

ELISA indiretta per il rilievo di anticorpi nel latte di pecore infettate sperimentalmente con *Brucella melitensis* biovariante 3

M. Tittarelli, A. Giovannini, F. De Massis, M. Di Ventura & V. Caporale

Riassunto

È stata valutata una ELISA indiretta per il rilievo di anticorpi brucellari nel latte (m-ELISA) proveniente da pecore infettate sperimentalmente con *B. melitensis* biovariante 3. Il latte è stato prelevato, alla fine del secondo ciclo riproduttivo (13 mesi post infezione), da 22 pecore in lattazione ed è stato saggiato usando la m-ELISA. I sieri provenienti dalle medesime pecore sono stati analizzati per la presenza di anticorpi brucellari usando il test di agglutinazione rapida con antigene Rosa Bengala (SAR) e il test di fissazione del complemento (FDC). Al primo prelievo sierologico successivo al parto, sia la SAR che la FDC hanno mostrato una sensibilità del 100% (intervallo di confidenza [IC] 94%-100%), ma nei prelievi successivi la sensibilità della SAR è scesa al 73% (IC 55-85%). In maniera analoga, la sensibilità della FDC è scesa due mesi dopo il primo prelievo, quando valori di sensibilità del 95% (IC 61-93%) e dell'81% sono state rispettivamente rilevate per gli ultimi due prelievi. La sensibilità della m-ELISA è diminuita inizialmente (68% al terzo prelievo, IC 50-81%), ma è aumentata fino al 95% (IC 81-98%) all'ultimo prelievo. Quando la prevalenza della malattia in un gregge è al di sotto del 5%, la probabilità stimata di non individuare il gregge come infetto attraverso l'uso della m-ELISA sul latte di massa è superiore al 25%. In condizioni

di campo, in Italia (consistenza media delle greggi di 70 capi), la probabilità che l'infezione non sia rilevata è superiore al 25%, se quattro (o meno) pecore infette e in lattazione sono presenti nel gregge. I risultati mostrano come la m-ELISA non sia un affidabile test di screening per il latte di massa quando la prevalenza di brucellosi in un gregge è bassa.

Parole chiave

Brucella melitensis, Brucellosis, Enzyme-linked immunosorbent assay, Italia, Latte, Pecore.

Introduzione

Negli allevamenti di vacche da latte, un mezzo estremamente efficiente di screening per la presenza di *Brucella* è costituito dalle prove sul latte di massa. Da questi animali il latte può essere ottenuto più frequentemente e in maniera più economica, rispetto ai prelievi di sangue, ed è spesso disponibile negli allevamenti da latte in punti di raccolta centrali. L'ELISA indiretta sul latte (m-ELISA) è il test più sensibile e specifico per questo scopo, il milk ring test (MRT) è una adeguata alternativa se la m-ELISA non è disponibile (3, 8, 10). Tuttavia, il MRT non è efficace per l'analisi del latte proveniente da pecore e capre (1, 5). Il possibile uso di una m-ELISA indiretta per il rilievo di anticorpi brucellari nel latte di pecora è stato valutato solo due volte (4, 5), quando le prestazioni

della m-ELISA furono valutate in un gregge naturalmente infetto. Il presente studio è stato progettato al fine di valutare la m-ELISA in condizioni sperimentali (12). Le prestazioni della prova sono state inoltre confrontate con i test sierologici convenzionali per la diagnosi della brucellosi ovina, ossia la sieroaagglutinazione rapida con antigene Rosa Bengala (SAR) e la fissazione del complemento (FDC).

Gli scopi del presente studio sono stati i seguenti:

- a) valutare, in condizioni sperimentali controllate, la sensibilità e la specificità della m-ELISA per il rilievo di anticorpi brucellari in latte ovino
- b) confrontare tali valori con quelli ottenuti (negli stessi animali) usando i test sierologici convenzionali (SAR e FDC)
- c) stabilire la validità della m-ELISA per lo screening degli allevamenti nei confronti della brucellosi attraverso l'analisi del latte di massa.

