

Sviluppo e valutazione di test diagnostici per la sierodiagnosi di brucellosi suina

Tiziana Di Febo, Mirella Luciani, Ottavio Portanti, Barbara Bonfini, Rossella Lelli & Manuela Tittarelli

Riassunto

Sono stati sviluppati una ELISA competitiva (c-ELISA), una ELISA indiretta (i-ELISA) e un test immunologico DELFIA (*Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescence Immunoassay*) per la ricerca di anticorpi verso *Brucella suis* in sieri di maiale e cinghiale. I tre test prevedono l'utilizzo di un anticorpo monoclonale (MAB 4B5A) verso l'LPS di *Brucella* (c-ELISA e DELFIA) e di un anticorpo monoclonale (MAB 10C2G5) verso le IgG suine (i-ELISA). La specificità (Sp) e la sensibilità (Se) dei tre test sono le seguenti: per la c-ELISA Se e Sp = 100% con un valore di cut-off pari al 61.0% (B/B₀%); per la i-ELISA Sp = 99.1% e Se = 100% con un valore di cut-off di 21.7% (PP%); per il DELFIA Sp = 91.0% e Se = 75% ponendo il valore di cut-off al 37.0% (B/B₀%). Inoltre sono state valutate le performance, nei confronti di sieri suini, di un test FPA (*Fluorescence Polarization Assay*) commerciale sviluppato per la ricerca di anticorpi anti-*Brucella* in sieri bovini; la specificità e la sensibilità ottenute sono entrambe del 100% al valore di cut-off di 99.5 (mP). Questi risultati suggeriscono che la combinazione di c-ELISA, i-ELISA e FPA può essere utilizzata per migliorare la diagnosi di brucellosi suina.

Parole chiave

Brucellosi, Diagnosi, DELFIA, Dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay, ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay, Fluorescence polarisation assay, FPA, Sierologia, Suino.

Introduzione

Brucella suis è un batterio Gram-negativo, intracellulare facoltativo, responsabile della brucellosi nell'uomo e negli animali. La brucellosi negli animali ha un importante impatto economico, in quanto l'infezione causa aborti, natimortalità e la diminuzione di fertilità negli allevamenti; dall'altro lato, la brucellosi nell'uomo è una malattia debilitante caratterizzata da febbre, sudorazione e dolori. Il tasso di mortalità della malattia nell'uomo è stimato intorno al 5% dei casi, a causa di complicazioni (16, 36). Fino ad oggi sono state identificate cinque biovar di *B. suis*: le biovar 1, 2 e 3 sono presenti nei maiali e nei cinghiali; un serbatoio per la biovar 2 è costituito inoltre dalle lepri europee (*Lepus europaeus*). La biovar 4 infetta prevalentemente le renne ed i caribù e non viene di solito isolata dai suini. La biovar 5 è presente prevalentemente nei roditori (3, 41). Una diagnosi presuntiva di brucellosi può essere effettuata mediante esame al microscopio di strisci colorati con il metodo di Ziehl-Neelsen modificato da Stamp. Comunque nei suini i metodi sierologici sono generalmente considerati più attendibili per l'identificazione degli animali infetti.

I test sierologici utilizzati per la diagnosi di brucellosi nei suini sono gli stessi sviluppati per la brucellosi bovina e comprendono i test immunoenzimatici competitivi o indiretti (ELISA), i test di agglutinazione per la ricerca di anticorpi anti-*Brucella* (test al rosa bengala e buffered plate agglutination test) e la fissazione del complemento (FdC), sebbene

nessuno dei test menzionati sia completamente specifico e capace di discriminare le cross-reazioni con altri batteri, in particolare con *Yersinia enterocolitica* O:9 (3, 4, 7, 34, 37, 38, 39, 40, 41). E' stato anche sviluppato un test FPA (3, 30). Ai suini possono essere applicati altri test sierologici utilizzati nei bovini. Il "Brucellin allergic skin test" è ampiamente utilizzato per identificare gli allevamenti infetti in alcuni paesi. Una diagnosi definitiva può essere effettuata mediante isolamento di *B. suis* dagli animali infetti. *Brucella* spp. può essere isolata con una ampia varietà di terreni di coltura semplici o utilizzando terreni selettivi come il Farrell medium o il terreno modificato di Thayer-Martin. Possono essere utilizzate anche tecniche di arricchimento. Le tecniche di reazione a catena della polimerasi (PCR) sono disponibili in molti laboratori (3, 41). Il presente studio descrive lo sviluppo e la valutazione delle prestazioni di due ELISA (c-ELISA e i-ELISA) e di un test DELFIA, che utilizzano anticorpi monoclonali e, come antigene, il lipopolisaccaride di colonie in fase liscia di *B. suis*. E' stata inoltre valutata la performance nei confronti di sieri suini di un test FPA commerciale sviluppato per la ricerca di anticorpi anti-*Brucella* in sieri bovini.

Materiali e metodi

Anticorpi monoclonali

Anticorpi monoclonali (MAb) verso l'LPS di *Brucella* sono stati prodotti come descritto in un precedente lavoro (31). Gli anticorpi monoclonali verso le immunoglobuline G suine (IgG) sono stati prodotti immunizzando per via intraperitoneale topi Balb/c con 50 µg/ml di IgG suine purificate diluite in adiuvante di Freund completo (Sigma, St Louis, USA). Le IgG suine erano state precedentemente purificate mediante cromatografia di affinità con proteina A (5, 22). Due settimane dopo la prima immunizzazione, sono stati inoculati 50 µg/ml di IgG purificate diluite in adiuvante di Freund incompleto (Sigma, St Louis, USA); un terzo inoculo è stato effettuato con 50 µg/ml di IgG suine diluite in tampone fosfato salino (PBS) (0.01 M, pH 7.2) sterile. Al 46° giorno è stato effettuato

un "booster" per via intraperitoneale con 50 µg/ml di IgG diluite in PBS sterile. Dopo l'eutanasia, gli splenociti di topo sono stati raccolti e fusi con cellule di mieloma murino della linea Sp2/O-Ag-14 (American Type Culture Collection) (32). Gli ibridomi sono stati coltivati per due settimane in Dulbecco's Modified Eagle's Medium contenente il 20% di siero fetale bovino, 2 mM glutammina, 100× anfotericina-penicillina-streptomicina, 50 mg/ml gentamicina, 10000 UI/ml nistatina e 50× HAT. Gli ibridomi secernenti anticorpi verso le IgG suine sono stati clonati secondo il metodo delle diluizioni limite (19, 25) e sono stati sottoposti a screening mediante ELISA indiretta (26) utilizzando micropiastre attivate con IgG suine purificate. Sono state inoltre verificate le cross-reazioni con le IgM suine e con le IgG e le IgM bovine, ovine, equine e di pollo.

