2002 della Commissione del 21 marzo 2002, che modifica l'allegato C della

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo & del Molise «G. Caporale» (IZSA&M), Campo Boario, Teramo - Italia

direttiva 64/432/CEE del Consiglio e la Decisione 2000/330/CE (3), stabilisce i requisiti di standardizzazione della prova per campioni di latte di massa.

Nel corso degli anni 2002 e 2003, nell'ambito del territorio dell'Azienda U.S.L. N° 3 di Campobasso (regione Molise), è stata condotta una sperimentazione sull'utilizzo della prova ELISA sul latte di massa ai fini del mantenimento, da parte delle aziende che ne erano già in possesso, della qualifica di «ufficialmente indenne» da brucellosi bovina.

In questo studio è stato sviluppato dall'IZSA&M un metodo immunoenzimatico per rivelare la presenza di anticorpi brucellari nel latte bovino («ELISA Teramo») che prevede l'utilizzo di un anticorpo monoclonale e che è standardizzato secondo i requisiti del Regolamento 535/2002 (3). Inoltre, utilizzando i campioni provenienti dalla suddetta sperimentazione, sono state valutate la sensibilità e la specificità del kit.

Materiali e Metodi

Campioni di latte

I campioni di latte bovino negativo di massa sono stati raccolti nel corso delle attività di profilassi della brucellosi bovina svolte negli anni 2002 e 2003 nel territorio dell'Azienda Sanitaria Locale N° 3 «Centro Molise». In totale, sono stati raccolti 3 493 campioni di latte di massa provenienti da 1 250 allevamenti «ufficialmente indenni» da brucellosi bovina. I campioni sono stati suddivisi in due gruppi: il primo gruppo (gruppo A) è stato formato con i primi 1022 campioni raccolti, provenienti da altrettanti allevamenti «ufficialmente indenni» da brucellosi bovina; il secondo gruppo (gruppo B) è stato formato dai successivi 2 471 campioni raccolti. I campioni di latte bovino positivo sono stati raccolti nel triennio 2001 - 2003 in tre allevamenti bovini abruzzesi e molisani dai

quali era stata isolata *Brucella abortus*. Sono stati raccolti tre campioni di latte di massa e 36 campioni di latte dai singoli capi infetti. I campioni sono stati conservati a -20° C fino all'esecuzione delle prove.

Standard di referenza

Come standard positivo di referenza (LPR) è stato utilizzato latte bovino proveniente da capi risultati positivi alle prove di sieroaagglutinazione con antigene Rosa Bengala (SAR) e di fissazione del complemento (FdC) per brucellosi. Il latte risultato positivo all'esame colturale per ricerca di *Brucella abortus* è stato conservato liofilizzato dall'IZSA&M. Come standard negativo di referenza (LNR) è stato utilizzato latte bovino proveniente da capi risultati negativi alle prove SAR e FdC per brucellosi e appartenenti ad allevamenti «ufficialmente indenni» da brucellosi bovina. Il latte, risultato negativo all'esame colturale per ricerca di *Brucella spp.*, è stato conservato liofilizzato dall'IZSA&M. Per stabilire i valori medi e le deviazioni standard (DS) delle densità ottiche (DO) degli standard di referenza, sono state eseguite 70 determinazioni della DO del LPR e del LNR.

Per la standardizzazione del metodo sono stati utilizzati il Siero Nazionale Standard anti-*Brucella abortus* (SNS) e il Siero Internazionale Standard dell'OIE (OIEISS).