Materiali e metodi

Animali

Quarantasei pecore di razza fabrianese e meticce di età compresa tra 1 e 5 anni sono state sperimentalmente infettate per via congiuntivale con un ceppo di campo di *B. melitensis* biovariante 3 nel terzo mese di gravidanza del loro primo ciclo riproduttivo. Il ceppo isolato è stato inoculato per via sottocutanea in 2 cavie ed è stato reisolato dalla milza 21 giorni dopo, in 10 ml di terreno di Farrell (7). Dopo 48 ore d'incubazione in terreno a 37° C, le brucelle reisolate sono state titolate. Una dose di 5×10^8 unità formanti colonia (ufc) in 100 µl è stata inoculata nella congiuntiva di entrambi gli occhi (50 µl ciascuno) delle pecore usate per l'esperimento, in accordo con le prescrizioni della *Farmacopea Europea* (6). Al momento dell'inoculazione, 25 pecore su 46 erano gravide e 24 di esse hanno abortito tra 4 e 6 settimane post infezione (pi), mentre una sola

pecora ha partorito normalmente. Tre pecore sono morte per cause naturali tra uno e cinque mesi pi. Le pecore rimanenti sono state fecondate naturalmente a seguito di sincronizzazione dell'estro 8 mesi pi. In 26 pecore è stata diagnosticata gravidanza e tutte hanno partorito normalmente tra le 56 e le 58 settimane pi (secondo ciclo riproduttivo). Il presente studio include i dati ottenuti dal monitoraggio delle 22 pecore che erano in lattazione alla fine del secondo ciclo riproduttivo. Uno schema del disegno sperimentale è presentato in Tabella I. Cinquantuno pecore provenienti da un allevamento ufficialmente indenne da brucellosi sono state utilizzate come controlli.

Prove sierologiche

Tutti gli animali sono stati esaminati per la presenza di anticorpi contro *Brucella* spp. tramite SAR e FDC prima dell'infezione sperimentale (12) e in seguito periodicamente secondo il cronogramma della sperimentazione. I campioni di sangue sono stati raccolti immediatamente dopo il parto e in seguito periodicamente fino alla fine della lattazione, seguendo il protocollo riportato nella Tabella II. Entrambe le prove sono state eseguite usando *B. abortus* biovariante 1 ceppo 99 come antigene (Veterinary Laboratory Agencies, Weybridge), conformemente ai metodi descritti nel *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals* (10). Per valutare la specificità delle prove, sono stati analizzati con SAR e FDC i sieri delle pecore di controllo.

Campioni di latte

Il latte è stato raccolto dalle 22 pecore in lattazione a seguito del parto verificatosi alla fine del secondo ciclo riproduttivo, seguendo il cronogramma descritto nella Tabella II. I campioni di latte sono stati raccolti a partire dal giorno del parto fino alla fine della lattazione (circa due mesi) e in seguito esaminati con la m-ELISA. Per valutare la

sensibilità della m-ELISA, i campioni di latte sono stati analizzati tal quali. Tuttavia, al fine di valutare l'effetto della diluizione del latte, sono state analizzate diluizioni in base 10 (da

1:10 a 1:5120) in latte negativo dei medesimi campioni di latte individuale. Per valutare la specificità della m-ELISA, è stato analizzato il latte di 51 pecore provenienti da allevamenti

Tabella I

Esito del primo e secondo ciclo riproduttivo in 46 pecore sperimentalmente infettate con *Brucella melitensis* biovariante 3