L'isotipo dei MAb è stato determinato mediante l'Immunopure® Monoclonal Antibody Isotyping kit I (Pierce, Rockford, USA), secondo le istruzioni della ditta fornitrice. I MAb (isotipo IgG) da utilizzare in ELISA sono stati purificati mediante cromatografia di affinità con proteina A (5, 22) e coniugati con perossidasi di rafano come descritto in letteratura (29). Il MAb 4B5A da utilizzare nel test DELFIA è stato marcato con europio mediante l' "Eu-Labeling Kit" (Perkin Elmer, Waltham, USA); il MAb marcato con europio è stato ulteriormente purificato in cromatografia ad esclusione sterica mediante una colonna Hi-Load 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare, Uppsala, SW) e successivamente è stata determinata la resa della marcatura mediante il rapporto molare Eu³⁺/IgG_(MAb).

Preparazione del lipopolisaccaride di *Brucella suis*

Il lipopolisaccaride di colonie in fase liscia (LPS) utilizzato per l'attivazione delle micropiastre per ELISA è stato preparato mediante estrazione fenolica di *B. suis* biovar 1 (21, 31). In breve, *B. suis*, coltivata in *brain heart infusion agar* (BHIA), è stata raccolta mediante centrifugazione a 4000 g per 20 min e il pellet è stato risospeso in acqua deionizzata sterile. Al pellet è stato aggiunto fenolo all'85%; la miscela è stata pre-riscaldata a 66-70°C e

incubata per 20 min. L'estratto fenolico è stato raccolto mediante centrifugazione a 20000 g per 20 min a 4°C. Dopo la diluizione 1:10 con acqua deionizzata, l'estratto fenolico è stato dializzato in una soluzione fisiologica di NaCl. L'LPS è stato sottoposto a precipitazione per tutta la notte a -20°C con tre volumi di metanolo/sodio acetato e successivamente il pellet è stato risospeso in acqua deionizzata sterile e conservato a -80°C. La quantità di LPS è stata determinata mediante il metodo del 2-cheto-3-deossiottonato (KDO) (23).

Sieri di controllo positivo e negativo

Il siero di controllo positivo (titolo FdC 1:20; titolo i-ELISA 1:512) è stato ottenuto da maiali sperimentalmente inoculati con *B. suis* biovar 2 inattivata. Il siero di controllo negativo è stato ottenuto da maiali sani.

Sieri campione

I sieri positivi sono stati ottenuti da 106 animali da cui era stata isolata la *B. suis* e i sieri negativi da 1036 animali sani provenienti da allevamenti indenni da brucellosi. In particolare, il pannello dei sieri selezionati era composto da: 46 sieri positivi di cinghiale e 16 sieri negativi di cinghiale forniti dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (Italia); 60 sieri positivi di maiale forniti dal Croatian Veterinary Institute (Zagabria, Croazia) e 1020 sieri di maiale negativi prelevati in allevamenti *Brucella*-free delle regioni Abruzzo e Molise (Italia).

Per la valutazione delle caratteristiche dei test ELISA competitivo e indiretto sono stati utilizzati tutti i sieri del pannello disponibile, mentre per il DELFIA e per l'FPA è stato utilizzato un numero inferiore di sieri del medesimo pannello.

ELISA competitiva

L'LPS (100 µl per pozzetto), diluito in tampone carbonato-bicarbonato 0.05 M (pH 9.6) fino alla concentrazione di 1.6 ng/ml, è stato dispensato in micropiastre a 96 pozzetti (Medium Binding Costar, Corning, New York, USA) e incubato per tutta la notte a temperatura ambiente (TA). Le piastre sono state lavate una volta con PBS

contenente 0.05% di Tween 20 (PBS-T) e sono state saturate con l'1% di estratto di lievito (Panreac, Barcelona, Spagna) in PBS-T a TA per 1 h. Dopo tre lavaggi con PBS-T, 50 µl di PBS (Controllo MAb), 50 µl di siero suino di controllo positivo e negativo e 50 µl di ciascun siero campione sono stati dispensati nei pozzetti e le micropiastre sono state incubate a TA per 1 h. Successivamente le piastre sono state lavate tre volte con PBS-T e incubate con 50 µl/pozzetto di MAb-HRP anti-LPS *Brucella*-(MAb 4B5A) diluito 1:60000 in PBS a TA per 1 h. Dopo ulteriori lavaggi, 100 µl di 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma, St Louis, USA) sono stati dispensati in ciascun pozzetto e le piastre sono state incubate a TA per 30 min. La reazione è stata bloccata mediante l'aggiunta di 50 µl/pozzetto di acido solforico 0.5 N e la densità ottica (DO₄₅₀) è stata misurata a 450 nm. I dati di assorbanza ottenuti sono stati normalizzati utilizzando la formula seguente:

$B/B_0\% = (DO_{450} \text{ siero campione} / DO_{450} \text{ Controllo MAb}) \times 100\%$.