Antigene

Come antigene è stato utilizzato un antigene lipopolisaccaridico liscio (s-LPS) di *Brucella abortus* S 99 (Weybridge) prodotto dall'IZSA&M secondo la tecnica descritta da Hendry *et al.* (6). Il titolo d'uso dell'antigene è stato determinato secondo la metodica descritta da Alton *et al.* (1), utilizzando diluizioni del s-LPS di 1:1 000, 1:2 000, 1:3 000, 1:4 000. Il titolo d'uso dell'antigene è stato individuato in 1:2 000, diluizione che ha fornito i valori attesi per LPR e LNR;

Curva di titolazione con sieri standard

La quantità di anticorpi presenti nel LPR è stata valutata in relazione al SNS. Dal SNS tal quale, sono state allestite diluizioni scalari al raddoppio in siero bovino negativo da 1:250 a 1:4 000. Le diluizioni ottenute sono state diluite 1:10 in LNR. Per la costruzione della curva di titolazione del SNS sono state effettuate 70 ripetizioni delle DO del SNS tal quale e delle varie diluizioni.

In tal modo è stato possibile stabilire i parametri di riferimento positivi dell'ELISA latte:

- Fortemente positivo (100% di positività): valore della diluizione del SNS in latte negativo la cui DO corrisponde al valore rilevato per il LPR.
- Mediamente positivo (50% di positività): valore della diluizione del SNS in latte negativo la cui densità ottica corrisponde al 50% del valore rilevato per il LPR.

Al fine di standardizzare la prova secondo quanto indicato nel Regolamento (CE) n. 535/2002 (3), le stesse prove realizzate con il SNS sono state ripetute a partire dall'OIEISS (escludendo dalla prova l'OIEISS tal quale).

Esecuzione della prova ELISA

Sono state utilizzate piastre NUNC-immunoTM Plate PolySorpTM Surface. Le piastre sono state adsorbite con 100 µl per pozzetto di antigene s-LPS diluito in tampone carbonato-bicarbonato 0,06M a pH 9,6 e incubate per una notte a temperatura ambiente. Il giorno seguente, le piastre sono state lavate tre volte con tampone fosfato salino 0,01 M (PBS) + 0,05% Tween 20, pH 7,2 (PBST). Ciascun campione è stato esaminato in duplicato dispensando 100 µl di latte per pozzetto. Come controlli interni della piastra sono stati utilizzati sedici pozzetti. Otto pozzetti contenevano 100 µl di tampone diluente (PBS 0,01 M addizionato con 1% di estratto di lievito), per verificare la reazione enzimatica in assenza di campione (blank), quattro contenevano

100 µl di LPR (controllo positivo) e quattro contenevano 100 µl di LNR (controllo negativo). Le piastre sono state poste su agitatore orbitante per due minuti e poi incubate per un'ora a 37°C. In seguito, le piastre sono state lavate tre volte con PBST e sono stati aggiunti 100 µl per pozzetto di anticorpo monoclonale anti-IgG₁ di bovino coniugato con fosfatasi alcalina, alla diluizione ottimale, precedentemente determinata con il metodo della titolazione a croce. Le piastre, agitate e incubate per 30 minuti a 37°C, sono state lavate tre volte con PBST. Dopo l'aggiunta di 100 µl per pozzetto di substrato p-nitrofenilfosfato, le piastre sono state incubate per 45 minuti a temperatura ambiente al riparo dalla luce. La lettura è stata eseguita con fotocolorimetro per micropiastre, misurando la DO dei pozzetti alla lunghezza d'onda di 405 nm.

Dai valori di DO sottratti del blank, è stato calcolato il risultato dei campioni espresso in percentuale di positività (PP) del campione in relazione alla LPR, con la seguente formula:

$$PP = \frac{\text{Media DO latte campione} - \text{Media DO LNR}}{\text{Media DO LPR} - \text{Media DO LNR}} \times 100$$

Il valore di cut-off della prova è stato determinato come media più tre DS dei valori di PP risultanti dall'analisi di 1 022 campioni di latte negativo di massa proveniente da altrettanti allevamenti «ufficialmente indenni» da brucellosi bovina (gruppo A).

Valutazione delle prestazioni del test ELISA

La specificità dell'ELISA Teramo è stata stabilita esaminando i successivi 2 471 campioni di latte negativo di massa (gruppo B). La valutazione della sensibilità della prova è stata condotta mediante analisi sul tal quale dei 39 campioni di latte bovino positivo di massa e individuale. Inoltre,

al fine di simulare campioni di latte di massa provenienti da allevamenti infetti a varie prevalenze d'infezione, sono state analizzate diluizioni al raddoppio in latte negativo dei 36 campioni di latte individuali, partendo dalla diluizione 1:2 fino alla diluizione 1: 512.