| Pecora n. | Primo ciclo riproduttivo | | Secondo ciclo riproduttivo | | |
|-----------|--------------------------|------------------------------------|----------------------------|--|------------------------------|
| | 0 dpi Stato | 29-42 dpi Esito del primo parto | 240 dpi Stato | 392-406 dpi Esito del secondo parto | 394-429 dpi In lattazione |
| 101 | Non gravida | — | Gravida | Parto | Si |
| 102 | Gravida | Aborto | Gravida | Parto | Si |
| 103 | Gravida | Aborto | Gravida | Parto | Si |
| 104 | Gravida | Aborto | Gravida | Parto | Si |
| 105 | Non gravida | — | Morta | — | — |
| 106 | Non gravida | — | Gravida | Parto | Si |
| 107 | Gravida | Aborto | Gravida | Parto | Si |
| 108 | Non gravida | — | Gravida | Parto | Si |
| 109 | Gravida | Aborto | Non gravida | — | — |
| 110 | Gravida | Aborto | Non gravida | — | — |
| 111 | Non gravida | — | Gravida | Parto | No |
| 112 | Non gravida | — | Gravida | Parto | Si |
| 113 | Gravida | Aborto | Non gravida | — | — |
| 114 | Gravida | Aborto | Gravida | Parto | Si |
| 115 | Gravida | Aborto | Gravida | Parto | No |
| 116 | Non gravida | — | Non gravida | — | — |
| 117 | Gravida | Aborto | Non gravida | — | — |
| 118 | Non gravida | — | Non gravida | — | — |
| 119 | Non gravida | — | Gravida | Parto | No |
| 120 | Non gravida | — | Morta | — | — |
| 121 | Non gravida | — | Non gravida | — | — |
| 122 | Gravida | Aborto | Morta | — | — |
| 123 | Gravida | Aborto | Gravida | Parto | Si |
| 124 | Non gravida | — | Gravida | Parto | Si |
| 125 | Non gravida | — | Non gravida | — | — |
| 126 | Non gravida | — | Non gravida | — | — |
| 127 | Gravida | Aborto | Gravida | Parto | Si |
| 128 | Non gravida | — | Gravida | Parto | Si |
| 129 | Non gravida | — | Gravida | Parto | Si |
| 130 | Gravida | Aborto | Gravida | Parto | Si |
| 131 | Gravida | Aborto | Non gravida | — | — |
| 132 | Non gravida | — | Gravida | Parto | Si |
| 133 | Gravida | Aborto | Gravida | Parto | Si |
| 134 | Gravida | Aborto | Gravida | Parto | Si |
| 135 | Non gravida | — | Gravida | Parto | Si |
| 136 | Gravida | Parto | Gravida | Parto | No |
| 137 | Gravida | Aborto | Non gravida | — | — |
| 138 | Gravida | Aborto | Non gravida | — | — |
| 139 | Gravida | Aborto | Gravida | Parto | Si |
| 140 | Non gravida | — | Non gravida | — | — |
| 141 | Gravida | Aborto | Gravida | Parto | Si |
| 142 | Gravida | Aborto | Non gravida | — | — |
| 143 | Non gravida | — | Gravida | Parto | Si |
| 144 | Non gravida | — | Non gravida | — | — |
| 145 | Gravida | Aborto | Non gravida | — | — |
| 146 | Gravida | Aborto | Non gravida | — | — |

dpi = giorni dall'infezione

Tabella II
Epoca del prelievo, numero di pecore in lattazione e numero totale di campioni di latte e di siero raccolti

| Epoca del prelievo (giorni dall'infezione) | Prelievo N. | N. pecore in lattazione | N. campioni di latte raccolti | N. campioni di siero raccolti |
|---|----------------|----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 363 | 1 | 0 | 0 | 22 |
| 394 | 2 | 19 | 16 | 22 |
| 413 | 3 | 22 | 22 | 22 |
| 415 | 4 | 22 | 19 | 22 |
| 419 | 5 | 22 | 22 | 22 |
| 422 | 6 | 22 | 14 | ND |
| 429 | 7 | 22 | 22 | 22 |

ND non disponibile

ufficialmente indenni da brucellosi.

Procedura per l'ELISA latte

La m-ELISA è stata eseguita secondo un metodo descritto precedentemente (4), con alcune modifiche. L'antigene lipopolisaccaridico (s-LPS) per l'ELISA è stato preparato secondo la tecnica descritta da Hendry *et al.* (9) a partire da *B. abortus* biovarbiovariante 1 strain S99.

I campioni di latte e i controlli sono stati distribuiti in doppio in micropiastre di media capacità legante. L'antigene è stato diluito alla concentrazione ottimale in tampone carbonato-bicarbonato 0,05 M (pH 9,6). Come tampone diluente/di lavaggio è stato utilizzato tampone fosfato salino (PBS) con l'aggiunta di 0,05% di Tween 20 (PBST). Come coniugato sono state utilizzate IgG anti-pecora di coniglio coniugate con perossidasi. Il cromogeno era costituito da una soluzione 0.16 M di 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) in tampone citrato (pH 4.5). Per bloccare la reazione enzimatica è stato usato fluoruro di sodio.