ELISA indiretta

L'LPS (100 µl per pozzetto), diluito in tampone carbonato-bicarbonato 0.05 M (pH 9.6) fino alla concentrazione di 4 ng/ml, è stato dispensato in micropiastre a 96 pozzetti (Medium Binding Costar, Corning, New York, USA) e incubato per tutta la notte. Le piastre sono state lavate una volta con PBS-T e sono state saturate con l'1% di estratto di lievito in PBS-T a TA per 1 h. Dopo tre lavaggi con PBS-T, 50 µl di PBS (Controllo MAb), 50 µl di siero suino di controllo positivo e negativo e 50 µl di ciascun siero campione sono stati dispensati nei pozzetti e le micropiastre sono state incubate a TA per 1 h. Successivamente le piastre sono state lavate tre volte con PBS-T e incubate con 50 µl/pozzetto di MAb-HRP anti-IgG suine (MAb 10C2G5) diluito 1:15000 in PBS a TA per 1 h. Dopo ulteriori lavaggi, 100 µl di TMB sono stati dispensati in ogni pozzetto e le piastre sono state incubate a TA per 30 min. La reazione è stata bloccata mediante l'aggiunta di 50 µl/pozzetto di acido solforico 0.5 N e la densità ottica (DO₄₅₀) è stata misurata a

450 nm. I dati di assorbanza ottenuti sono stati normalizzati utilizzando la formula seguente:
$$PP\% = [(DO_{450} \text{ siero campione} - DO_{450} \text{ Controllo Negativo}) / (DO_{450} \text{ Controllo Positivo} - DO_{450} \text{ Controllo Negativo})] \times 100\%$$

Test DELFIA

L'LPS (100 µl per pozzetto), diluito in tampone sodio fosfato 0.1 M (pH 7.4) fino alla concentrazione di 3.4 ng/ml, è stato dispensato in micropiastre a 96 pozzetti (Polysorp-clear FluoroNunc/LumiNunc, Nunc, Roskilde, DK) e incubato per tutta la notte a TA. Le piastre sono state lavate una volta con il tampone di lavaggio per DELFIA (Perkin Elmer-Wallac, Turku, FIN) e sono state saturate con sieralbumina bovina allo 0.5% in Tris-HCl 0.05 M (pH 7.4) a TA per 2 h. Dopo tre lavaggi, sono stati dispensati nei pozzetti 50 µl di soluzione di diluizione per DELFIA (Perkin Elmer-Wallac, Turku, FIN) (Controllo MAb), 50 µl di siero suino di controllo positivo e negativo e 50 µl di ciascun siero campione e le piastre sono state incubate a TA per 1 h. Successivamente le micropiastre sono state lavate tre volte e incubate con 50 µl/pozzetto di MAb-Eu anti-LPS *Brucella* (MAb 4B5A) diluito 1:20000 in soluzione di diluizione per DELFIA a TA per 1 h. Dopo sei lavaggi, 200 µl di soluzione di rivelazione (Enhancement Solution, Perkin Elmer-Wallac, Turku, FIN) sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e le piastre sono state incubate a TA per 5 min in leggera agitazione. La fluorescenza dell'europio, indicata in colpi per secondo (cps), è stata misurata con il Victor ³V 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer-Wallac, Turku, FIN).

I dati di fluorescenza ottenuti sono stati normalizzati utilizzando la formula seguente:
$$B/B_0\% = (\text{cps siero campione} / \text{cps Controllo MAb}) \times 100\%$$

Test FPA

Il test FPA è stato effettuato utilizzando il "Brucella abortus antibody test kit" (Diachemix, Milwaukee, USA): 180 µl di tampone per FPA sono stati dispensati nei pozzetti di micropiastre nere a 96 pozzetti (Greiner-Bio-One, Frickenhausen, D); successivamente sono stati aggiunti 20 µl/pozzetto di siero di controllo positivo e negativo e di ciascun siero

campione. Le micropiastre sono state incubate per 3 min a TA ed è stata misurata la fluorescenza naturale dei sieri mediante un polarimetro Genios (Tecan, Männedorf, CH) calibrato con fluoresceina 1 nM (filtro di eccitazione 485 nm; filtro di emissione 535 nm; numero di flash = 25; gain = 100). Successivamente, 10 µl di polisaccaride O (OPS) coniugato con fluoresceina sono stati dispensati in ogni pozzetto e le piastre sono state incubate per 2 min a TA in leggera agitazione. La fluorescenza dell'antigene OPS in ogni pozzetto è stata misurata di nuovo con il polarimetro; i valori di fluorescenza così ottenuti sono stati corretti sottraendo il valore della fluorescenza naturale dei sieri dei pozzetti corrispondenti.

I valori ottenuti sono stati trasformati in unità di millipolarizzazione (mP) utilizzando la formula seguente:

$$mP = [(I_v - I_h) / (I_v + I_h)] \times 1000$$

I_v = intensità della luce parallela

I_h = intensità della luce perpendicolare.

Determinazione dei cut-off

I valori ottimali di cut-off per la c-ELISA e la i-ELISA sono stati determinati mediante le curve ROC (*receiver operative curves*) (17, 33) utilizzando i valori di DO_{450} dei sieri analizzati, normalizzati rispettivamente nei confronti della DO_{450} del Controllo MAb (B/B₀%) e delle DO_{450} del Controllo positivo e del Controllo negativo (PP%).

La determinazione del cut-off del test DELFIA è stata effettuata analizzando 30 sieri suini negativi per anticorpi vs *B. suis*. Il valore di cut-off è stato calcolato sottraendo tre deviazioni standard al valore medio dei dati normalizzati (B/B₀%) derivanti dall'analisi del gruppo di sieri negativi.

Il cut-off ottimale del test FPA è stato determinato mediante le curve ROC utilizzando i valori di fluorescenza (mP) dei sieri analizzati.

Risultati

Anticorpi monoclonali

Per sviluppare la c-ELISA è stato utilizzato il MAb 4B5A anti-LPS di *Brucella*, già utilizzato

in precedenza per lo sviluppo di una c-ELISA per la ricerca di anticorpi anti-*Brucella* spp in sieri bovini, ovini e caprini (31). Le cross-reazioni del MAb 4B5A sono mostrate nella Tabella I: il MAb cross-reagisce con la *B. suis* biovar 1 utilizzata in questo lavoro per l'attivazione delle micropiastre.

Sono stati ottenuti sei MAb specifici per le IgG suine, tutti appartenenti alla classe IgG₁, catena leggera kappa. Le cross-reazioni dei MAb anti-

IgG suine sono mostrati nella Tabella II; i MAb che presentavano una DO₄₅₀ maggiore di 0.3 sono stati considerati cross-reattivi. Tra questi è stato scelto il MAb 10C2G5 poiché discriminava meglio i sieri positivi dai sieri negativi nella i-ELISA per la ricerca di anticorpi anti-*B. suis*.