Analisi statistica

I valori di sensibilità e specificità sono stati calcolati mediante approccio bayesiano (9, 11) utilizzando la distribuzione di probabilità Beta ($s+1, n-s+1$), dove s è il numero di campioni identificati correttamente e n è il numero totale di campioni esaminati. Sono stati inoltre calcolati i rispettivi intervalli di confidenza al 95% (IC). È stata condotta una regressione logaritmica col metodo dei minimi quadrati dei valori di PP in relazione al reciproco delle diluizioni. La significatività della regressione è stata valutata mediante analisi di varianza.

Risultati

Determinazione del valore di cut-off per l'ELISA Teramo

Il valore medio di PP dei 1 022 campioni di latte negativo (gruppo A) è stato -0,069% (DS 3,75). Sulla base dei risultati ottenuti, è stato stabilito un valore PP di cut-off di 11,2% (media delle PP più tre DS), considerando negativi i campioni con

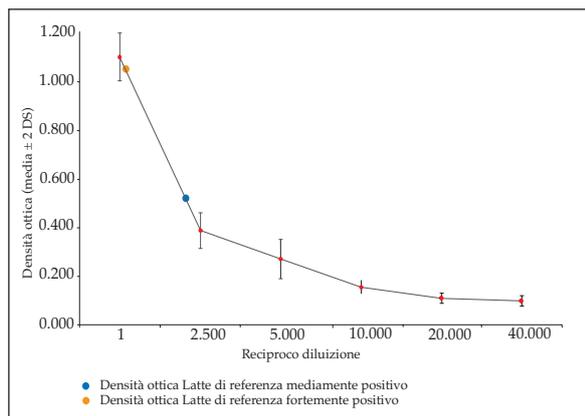


Figura 1
Curva di titolazione del siero nazionale standard - ELISA Teramo.

PP <11,2% e positivi i campioni con PP ≥11,2%.

Curva di titolazione con sieri standard

La curva di titolazione del SNS per l'ELISA Teramo è riportata in Figura 1. Il valore medio di DO del LPR è risultato essere 1,034 (DS 0,053), quello del latte di riferimento mediamente positivo 0,517 (DS 0,026), mentre quello del LNR 0,020 (DS 0,012). I valori di DO del LPR e del latte di referenza mediamente positivo si trovano tra le diluizioni t. q. e 1:2 500 del SNS in latte negativo, mentre il valore di DO del LNR si trova oltre la diluizione

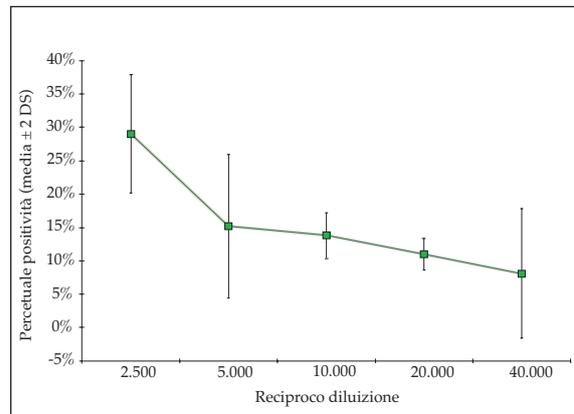


Figura 2
Curva di titolazione dell'OIEISS - ELISA Teramo.

1:40 000 del SNS in latte negativo (Fig. 1).

La curva di titolazione dell'OIEISS per l'ELISA Teramo è riportata nella Figura 2.

Alla diluizione 1:10 000 dell'OIEISS in latte negativo, l'ELISA Teramo ha mostrato reazione positiva, con un valore medio di PP (calcolato sul numero totale di ripetizioni) di 13,8% (DS 1,7%) (Fig. 2).

