

## DIAGNOSI DI PARATUBERCOLOSI BOVINA: VALUTAZIONE DI UN TEST ELISA DEL COMMERCIO SU SIERO E LATTE DI ANIMALI INFETTI IN FORMA SUBCLINICA

N. Arrigoni<sup>1</sup>, GL. Belletti<sup>1</sup>, G. Cammi<sup>1</sup>, R. Taddei<sup>1</sup>, D. Pravettoni<sup>2</sup>, A. Belloli<sup>2</sup>, M. Tamba<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna – Centro di Referenza nazionale per la paratuberculosis bovina – Sezione di Piacenza (Italia)

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie – Sezione di Clinica Medica Veterinaria (Milano, Italia)

Keywords: bovino, paratuberculosis, ELISA

### Abstract

The purpose of the study was to evaluate sensitivity and specificity of a commercial ELISA kit applied to serum and milk samples collected respectively from cows subclinically infected and uninfected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

The average sensitivity values of serum and milk ELISA were respectively 44% and 40%, well reflecting the extent of fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

ELISA specificity, tested on individual milk and serum samples obtained from an uninfected herd, resulted 100%.

Detectability limit of milk ELISA, defined as its ability to detect a positive sample serially diluted in negative bulk milk, resulted highly depending on the S/P value of the positive sample examined.

### Introduzione

Il test d'elezione per la diagnosi di Paratuberculosis bovina è a tutt'oggi considerato la coltura fecale, in quanto dotato di specificità 100% e maggiore sensibilità tra i test attualmente disponibili per la diagnosi di paratuberculosis bovina.

D'altro canto i numerosi inconvenienti di tale test, quali i lunghi tempi di attesa per la risposta, i frequenti inquinamenti che ne inficiano il risultato, i costi elevati, la necessità di attrezzature e personale specializzato e dotato di esperienza ne limitano l'applicazione in campo.

Il test ELISA presenta indubbi vantaggi rispetto alla coltura fecale, legati alla semplicità di esecuzione, alla rapidità di risposta e ai costi ridotti, anche se, secondo i dati riportati in letteratura, presenta una sensibilità ridotta rispetto alla coltura fecale e variabile in funzione dello stadio di infezione (4). Recentemente è stata proposta l'applicazione degli stessi kit ELISA al latte, come substrato alternativo al sangue, per la maggiore praticità di raccolta del campione.

Gli obiettivi del presente lavoro sono:

1. verificare la **sensibilità** di un test sierologico ELISA del commercio su sangue e latte di singoli animali con infezione subclinica a diverso livello di escrezione fecale;
2. verificare la **concordanza** tra i risultati del test sierologico ELISA eseguito su sangue e latte degli stessi animali escretori in forma subclinica;
3. verificare la **specificità** dello stesso test sierologico ELISA su sangue e latte di singoli animali appartenenti ad un allevamento indenne da paratuberculosis;
4. verificare il **limite di rilevabilità** del test ELISA in esame sul latte, inteso come massima diluizione di un latte positivo all'interno di un latte di massa, in grado di dare ancora un segnale rilevabile.

### Materiali e metodi

#### Animali infetti da Map

350 bovine in lattazione, appartenenti ad un allevamento di 650 capi di razza Frisona Italiana di età superiore a 15 mesi, sono state sottoposte, per due volte a distanza di un anno circa, a:

- prelievo di feci per esame colturale;

- prelievo di latte e sangue per esame sierologico ELISA. Sulla base dell'esito positivo alla coltura fecale, sono stati individuati ed inclusi nella sperimentazione 50 animali sicuramente infetti.

#### Animali Controllo

130 bovine di razza Frisona Italiana, appartenenti ad un allevamento indenne da paratuberculosis, in quanto ripetutamente sieronegativo e senza segnalazioni di casi clinici, né introduzione di animali negli ultimi 3 anni, sono state sottoposte a prelievi di sangue e latte da sottoporre a test ELISA.

#### Esame colturale delle feci

10 grammi di feci, prelevate direttamente dall'ampolla rettale e trasferite immediatamente al laboratorio in condizione di refrigerazione, sono state sottoposte a esame colturale, secondo le metodiche descritte da Arrigoni e coll. (2).