Il MAb 4B5A e il MAb 10C2G5 sono stati entrambi coniugati con perossidasi di rafano per essere utilizzati rispettivamente nella

Tabella I

Cross-reazioni dell'anticorpo monoclonale 4B5A per LPS-*Brucella* in ELISA indiretta

Ceppo batterico	Mab 4B5A*
<i>Brucella melitensis</i> biovar 2	100,0
<i>Brucella melitensis</i> biovar 1	89,0
<i>Brucella melitensis</i> biovar 1 Rev.1	88,9
<i>Brucella abortus</i> strain S19	104,0
<i>Brucella abortus</i> strain S99	98,0
<i>Brucella abortus</i> strain S99 (lipopolysaccharide)	99,8
<i>Brucella abortus</i> biovar 2	100,0
<i>Brucella abortus</i> biovar 3	102,0
<i>Brucella abortus</i> biovar 6	87,0
<i>Brucella suis</i> biovar 1	92,0
<i>Brucella ovis</i>	1,0
<i>Salmonella</i> Enteritidis	0,0
<i>Salmonella</i> Typhimurium	1,0
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	0,0
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	0,0
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:8	0,0
<i>Vibrio cholerae</i>	3,0
<i>Listeria monocytogenes</i>	7,0
<i>Campylobacter jejuni</i>	7,7
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	1,1

* (OD₄₅₀ × /OD₄₅₀ *B. melitensis* biovar 2) × 100

Tabella II

Cross-reazioni degli anticorpi monoclonali anti-IgG suine in ELISA indiretta (DO₄₅₀)

MAbs	Antigene									
	IgG suine	IgM suine	IgG equine	IgM equine	IgG ovine	IgM ovine	IgG bovina	IgM bovina	IgG pollo	IgM pollo
8E10C9	3,4	3,4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	1,5	1,2
8E10D9	1,6	1,5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	1,5	1,5
8E10E8	3,4	3,4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	1,2	1,3
8E10F9	1,5	1,7	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
10C2G5	>4	2,9	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
10C2C11	3,5	2,5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

Mabs anticorpi monoclonali
Ig immunoglobuline
Neg negativo

c-ELISA e nella i-ELISA; il MAb 4B5A è stato inoltre coniugato con europio per essere utilizzato nel test DELFIA.

ELISA competitiva

Nella c-ELISA sono stati testati 80 sieri positivi e 1036 sieri negativi del pannello disponibile; la distribuzione dei valori di B/B₀% è mostrata nella Figura 1. Il valore di B/B₀% del 61.0% è stato selezionato come valore di cut-off del test (Fig. 2): i sieri campione sono stati classificati come positivi se il loro valore di B/B₀% era inferiore al 61.0%, e come negativi se il loro valore di B/B₀% era maggiore o uguale al 61.0%. Con questo valore di cut-off tutti i sieri positivi testati sono risultati positivi in c-ELISA e tutti i sieri negativi sono risultati negativi; la specificità e la sensibilità del test risultano

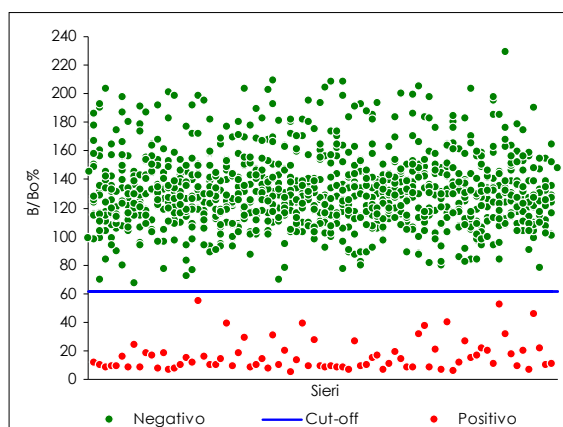


Figura 1
ELISA competitiva: distribuzione dei valori di B/B₀% di 80 sieri positivi e di 1036 sieri negativi. La linea orizzontale rappresenta il valore di cut-off (B/B₀% = 61.0%)

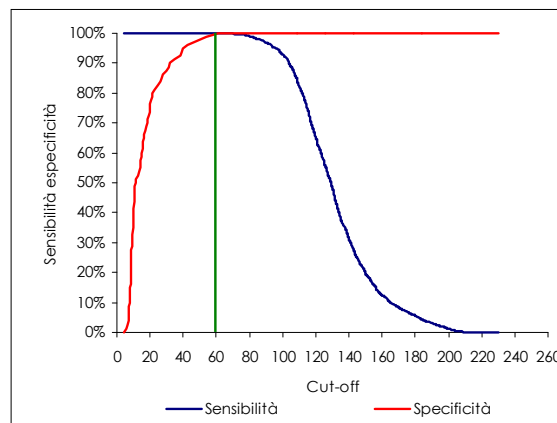


Figura 2
Valore di cut-off dell'ELISA competitiva calcolato secondo i valori di sensibilità e specificità

essere entrambe del 100%, come indicato nella Tabella III.

ELISA indiretta

Nella i-ELISA sono stati testati 106 sieri positivi e 982 sieri negativi del pannello disponibile; la distribuzione dei valori di PP% è mostrata in Figura 3. Per avere la massima sensibilità, è stato scelto come cut-off il valore di PP% del 21.7% (Fig. 4): i sieri campione sono stati classificati come positivi se il loro valore di PP% era superiore o uguale al 21.7%, e come negativi se il loro valore di PP% era inferiore al 21.7%. Con questo valore di cut-off tutti i sieri positivi testati sono risultati positivi in i-ELISA, 9 sieri negativi sono risultati falsi positivi e i rimanenti 973 sieri negativi sono risultati negativi; la specificità e la sensibilità del test risultano essere rispettivamente 99.1% e 100.0%, come indicato nella Tabella IV.