La lettura delle micropiastre è stata effettuata con l'ausilio di un lettore ($\lambda = 405$ nm) e i valori espressi come densità ottica (DO). Per il controllo della reazione, sono stati utilizzati un campione di latte standard fortemente positivo (considerato come 100% di positività) e uno negativo. I risultati sono stati espressi come percentuale di positività

(PP) del campione esaminato in relazione al controllo fortemente positivo, usando la seguente formula:

$$PP = \frac{\text{Media DO del campione esaminato}}{\text{Media DO del controllo positivo}} \times 100$$

Il valore di cut-off è stato stabilito a una PP del 10%.

Dati demografici

I dati sulla consistenza delle popolazioni di pecore e capre e i dati provenienti dalla campagna nazionale di eradicazione della brucellosi sono stati gentilmente forniti dal Ministero della Salute della Repubblica Italiana.

Analisi statistica

I valori di sensibilità e di specificità sono stati stimati e confrontati mediante un approccio bayesiano (11). L'inferenza bayesiana è un'applicazione del teorema di Bayes (2), che consente di integrare qualsiasi conoscenza precedente (espressa come distribuzione di probabilità a priori), con la probabilità di ottenere un risultato certo se l'animale è infetto o se l'animale è sano (funzioni di probabilità), con i risultati ottenuti dall'applicazione del test ad una data popolazione (dati raccolti). Le funzioni di probabilità dipendono dalla sensibilità e dalla specificità del/dei test utilizzati e dall'incertezza dei loro valori. I risultati finali sono delle distribuzioni di

Tabella III

Risultati ottenuti impiegando la sieroagglutinazione rapida con antigene Rosa Bengala (SAR), il test della fissazione del complemento (FDC) e il test ELISA sul latte (m-ELISA)

| Epoca del prelievo (giorni dall'infezione) | Prelievo n. | N. di campioni positivi sui prelevati | | |
|---|-------------|---------------------------------------|--------------|----------------|
| | | SAR (% Se) | FDC (% Se) | m-ELISA (% Se) |
| 363 | 1 | 22/22 (100%) | 22/22 (100%) | ND |
| 394 | 2 | 19/22 (86%) | 22/22 (100%) | 13/16 (81%) |
| 413 | 3 | 20/22 (91%) | 22/22 (100%) | 15/22 (68%) |
| 415 | 4 | 21/22 (95%) | 22/22 (100%) | 14/19 (74%) |
| 419 | 5 | 22/22 (100%) | 21/22 (95%) | 20/22 (91%) |
| 422 | 6 | ND | ND | 12/14 (86%) |
| 429 | 7 | 16/22 (73%) | 18/22 (82%) | 21/22 (95%) |

Se sensibilità

ND non disponibile

probabilità del numero di animali infetti correttamente identificati come tali (sensibilità) oppure del numero di animali sani correttamente identificati come sani (specificità), nel campione o nella popolazione (probabilità a posteriori). Le probabilità dei vari possibili valori di sensibilità sono stati stimati usando una funzione di probabilità Binomiale e una distribuzione a priori non informativa Uniforme (0,1). E' stata utilizzata una distribuzione a priori non informativa Uniforme (0,1) perché la conoscenza a priori della sensibilità o della specificità del test è stata considerata virtualmente nulla. La distribuzione Uniforme (0,1) specifica che, prima della raccolta dei dati, sono considerati possibili tutti i valori veri di probabilità all'interno dell'intervallo definito per il numero di veri positivi (calcolo della sensibilità) o dei veri negativi (calcolo della specificità). I risultati della SAR e della FDC sono stati espressi come percentuale di animali positivi sugli esaminati; gli intervalli di confidenza al 95% (IC) superiori e inferiori sono stati calcolati usando una distribuzione di probabilità Beta (13). Al fine di interpolare i dati ottenuti dai campioni positivi, i risultati sono stati analizzati con regressione lineare col metodo dei minimi quadrati. Dopo trasformazione nel logaritmo naturale, il percentile della distribuzione di frequenza della massima

diluizione alla quale la positività era ancora rilevabile (variabile dipendente), è stato regredito rispetto alla diluizione (variabile indipendente). I dati della regressione sono stati usati anche per stimare la probabilità che l'infezione non sia svelata in un gregge attraverso l'analisi del latte di massa, in relazione alla prevalenza d'infezione nel gregge stesso. I calcoli sono stati eseguiti utilizzando MS-Excel® per Windows®, versione 2000.