Valutazione delle prestazioni dell'ELISA Teramo

La valutazione dell'ELISA Teramo sui campioni di latte del gruppo B ha fornito 2 467 risultati corretti sui 2 471 campioni di latte negativo analizzati. Il valore di specificità della prova corrisponde quindi al 99,8% (IC 99,6% - 99,9%).

La distribuzione di probabilità dei valori di specificità del test è mostrata nella Figura 3.

I 39 campioni di latte positivo sono stati tutti

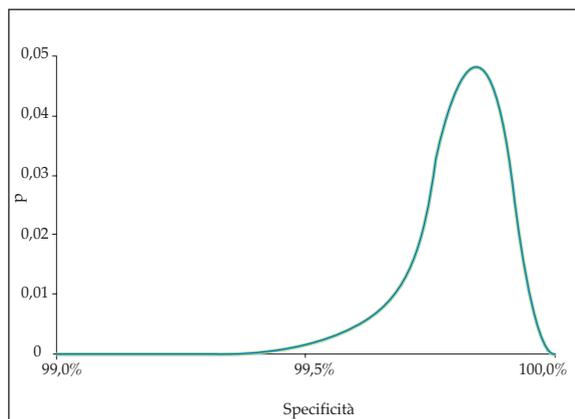


Figura 3 Specificità dell' ELISA Teramo su 2 471 campioni di latte negativo.

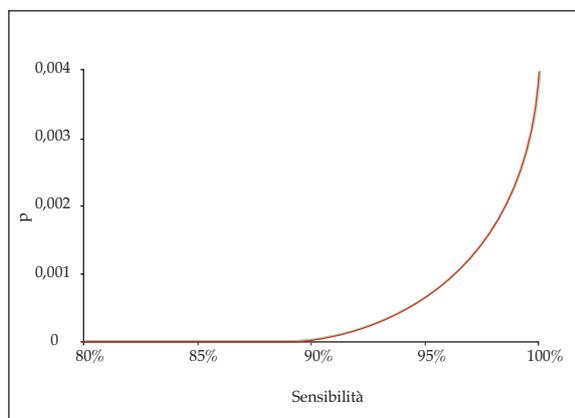


Figura 4 Sensibilità dell'ELISA Teramo su 39 campioni di latte positivo.

correttamente identificati dall'ELISA Teramo, per cui il valore di sensibilità della prova corrisponde al 100% (IC 91,2%-100%). La distribuzione di probabilità dei valori di sensibilità del test è mostrata nella Figura 4.

I risultati delle diluizioni in latte negativo dei 36 campioni di latte di singoli capi infetti, espressi in termini di percentuale di risultati corretti per ogni diluizione e limiti fiduciali 95%, sono illustrati nella Figura 5.

Analisi statistica

La probabilità di ottenere un risultato positivo all'aumentare della diluizione dei campioni (latte

positivo individuale) segue un modello logaritmico definito dall'equazione $y = -0,1055Ln(x) + 1,09$; con un valore R^2 di 0,975032. Il valore F risultante dall'analisi di varianza della regressione per le diluizioni di tali campioni è significativo ($p < 0,01$).

Discussione e Conclusioni

Il test ELISA Teramo è conforme ai requisiti di standardizzazione dell'Unione Europea (3, 4), in quanto alla diluizione 1:10 000 dell'OIEISS in latte negativo la PP risultante indica reazione positiva (Fig. 2).

Il test ha mostrato elevati valori di specificità e sensibilità, sovrapponibili a studi simili effettuati in passato.

Il kit ELISA prodotto in precedenza dall'IZSA&M (2), su una specificità attesa del 99,5%, era stato standardizzato su un valore di sensibilità del 94,4% (IC 83,9%-97,8%).