Tabella III
Confronto tra la c-ELISA e l'isolamento di *Brucella suis*; sensibilità e specificità della c-ELISA

Competitive enzyme-linked immunosorbent assay	Isolamento di <i>Brucella suis</i>		Totale
	Positivi	Negativi	
Positivi	80	0	80
Negativi	0	1036	1036
Totale	80	1036	1116
Percentuale	Limite di confidenza inferiore*		Limite di confidenza superiore*
Sensibilità 100.0	96,4		100,0
Specificità 100.0	99,7		100,0

* limiti di confidenza al 95% di probabilità

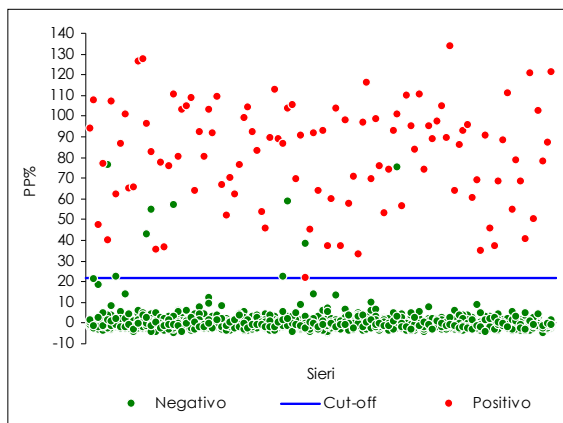


Figura 3
ELISA indiretta: distribuzione dei valori di PP di 106 sieri positivi e di 982 sieri negativi
La linea orizzontale rappresenta il valore di cut-off (PP% = 21.7%)

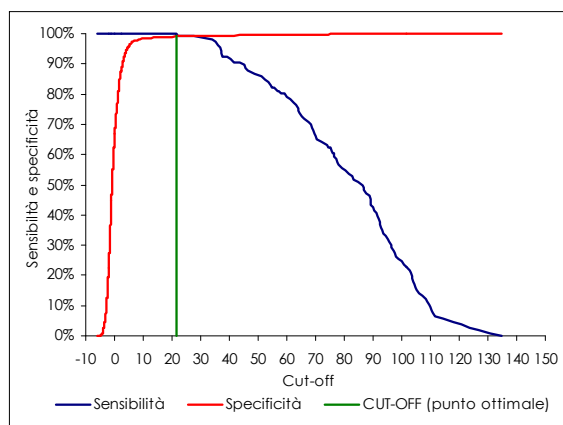


Figura 4
Valore di cut-off dell'ELISA indiretta calcolato secondo i valori di sensibilità e specificità

Test DELFIA

Nel test DELFIA sono stati esaminati solo 60 sieri positivi e 212 sieri negativi del pannello; la distribuzione dei valori di B/B₀% è mostrata

nelle Figure 5 e 6. Il valore di B/B₀% del 37% è stato calcolato come cut-off (media dei valori di B/B₀% dei 30 sieri negativi testati - 3 deviazioni standard): i sieri campione sono stati classificati come positivi se il loro valore di B/B₀% era inferiore al 37% e come negativi se il loro valore di B/B₀% era maggiore o uguale al 37%. Con questo valore di cut-off, 20 dei 212 sieri negativi testati sono risultati falsi positivi e 15 dei 60 sieri positivi testati sono risultati falsi negativi; la specificità e la sensibilità del test risultano essere rispettivamente 91% e 75%, come indicato nella Tabella V. Dati i risultati non soddisfacenti ottenuti non sono stati testati ulteriori sieri. La resa della marcatura del MAb 4B5A con l'europeo era 8.2 (valore atteso di resa della marcatura per gli anticorpi monoclonali: 6-10).

Test FPA

Nell'FPA commerciale, validato per i sieri bovini, sono stati testati, per confermare la validità del test per i sieri suini, 77 sieri positivi e 750 sieri negativi del pannello disponibile; la distribuzione dei valori di mP è mostrata nella Figura 7. Il valore di mP di 99.5 è stato scelto come cut-off (Fig. 8): i sieri campione testati sono stati classificati come positivi se il loro valore di mP era superiore a 99.5 e come negativi se il loro valore di mP era uguale o inferiore a 99.5. Con questo valore di cut-off, tutti i sieri positivi testati sono risultati positivi in FPA e tutti i sieri negativi sono risultati negativi; la specificità e la sensibilità del test risultano essere entrambe 100%, come indicato nella Tabella VI.

Tabella IV

Confronto tra la i-ELISA e l'isolamento di *Brucella suis*; sensibilità e specificità della i-ELISA

Indirect enzyme-linked immunosorbent assay	Isolamento di <i>Brucella suis</i>		Totale
	Positivi	Negativei	
Positivi	106	9	115
Negativi	0	973	973
Totale	106	982	1088
Percentuale	Limite di confidenza inferiore*		Limite di confidenza superiore*
Sensibilità 100.0	97.2		100.0
Specificità 99.1	98.3		99.5

* limiti di confidenza al 95% di probabilità

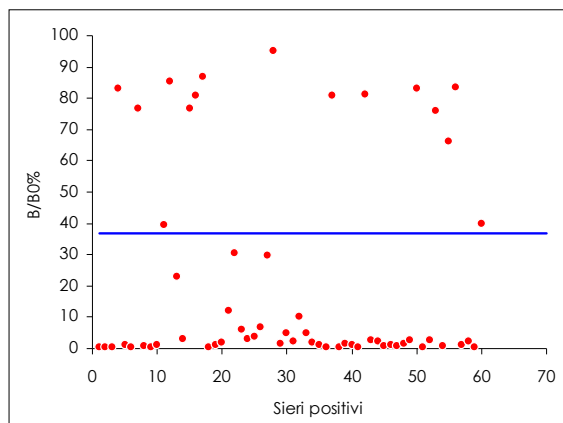


Figura 5
Test DELFIA: distribuzione dei valori di B/B₀% di 60 sieri positivi
La linea orizzontale rappresenta il valore di cut-off (B/B₀% = 37%)