Risultati

Prove sierologiche

Tutti gli animali erano negativi alla SAR e alla FDC prima dell'infezione sperimentale. I risultati della SAR e della FDC sulle pecore sperimentalmente infettate, espressi come numero totale di campioni positivi diviso per il numero di campioni esaminati per giorno di prelievo, sono presentati in Tabella III. Il valore più probabile di sensibilità dei test è riportato tra parentesi. Le prove sierologiche eseguite sul primo prelievo di sangue dopo il parto hanno riportato una sensibilità del 100%, sia per la SAR che per la FDC (IC 88-100%). La sensibilità della SAR è successivamente scesa al 73% (IC 55-85%) nei prelievi successivi. Anche la sensibilità della FDC è scesa circa due mesi dopo il primo prelievo, facendo registrare, rispettivamente, valori compresi

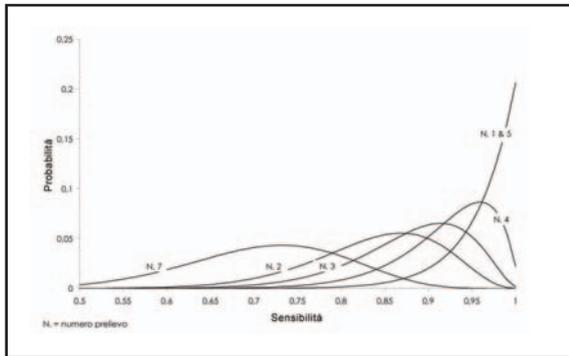


Figura 1
Distribuzioni di probabilità delle stime della sensibilità del test di sieroagglutinazione rapida con antigene Rosa Bengala per ciascun giorno di prelievo

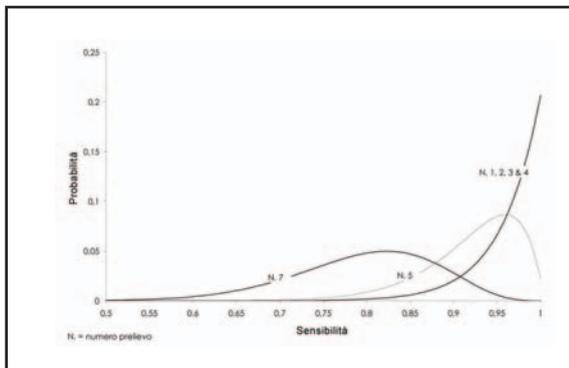


Figura 2
Distribuzioni di probabilità delle stime della sensibilità del test di fissazione del complemento per ciascun giorno di prelievo

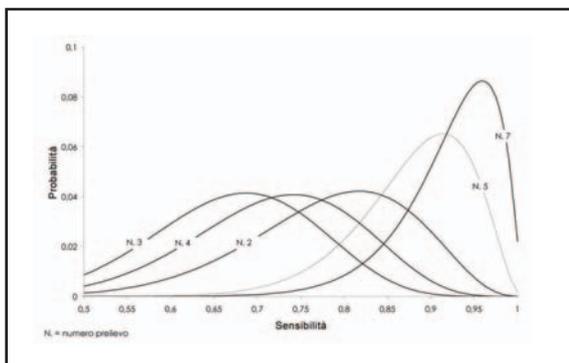


Figura 3
Distribuzioni di probabilità delle stime della sensibilità del test m-ELISA per ciascun giorno di prelievo

tra 95% (IC 81-98%) e 81% (IC 61-93%) per gli ultimi due prelievi. Le distribuzioni di probabilità delle stime della sensibilità della SAR e della FDC, per ogni giorno di prelievo, sono illustrate rispettivamente nelle Figure 1 e 2. Tutti gli animali di controllo hanno dato risultato negativo alla SAR e alla FDC.