In base al numero medio di colonie/provetta, i soggetti infetti sono stati suddivisi, secondo la classificazione proposta da Whitlock e coll. (5), in :

- a bassa escrezione (LS): < 10 colonie / provetta
- a escrezione moderata (MS): 10-50 colonie / provetta
- ad alta escrezione (HS): > 50 colonie / provetta

#### ELISA sul latte e sul sangue

Per entrambe le matrici è stato utilizzato il kit "Mycobacterium paratuberculosis ELISA Screening" (Institut Pourquier, Montpellier, Francia), secondo il protocollo consigliato dalla ditta produttrice.

Sui campioni di sangue e/o latte risultati positivi al test di screening è stata effettuata la prova di conferma mediante il kit "Mycobacterium paratuberculosis ELISA verification" (Institut Pourquier, Montpellier, France), secondo il protocollo consigliato dalla ditta produttrice.

In caso di positività, viene espresso il valore di S/P, che corrisponde al valore di densità ottica normalizzata, calcolata secondo quanto previsto dalle istruzioni del kit.

Per la determinazione del limite di rilevabilità, 8 campioni di latte individuale positivi a diverso titolo (S/P variabile da 0,37 a 2,24), appartenenti ad animali infetti, sono stati diluiti in latte appartenente a una bovina controllo (S/P < 0,05) mediante diluizioni seriali da 1:2 a 1:256.

#### Analisi statistica

Per il test ELISA, eseguito da sangue e da latte, sono stati valutati i seguenti parametri:

- Sensibilità;
- Specificità;
- Limiti fiduciali al 95% (I.f.95%) della Sensibilità e Specificità, calcolati con il metodo esatto;
- Accuratezza, espressa come:  
Indice di Youden = Se+Sp-1
- Coefficiente di Concordanza tra i risultati del test ELISA eseguito su sangue e su latte di animali infetti, secondo il metodo descritto da Altman (1);
- Limite di rilevabilità, inteso come massima diluizione che può subire un latte positivo al test ELISA all'interno di un latte di massa, in modo da fornire un segnale ancora rilevabile.

**Risultati****Sensibilità test ELISA su sangue e latte**

I risultati del test ELISA su sangue, valutata su animali infetti in forma subclinica a vario livello di escrezione fecale, dimostrano livelli di sensibilità del 23% (LS), 100% (MS) e 90% (HS), con un risultato complessivo del 44% (I.f.95%: 30,0%-53,7%).

I risultati del test ELISA su latte appartenente agli stessi animali dimostrano percentuali di sensibilità del 20% (LS), 80% (MS) e 90%(HS), con un risultato complessivo del 40% (I.f.95%: 26,4%-54,8%).

**Specificità test ELISA su sangue e latte**

Il test ELISA, eseguito su sangue e latte di 130 animali indenni, ha sempre fornito esito negativo. La specificità del test ELISA, sia su sangue che su latte, è risultata essere del 100% (I.f.95%: 97,2%-100%).

**Accuratezza Test ELISA**

Su sangue: Indice di Youden=0,44

Su latte: Indice di Youden=0,40

**Concordanza tra test ELISA su sangue e latte di animali infetti**

Applicando il test K secondo Altman (1), osserviamo un coefficiente di concordanza tra i risultati del test ELISA eseguito da sangue e latte di animali infetti pari a K=0,84 (ottima 0,81-1.00).

		ELISA latte		totali
		Positivo	Negativo	
ELISA sangue	Positivo	19	3	22
	Negativo	1	27	28
totali		20	30	50

Tab. 1: Concordanza tra esito test ELISA da sangue e latte

**Limite di rilevabilità del test ELISA su latte**

I risultati, espressi in S/P, dell'analisi di 8 campioni di latte positivo, e delle relative diluizioni in latte negativo, sono riportate in tabella 2.

TQ	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
0,37	0,21	0,09	0,14	0,11	0,06	0,04	0,07	0,05
0,66	0,46	0,29	0,16	0,08	0,05	0,05	0,05	0,02
0,84	0,64	0,47	0,18	0,18	0,03	0,06	0,05	0,05
0,95	0,65	0,49	0,18	0,10	0,05	0,08	0,08	0,07
0,98	0,73	0,40	0,20	0,13	0,10	0,04	0,04	0,05
1,12	0,73	0,53	0,25	0,21	0,08	0,04	0,04	0,06
1,36	1,11	0,71	0,45	0,31	0,17	0,09	0,06	0,06
2,24	2,09	2,03	1,70	1,00	0,82	0,33	0,22	0,14

Tab. 2: Limite di rilevabilità nel latte.