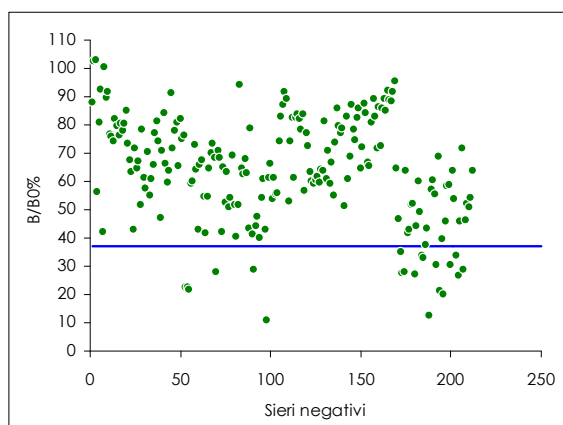


Figura 6
Test DELFIA: distribuzione dei valori di B/B₀% di 212 sieri negativi
La linea orizzontale rappresenta il valore di cut-off (B/B₀% = 37%)

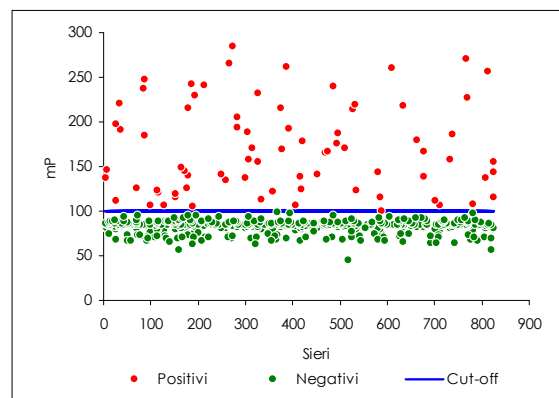


Figura 7
Test FPA: distribuzione dei valori di mP di 77 sieri positivi e di 750 sieri negativi
La linea orizzontale rappresenta il valore di cut-off (mP = 99.5)

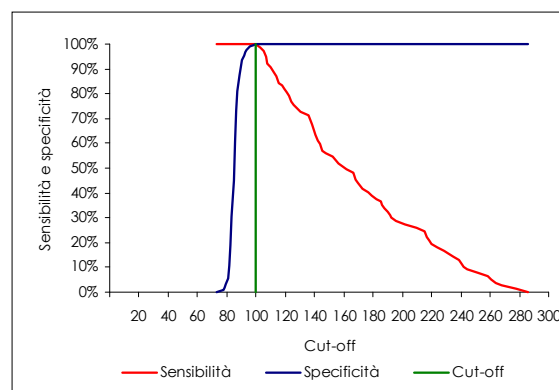


Figura 8
Valori di cut-off dell'FPA calcolati secondo i valori di sensibilità e specificità

Tabella V

Confronto tra il test DELFIA e l'isolamento di *Brucella suis*; sensibilità e specificità del DELFIA

Dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay (DELFLIA)	Isolamento di <i>Brucella suis</i>		
	Positivi	Negativi	Totale
Positivi	45	20	65
Negativi	15	192	207
Totale	60	212	272
Percentuale	Limite di confidenza inferiore*		Limite di confidenza superiore*
Sensibilità 75.0	-	-	-
Specificità 91.0	-	-	-

* limiti di confidenza al 95% di probabilità

Tabella VI
Confronto tra l'FPA e l'isolamento di *Brucella suis*; sensibilità e specificità dell'FPA

Fluorescence polarisation assay (FPA)	Isolamento di <i>Brucella suis</i>		Totale
	Positivi	Negativi	
Positivi	77	0	77
Negativi	0	750	750
Totale	77	750	827
Percentuale	Limite di confidenza inferiore*		Limite di confidenza superiore*
Sensibilità 100.0	96.2		100.0
Specificità 100.0	99.2		100.0

* limiti di confidenza al 95% di probabilità

Discussione

Nei suini la brucellosi è causata principalmente da *Brucella suis* biovar 1, 2 e 3; le altre specie di *Brucella* rinvenute raramente nei suini sono *B. abortus* e *B. melitensis* (3). La *B. suis* biovar 1 è comune in Sud America e Asia, mentre le *B. suis* biovar 1 e 3 sono state identificate negli Stati Uniti d'America, in Australia e nella Repubblica Popolare Cinese. Il ceppo più comunemente isolato in Europa è la *B. suis* biovar 2, il cui naturale serbatoio è costituito dal cinghiale e/o dalla lepre europea (1, 4, 9, 11, 15, 24, 28), ma sono presenti anche le biovar 1 e 3. In Italia sono state isolate le *B. suis* biovar 1 e 2 (8, 10, 12, 18). La *B. suis* biovar 2 è raramente patogena per l'uomo, ma le biovar 1 e 3 sono altamente patogene e possono causare forme gravi della malattia (3, 4, 41).

La brucellosi suina era stata eradicata in molti paesi europei negli anni '70 a seguito dell'industrializzazione delle fattorie; negli anni '90 la malattia è riemersa negli allevamenti estensivi, trasmessa da lepri e cinghiali. I test sierologici disponibili per la diagnosi di brucellosi suina, descritti nel Manual of Diagnostic Tests and Vaccines dell'OIE (41), sono l'ELISA indiretta e competitiva, l'agglutinazione rapida al Rosa Bengala (RBT), il test FPA e, sebbene sconsigliata, la fissazione del complemento. Nessuno dei test disponibili presenta valori ottimali in termini di sensibilità e, soprattutto, di specificità per la diagnosi individuale, a causa di reazioni false positive dovute probabilmente a cross-reazioni con altri batteri

e principalmente con *Yersinia enterocolitica* O:9. Il siero suino può talvolta contenere anticorpi aspecifici, probabilmente IgM, che riducono la specificità dei test convenzionali, in particolare dei test di siero-agglutinazione; inoltre il complemento suino reagisce con il complemento di cavia dando origine ad una attività pro-complementare che riduce la sensibilità del test di fissazione del complemento (41).