Prove sul latte

I risultati della m-ELISA sulle pecore sperimentalmente infettate, espressi come numero totale di campioni positivi diviso per il numero di campioni esaminati per giorno di prelievo, sono mostrati in Tabella III. La sensibilità della m-ELISA inizialmente decresce dall'81% (IC 57-93%) del secondo prelievo al 68% (IC 50-81%) del terzo, ma successivamente risale al 91% (IC 72-97%) al quinto prelievo e al 95% (IC 81-98%) all'ultimo prelievo. Le distribuzioni di probabilità delle stime della sensibilità della m-ELISA per ogni giorno di prelievo, sono illustrate nella Figure 3. Le distribuzioni di probabilità delle stime della specificità delle tre prove (SAR, FDC e m-ELISA), per ogni giorno di prelievo, sono illustrate nella Figure 4. Le tre prove hanno evidenziato tutte il 100% di specificità. La distribuzione di frequenza cumulativa della massima diluizione alla quale la positività è ancora rivelabile è mostrata nella

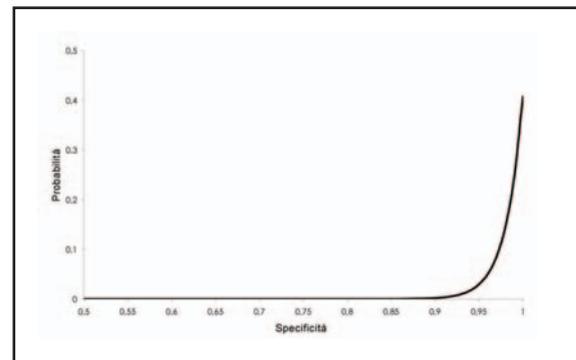


Figura 4
Distribuzione di probabilità della stima della sensibilità del test di sieroagglutinazione rapida con antigene Rosa Bengala, del test di fissazione del complemento e della m-ELISA

Figure 5. Le frequenze dei titoli anticorpali nel latte sono state efficacemente rappresentate dal modello logaritmico $y=11.423\ln(x)+1.892$ ($F=316.2$, $p<0.01$), che ha mostrato un coefficiente di determinazione corretto di $R^2=0.978274$. I risultati dell'analisi di regressione sono mostrati in Figure 6. La probabilità che un gregge infetto possa non essere rilevato esaminando il latte di massa è stata stimata attraverso l'analisi di regressione dei dati, considerando greggi a vari livelli di prevalenza. I risultati sono mostrati in Figure 7. La probabilità di non individuare l'infezione in un gregge è sempre superiore al 25% quando la prevalenza d'infezione all'interno dello stesso è inferiore al 5%. I campioni di latte prelevati dalle 51 pecore provenienti da allevamenti ufficialmente indenni da brucellosi hanno dato risultati negativi alla m-ELISA.

Discussione

La sensibilità della m-ELISA inizialmente decresce dall'81% (IC 57-93%) del secondo prelievo al 68% (IC 50-81%) del terzo prelievo, ma al quinto prelievo sale al 91% (IC 72-97%) e nell'ultimo prelievo raggiunge il 95% (IC 81-98%; Tabella III; Fig. 3). Il valore finale è più alto rispetto a quanto descritto precedentemente (4, 5). Tuttavia, a causa della sovrapposizione dei rispettivi IC, i valori di sensibilità ottenuti dalla m-ELISA nel presente studio sperimentale, non differiscono significativamente dai valori riportati in uno studio precedente (4), in cui la stessa m-ELISA è stata valutata sul latte di pecore naturalmente infette. La specificità della m-ELISA è del 100% (IC 94-100%; Fig. 4); altri autori (4, 5) hanno ottenuto risultati simili (specificità=100%; IC 97%-100%).