Nielsen *et al.* (7), in uno studio condotto su campioni di latte provenienti da Canada, Argentina e Cile, hanno messo a punto un test ELISA con valori di sensibilità e specificità rispettivamente del 96,5% (± 2.5) e 99,9% ($\pm 0,05$). Vanzini *et al.* (10) hanno valutato il metodo in uno studio condotto su bovine da latte in Argentina, rilevando una specificità del 99,1% (IC 98,9%-99,9%) e una sensibilità del

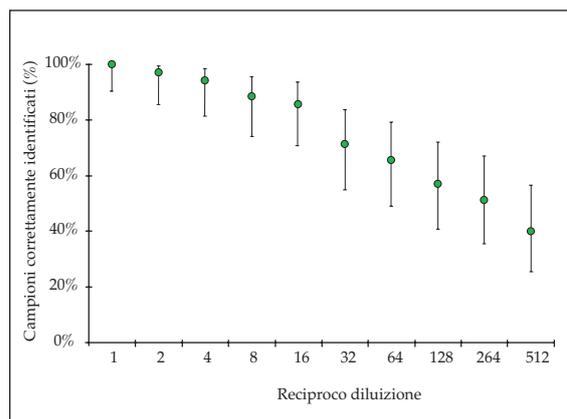


Figura 5 Risultati delle diluizioni di 36 campioni di latte positivo individuale e intervalli di confidenza 95%

99,6% (IC 98,6%–99,9%).

L'ELISA Teramo, applicata su campioni di latte provenienti da animali infetti e su campioni di latte di massa di allevamenti infetti, ha fornito un valore di sensibilità del 100% (IC 91,2%–100%).

Il dato di sensibilità della prova, tuttavia, pur essendo nel suo valore più probabile superiore a quanto rilevato dai precedenti autori, va interpretato anche tenendo conto dell'ampio intervallo di confidenza che, in ogni caso, è inferiore a quanto rilevato per il precedente kit ELISA Teramo (2). I valori finora riportati sono il risultato dell'analisi di campioni di latte di singoli animali, mentre nell'attività di campo uno dei principali vantaggi nell'utilizzo del test ELISA risiede nella possibilità d'utilizzo sul latte di massa. Pertanto, di estrema importanza sono anche gli studi tesi a determinare l'effetto della diluizione sulle prestazioni del test. Le ricerche in tal senso di Nielsen *et al.* (7), condotte mediante la diluizione a raddoppio in latte negativo di cinque campioni di latte proveniente da animali infetti, hanno dimostrato la possibilità di individuare come positivi tre campioni su cinque alla diluizione 1:100 (Sensibilità 60%; IC 22,3%–88,2%).

Il kit ELISA prodotto in precedenza dall'IZSA&M (2), in uno studio analogo condotto su otto campioni di latte proveniente da animali infetti, si dimostrò

in grado di individuare come positiva la totalità dei campioni fino alla diluizione 1:200 (Sensibilità 100%; IC 66,4%–100%) (Fig. 6).

I risultati dell'ELISA Teramo forniscono un valore di sensibilità di 57,1% (CI. 40,8%–72,1%) alla diluizione 1:128 (Fig. 5 e 6). La probabilità di rilevare l'infezione presente in un solo capo esaminando il latte di massa è superiore al 50% fino alla diluizione 1:256 (probabilità 51,4%; IC 35,5%–67,1%).

Le prestazioni apparentemente migliori rilevate per il kit ELISA prodotto in precedenza dall'IZSA&M (2) non sono in realtà significativamente differenti, per la sovrapposizione dei rispettivi IC (Fig. 6). Lo stesso vale per i dati rilevati da Nielsen *et al.* (7). La consistenza media nazionale degli allevamenti bovini da latte, nel corso delle attività di profilassi svolte nell'anno 2002, era di 24,6 capi per allevamento, con un minimo di 8,4 capi per allevamento nella Regione Liguria e un massimo di 61,4 capi per allevamento nella Regione Lombardia. I dati per le Regioni Abruzzo e Molise corrispondono rispettivamente a 9,2 e 10,7 capi per allevamento (Ministero della Salute, comunicazione personale).