Conclusioni

In questo studio sono stati valutati la sensibilità e la specificità diagnostica dei metodi ELISA indiretta e competitiva e del metodo DELFIA, sviluppati con LPS di *B. suis* (antigene omologo) ed è stata valutata la performance di un test FPA commerciale nei confronti di sieri suini, con l'obiettivo di valutare i metodi descritti dalla letteratura internazionale per la diagnosi di brucellosi suina e sviluppare nuovi metodi, possibilmente più specifici, per predisporre un protocollo diagnostico.

Con il metodo c-ELISA, ad un cut-off del 61.0% (B/B₀%), si hanno la massima sensibilità (limiti di confidenza compresi tra 96.4% e 100.0%) e la massima specificità (limiti di confidenza compresi tra 99.7% e 100.0%). Con il metodo i-ELISA, fissando il cut-off al 21.7% (PP%), si hanno la massima sensibilità (limiti di confidenza compresi tra 97.2% e 100.0%) e la massima specificità (limiti di confidenza compresi tra 98.3% e 99.5%). Il test FPA, che ha mostrato alti valori di specificità (limiti di confidenza compresi tra 99.2% e 100.0%) e di

sensibilità (limiti di confidenza compresi tra 96.2% e 100.0%), potrebbe essere utilizzato come metodo di screening se i risultati ottenuti in questo studio saranno confermati dai risultati di ulteriori test da effettuare sul campo.

Il metodo DELFIA, già utilizzato per la ricerca di ormoni steroidei e di residui di farmaci veterinari, di citochine, di anticorpi e di antigeni batterici e virali (2, 6, 13, 14, 20, 27, 35), in questa fase di sviluppo non ha presentato un buon grado di specificità e di sensibilità (rispettivamente 91.0% e 75%) e, in considerazione dell'elevato costo dell'europroio usato nel metodo, si prevede di non utilizzarlo nella diagnostica routinaria.

I risultati ottenuti suggeriscono che la combinazione di c-ELISA, i-ELISA e FPA potrebbe rappresentare un'ideale soluzione nella diagnosi sierologica della brucellosi suina, grazie alle loro elevate sensibilità e specificità. Comunque la mancanza di un siero internazionale standard per i suini, esistente invece per i bovini e gli ovi-caprini, rappresenta ancora il maggior limite nella standardizzazione di test per la diagnosi

sierologica della brucellosi suina. Infine, uno studio pilota per l'applicazione sul campo di un protocollo diagnostico che preveda l'uso combinato dei tre test precedentemente descritti, utilizzando un cut-off definito, è necessario per valutare la reale performance dei test nelle condizioni di campo, in particolare per valutarne la sensibilità in caso di focolai e la specificità per evitare reazioni false positive in allevamenti indenni dalla malattia.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano il dr. Flavio Sacchini per la revisione critica del testo.

Supporto finanziario

Questa ricerca è stata finanziata con un contributo del Ministero della Salute Italiano (codice progetto IZSAM 0705 RC TE).

References

1. Al Dahouk S., Nöckler K., Tomaso H., Splettstoesser W.D., Jungersen G., Riber U., Petry T., Hoffmann D., Scholz H.C., Hensel A. & Neubauer H. 2005. Seroprevalence of brucellosis, tularemia and yersiniosis in wild boars (*Sus scrofa*) from north-eastern Germany. *J Vet Med B*, **52**, 444-455.
2. Allicotti G., Borras E. & Pinilla C. 2003. A time-resolved fluorescence immunoassay (DELFA) increases the sensitivity of antigen-driven cytokine detection. *J Immunoassay Immunochem*, **24** (4), 345-358.
3. Anon. 2007. Porcine and ruminant brucellosis: *Brucella suis*. Center for Food Security and Public Health, Iowa State University, Ames, 1-6.
4. Anon. 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.
5. Ansari A.A. & Chang T.S. 1993. Immunochemical studies to purify rabbit and chicken immunoglobulin G antibody by protein A-Sepharose chromatography. *Am J Vet Res*, **44** (5), 901-906.
6. Antolini F. & Bolletta G. 2000. Tecniche di fluorimetria ritardata nel tempo (DELFA), chemiluminescenza e RIA per la determinazione del 17 β -estradiolo nel siero bovino. *Zootecn Nutrizione Anim*, **26**, 189-198.
7. Asbakk K., Gall D. & Stuen S. 1999. A screening ELISA for brucellosis in reindeer. *J Vet Med B*, **46**, 649-657.
8. 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 Wildlife Dis*, **45** (4), 1178-1181.
9. Closa-Sebastià F., Casas-Díaz E., Cuenca R., Lavín S., Mentaberre G. & Marco I. 2010. *Brucella* species antibodies and isolation in wild boar in north-east Spain. *Vet Rec*, **167**, 826-828.
10. Cvetnić Ž., Špičić S., Curić S., Jukić B., Lojkić M., Albert D., Thiébaud M. & Garin-Bastuji B. 2005. Isolation of *Brucella suis* biovar 3 from horses in Croatia. *Vet Rec*, **156**, 584-585.