I test sierologici eseguiti sul primo prelievo di siero successivo al parto (Tabella III), hanno evidenziato una sensibilità del 100% per entrambi i test (SAR e FDC; IC 88-100%), stesso valore

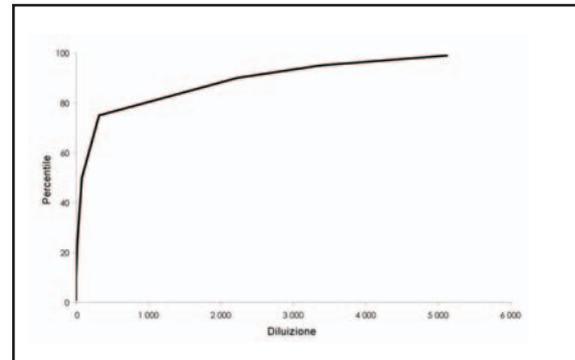


Figura 5
Massima diluizione dei campioni di latte alla quale la positività della m-ELISA è ancora rilevabile

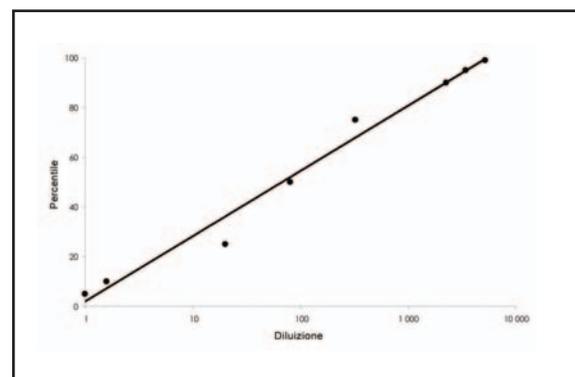


Figura 6
Risultati dell'analisi di regressione sulle varie diluizioni di latte

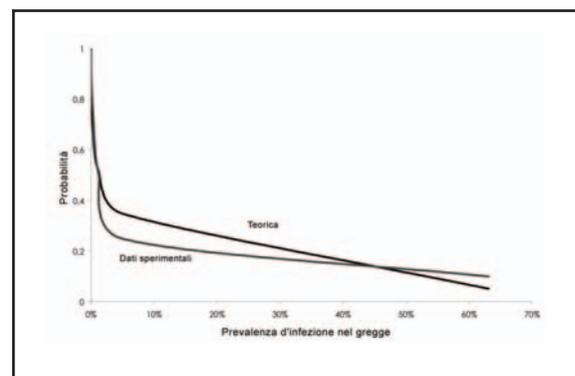


Figura 7
Probabilità di non individuare l'infezione nel gregge attraverso l'uso della m-ELISA sul latte di massa

individuato nella prima parte del presente studio (12). Tuttavia, la sensibilità della SAR è scesa al 73% (IC 55-85%) nei prelievi successivi (Tabella III; Fig. 1). La sensibilità della FDC è scesa anch'essa nei due mesi successivi al parto (Tabella III; Fig. 2), con valori di sensibilità rispettivamente del 95% (IC 81-98%) e 81% (IC 61-93%), registrati negli ultimi due prelievi. Questa diminuzione post partum della sensibilità dei test sierologici è stata descritta precedentemente (4, 12). In ogni caso, i risultati del presente studio confermano la minore sensibilità della m-ELISA rispetto alla FDC, come già riscontrato nel precedente studio in condizioni di infezione naturale (4).

La m-ELISA ha dimostrato una capacità di identificare correttamente il 100% degli animali non infetti, in piena concordanza con SAR e FDC (Fig. 4), suggerendo che tali test presentano tutti una specificità simile, come già descritto (4).

Riguardo al possibile impiego della m-ELISA, come test di screening per la diagnosi di brucellosi oviscaprina sul latte di massa, l'analisi di regressione (Fig. 6) applicata alle diluizioni del latte (Fig. 5), dimostra che, quando la prevalenza della malattia all'interno di un gregge è inferiore al 5%, la probabilità stimata di non individuare un gregge come infetto, è sempre superiore al 25% (Fig. 7). Nell'anno 2004 il numero di animali infetti, all'interno delle greggi controllate nella maggior parte delle regioni italiane, è stato sempre inferiore al 5% (Fig. 8). Conseguentemente, in condizioni di campo e considerando che la consistenza media di un gregge in Italia è di 70 capi, la probabilità che l'infezione non sia rilevata è superiore al 25%, se nel gregge sono presenti quattro pecore infette e in lattazione (o un numero inferiore).