Nelle condizioni di consistenza media nazionale, la probabilità di rilevare come positivo un solo animale infetto nell'allevamento ricorrendo alla prova ELISA sul latte di massa va dal 85,7% (IC 70,2%–93,6%) al 71,4% (IC 54,8%–83,7%). Nel caso della Lombardia, a più alta consistenza media, la probabilità è del 65,7% (IC. 49,0%–79,2%). Nella realtà abruzzese e molisana la probabilità è del 88,6% (IC 73,9%–95,3%).

Tuttavia, la sensibilità complessiva dell'ELISA Teramo può essere aumentata mediante prelievi successivi di latte di massa ripetuti a distanza di tempo. L'incremento del valore di sensibilità, in questo caso, potrebbe essere stimato mediante l'utilizzo di un modello di simulazione analogo

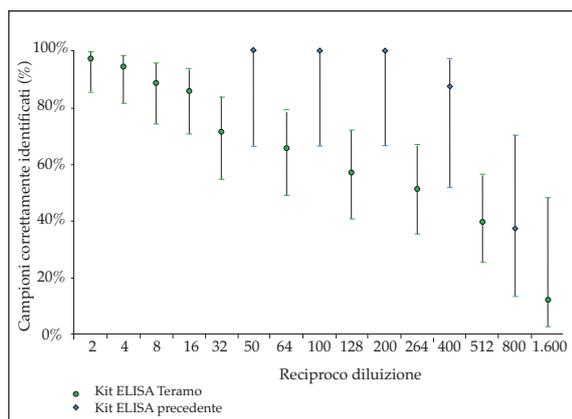


Figura 6
Confronto di sensibilità tra il precedente e il nuovo kit ELISA Teramo e intervalli di confidenza 95%.

a quello elaborato da Giovannini *et al.* (5). Tuttavia, poiché le prestazioni dell'ELISA Teramo non differiscono significativamente da quelle del test messo a punto in precedenza (2), sul quale era basato il modello citato, non si prevedono differenze di rilievo in seguito alla modifica dei parametri del modello in accordo con le prestazioni dell'ELISA Teramo.

Bibliografia

1. Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D. & Verger J.M. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut national de la recherche agronomique (INRA), Paris, 120-122.
2. Biancifiori F., Giovannini A., Di Matteo A., Urbani G. & Nannini D. 1996. Standardizzazione di una tecnica ELISA per la ricerca degli anticorpi brucellari nel latte bovino. *Vet Ital*, **32**, 42-46.
3. European Commission 2002. Commission Regulation No. 535/2002 of 21 March 2002 amending Annex C to Council Directive 64/432/EEC and amending Decision 2000/330/EC. *Off J*, L 080, 23/03/2002, 22-28.
4. European Council 1997. Council Directive 97/12/EC of 17 March 1997 amending and updating Directive 64/432/EEC on health problems affecting intra-Community trade in bovine animals and swine. *Off J*, L 109, 25/04/1997, 1-37.
5. Giovannini A., Conte A.-M., Petrini A., La Porta L., Nannini D. & Caporale V. 2004. Comparison of serological and milk tests for bovine brucellosis using a Monte Carlo simulation model. *Vet Ital*, **40**, 32-43.
6. Hendry D.M.F.D., Corbel M.J., Stack R.A. 1985. Brucella antigen production and standardisation. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Central Veterinary Laboratory, New Haw, Weybridge, 1-96.
7. 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.
8. Office International des Épizooties (OIE) 2004. Bovine brucellosis, Chapter 2.3.1.. *In*: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 5th Ed. OIE, Paris (oie.int/eng/normes/mmanual/A_00052.htm visitato il 13 marzo 2005).
9. Sivia D.S. 1996. Data analysis. A Bayesian tutorial. Clarendon press, Oxford, 189 pp.
10. Vanzini V.R., Aguirre N., Lugaresi C.I., de Echaide S.T., de Canavesio V.G., Guglielmone A.A., Marchesino M.D. & Nielsen K. 1998. Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentina. *Prev Vet Med*, **36**, 211-217.
11. Vose D. 2000. Risk analysis: a quantitative guide, 2nd Ed. John Wiley & Sons, Chichester, 418 pp.