11. Cvetnić Ž., Špičić S., Tončić J., Majnarić D., Benić M., Albert D., Thiébaud M. & Garin-Bastuji B. 2009. *Brucella suis* infection in domestic pigs and wild boars in Croatia. *Rev Sci Tech*, **28** (3), 1057-1067.
12. Dondo A., Grattarola C., Gennero S., Zoppi S. & Di Giannatale E. 2003. Osservazioni preliminari sulla presenza di *Brucella suis* bivoar 1 nel cinghiale in Piemonte. *Progresso Vet*, **3**, 112-116.
13. Elliott C.T., Francis K.S. & McCaughey W.J. 1994. Investigation of dissociation enhanced lanthanide fluoroimmunoassay as an alternative screening test for veterinary drug residues. *Analyst*, **119** (12), 2565-2569.
14. Elliott C.T., Francis K.S., Shortt H.D. & McCaughey W.J. 1995. Determination of the concentrations of the steroids estradiol, progesterone and testosterone in bovine sera: comparison of commercial dissociation enhanced lanthanide fluorescence immunoassay kits with conventional radio and enzyme immunoassays. *Analyst*, **120** (6), 1827-1830.
15. Ferrão-Beck L., Cardoso R., Muñoz P.M., de Miguel M.J., Albert D., Ferreira A.C., Marín C.M., Thiébaud M., Jacques I., Grayon M., Zygmunt M.S., Garin-Bastuji B., Blasco J.M. & Sá M.I. 2006. Development of a multiplex PCR assay for polymorphism analysis of *Brucella suis* biovars causing brucellosis in swine. *Vet Microbiol*, **115**, 269-277.
16. Franco M.P., Mulder M., Gilman R.H. & Smits H.L. 2007. Human brucellosis. *Lancet Infect Dis*, **7**, 775-786.
17. Gardner I.A. & Greiner M. 2000. Advanced methods for test validation and interpretation in veterinary medicine. Freie Universität, Berlin, 1-78.
18. 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). *Épid Santé Anim*, **49**, 59-62.
19. Goding J.W. 1996. Monoclonal antibodies: principles and practice. Third Ed. Academic Press Limited, London, 154-156.
20. Guzaeva T.V., Komarov A.M., Yurov S.V., Pchelintsev S.Y., Chudinov A.V. & Afanasiev S.S. 1993. Protein A used in DELFIA for the determination of specific antibodies. *Immunol Lett*, **35** (3), 285-289.
21. 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.
22. Hermanson, G.T., Krishna Mallia A. & Smith P.K. 1992. Immobilized affinity ligand techniques. Academic Press, San Diego, 244-249.
23. Karkharis Y.D., Zeltner J.Y., Jackson J.J. & Carlo D.J. 1978. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. *Anal Biochem*, **85** (2), 595-601.
24. Leuenberger R., Boujon P., Thür B., Miserez R., Garin-Bastuji B., Rüfenacht J. & Stärk K.D.C. 2007. Prevalence of classical swine fever, Aujeszky's disease and brucellosis in a population of wild boar in Switzerland. *Vet Rec*, **160**, 362-368.
25. Luciani M., Armillotta G., Magliulo M., Portanti O., Di Febo T., Di Giannatale E., Roda A. & Lelli R. 2006. Production and characterisation of monoclonal antibodies specific for *Escherichia coli* O157:H7. *Vet Ital*, **42** (3), 173-182.
26. Malavasi F. & Bargellesi-Severi A. 1992. Anticorpi monoclonali. Tecniche di base I. PhD Thesis 02. In I Manuali delle scuole. Edizioni SOSB-SIOMS, Genoa, 1-208.
27. Markela E., Stahlberg T.H. & Hemmila I. 1993. Europium-labelled recombinant protein G. A fast and sensitive universal immunoreagent for time-resolved immunofluorometry. *J Immunol Methods*, **161** (1), 1-6.
28. Muñoz P.M., Boadella M., Arnal M., de Miguel M.J., Revilla M., Martínez D., Vicente J., Acevedo P., Oleaga Á., Ruiz-Fons F., Marín C.M., Prieto J.M., de la Fuente J., Barral M., Barberán M., Fernández de Luco D., Blasco J.M. & Gortázar C. 2010. Spatial distribution and risk factors of brucellosis in Iberian wild ungulates. *BMC Infect Dis*, **10**, 1-14.
29. Nakane P.K. & Kawaoi A. 1974. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem*, **22**, 1084-1091.
30. Nielsen K., Gall D., Smith P., Vigliocco A., Perez B., Samartino L., Nicoletti P., Dajer A, Elzer P. & Enright F. 1999. Validation of the fluorescence polarization assay as a serological test for the presumptive diagnosis of porcine brucellosis. *Vet Microbiol*, **68**, 245-253.
31. Portanti O., Tittarelli M., Di Febo T., Luciani M., Mercante M.T., Conte A. & Lelli R., 2006. Development and validation of a competitive ELISA kit for the serological diagnosis of ovine, caprine and bovine brucellosis. *J Vet Med B*, **53**, 494-498.

32. Schulman M., Wilde C.D. & Kohler G. 1978. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature*, **276**, 269-270.
33. Siegel S. & Castellan N.J. 1988. Nonparametric statistics for the behavioral sciences, Second Ed. McGraw-Hill, New York, 1-399.
34. Silva Paulo P., Vigliocco A.M., Ramondino R.F., Marticorena D., Bissi E., Briones G., Gorchs C., Gall D. & Nielsen K. 2000. Evaluation of primary binding assays for presumptive serodiagnosis of swine brucellosis in Argentina. *Clin Diagn Lab Immunol*, **7** (5), 828-831.
35. Smith D.R., Rossi C.A., Kijek T.M., Henchal E.A. & Ludwig G.V. 2001. Comparison of dissociation-enhanced lanthanide fluorescent immunoassays to enzyme-linked immunosorbent assays for detection of staphylococcal enterotoxin B, *Yersinia pestis*-specific F1 antigen and Venezuelan equine encephalitis virus. *Clin Diagn Lab Immunol*, **8** (6), 1070-1075.
36. Smither S.J., Perkins S.D., Davies C. & Stagg A.J. 2009. Development and characterization of mouse models of infection with aerosolized *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Clin Vaccine Immunol*, **16** (5), 779-783.
37. Szulowski K., Iwaniak W., Pilaszek J., Truszczyński M. & Chrobocińska M. 1999. The ELISA for the examination of hare sera for anti-*Brucella* antibodies. *Comp Immunol Microb Infect Dis*, **22**, 33-40.
38. Szulowski K., Iwaniak W., Złotnicka J., Weiner M., Zaręba Z. & Czępińska H. 2011. International trade – a potential source of brucellosis in pigs. *Med Weter*, **67** (1), 64-66.
39. Thoen C.O., Hopkins M.P., Armbrust A.L., Angus R.D. & Pietz D.E. 1980. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in sera of *Brucella suis*-infected swine. *Can J Comp Med*, **44**, 294-298.
40. Watarai M., Ito M., Omata Y. & Ishiguro N. 2006. A serological survey of *Brucella* spp. in free-ranging wild boars (*Sus scrofa leucomystax*) in Shikoku, Japan. *J Vet Med Sci*, **68** (10), 1139-1141.
41. World Organisation for Animal Health (Office International des Épizooties: OIE) 2009. Porcine brucellosis. In Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. OIE, Paris, 1-7.