In conclusione, quando la prevalenza di brucellosi a livello di gregge è bassa, la m-ELISA non sembra indicata per lo screening sul latte di massa ovino.

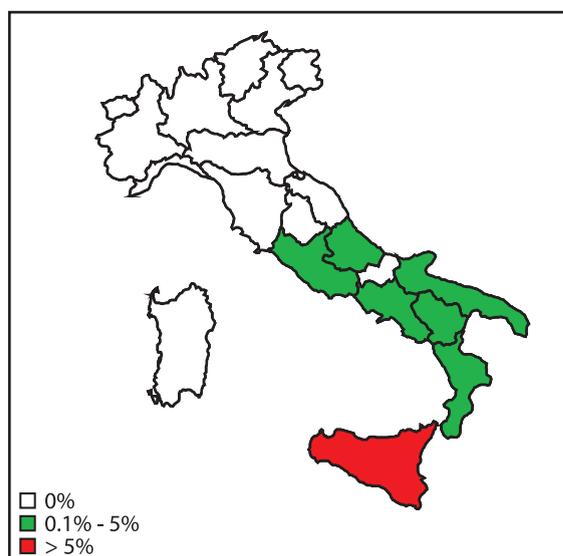


Figura 8
Percentuale di oviscaprini infetti sui controllati
su base regionale in Italia nel 2004

Ringraziamenti

Gli autori desiderano ringraziare Arcangelo Di Matteo per l'assistenza fornita nella esecuzione delle prove sierologiche. Desiderano inoltre esprimere gratitudine a Rudy Meiswinkel per il suo contributo nella revisione del testo.

Finanziamento

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute della Repubblica Italiana.

Bibliografia

1. Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D. & Verger J.M. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut national pour la recherche agronomique, Paris, 190 pp.
2. Bayes T. 1763. An essay towards solving a problem in the doctrine of chances. *Philos Trans R Soc Lond*, **53**, 370-418 (www.stat.ucla.edu/history/essay.pdf accesso 3 marzo 2006).

3. 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.
4. Biancifiori F., Nannini D., Di Matteo A. & Belfiore P. 1996. Assessment of an indirect ELISA in milk for the diagnosis of ovine brucellosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **19**, 17-24.
5. Chand P., Sadana J.R., Malhotra A.K. & Poonia J.S. 2004. Indirect ELISA for the detection of antibodies to *Brucella melitensis* in sheep milk. *Vet Rec*, **155**, 639-641.
6. Council of Europe 2004. European Pharmacopoeia, 5th Ed. Council of Europe, Strasbourg, Vol. II, 2 779 pp.
7. Farrell I.D. 1974. The development of new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. *Res Vet Sci*, **16**, 280-286.
8. Giovannini A., Biancifiori F., Di Matteo A. & Nannini D. 1996. Valutazione di un test ELISA-latte mediante studio nel tempo di un focolaio di brucellosi bovina da *Brucella melitensis*. *Vet Ital*, **32**, 39-41.
9. Hendry D.M.F.D., Corbel M.J., Bell R.A. & Stack J.A. 1985. *Brucella* antigen production and standardization. Central Veterinary Laboratory, New Haw, Weybridge, 1-96.
10. Office International des Épizooties (OIE) 2004. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 5a Ed. OIE, Paris, 598-606.
11. Sivia D.S. 1996. Data analysis. A Bayesian tutorial. Clarendon Press, Oxford, 189 pp.
12. Tittarelli M., Di Ventura M., De Massis F., Petrini A., Giovannini A., Nannini D. & Caporale V. 2004. Cinetica della risposta anticorpale in pecore sperimentalmente infettate con *Brucella melitensis* biovariante 3. *Vet Ital*, **40**, 5-10.
13. Vose D. 2000. Risk analysis: a quantitative guide, 2nd Ed. John Wiley & Sons, Chichester, 418 pp.