**Legenda:**

positivo

non conclusivo

negativo

**Discussione e Conclusioni**

Essendo la risposta sierologica fortemente condizionata dallo stadio di infezione, la valutazione complessiva della sensibilità del test ELISA in un allevamento infetto deve, raccomanda Sockett (3), "includere animali in ogni stadio di infezione nella proporzione in cui sono rappresentati in natura nell'allevamento infetto".

Whitlock (5), da una analisi quantitativa delle popolazioni di animali infetti nei vari stadi di infezione, riporta che, in un allevamento colpito da *Map*, la popolazione di animali infetti in forma subclinica ed escretori di *Map* con le feci si può suddividere in 3 stadi, secondo il livello di escrezione:

- lieve (LS) rappresentata dal 71% degli animali

- moderato (MS): rappresentata dal 10% degli animali

- alto (HS): rappresentata dal 19% degli animali

La distribuzione degli animali da noi campionati per la valutazione della sensibilità del test ELISA, concorda perfettamente con la distribuzione osservata da Whitlock (70% LS, 10% MS, 20% HS). Il dato complessivo di sensibilità del test ELISA dal sangue (44%) concorda con i dati riportati precedentemente dalla letteratura su analoghe popolazioni di animali (4,5).

Il test ELISA dal latte dimostra una sensibilità (40%), in bovine con infezione subclinica nelle varie fasi di infezione, lievemente inferiore al test sul siero (44%); il livello di concordanza tra i test è comunque risultato ottimo.

Alla luce di ciò, e dopo una opportuna conferma in una popolazione più ampia, potrebbe ipotizzarsi l'utilizzo del latte delle singole bovine come substrato per la diagnosi di paratuberculosis mediante test ELISA, cosa che potrebbe evitare all'allevatore la necessità di effettuare un ben più indagoso prelievo di sangue, con notevole risparmio di tempo e denaro.

Il livello di risposta al test ELISA, confermando quanto osservato da altri autori (3,4,5), è risultato correlato allo stadio di infezione, con percentuali variabili dal 23% (LS) al 90% (HS) per il sangue e dal 20% (LS) al 90% (HS) per il latte.

Il preadsorbimento dei sieri con *Mycobacterium phlei*, caratteristica comune ai vari kit ELISA in commercio, e l'analisi su doppio pozzetto (adsorbito e non) proposta dal kit in esame, limitando la possibilità di reazioni crociate con micobatteri eterologhi, ha notevolmente migliorato la specificità del test ELISA, che dai nostri dati risulta essere, analogamente a quanto riportato da precedenti studi (3,4,5), superiore al 99%.

Ai fini dell'utilizzo del test ELISA sul latte di massa è stato valutato il limite di rilevabilità (massima diluizione che può subire un latte positivo al test ELISA all'interno di un latte di massa, in modo da fornire un segnale ancora rilevabile); tale valore è risultato fortemente influenzato dalla concentrazione anticorpale (valore di S/P) del latte individuale di partenza; se infatti un latte individuale con esito dubbio non è più rilevabile dopo una diluizione 1:2, un latte fortemente positivo (S/P 2,24) è rilevabile per diluizioni fino a 1:64.

In base ai dati da noi rilevati, il test ELISA applicato al latte di massa sembra idoneo ad identificare allevamenti con elevata prevalenza di infezione, ma non risulta idoneo per l'utilizzo all'interno di piani di certificazione aziendale.

**Bibliografia**

1. Altman D.G. (1991). Practical statistics for medical research, Ed. Chapman and Hall.
2. Arrigoni N., Cesena C., Belletti G.L., Pravettoni D., Belloli A. (2004): Presenza di *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* nel latte di bovine con infezione subclinica: dati preliminari per l'analisi del rischio. Atti Soc.It.Buiatria, XXXVI, 143-148
3. Sockett D.C., Conrad T.A., Thomas C.B., Collins M.T. (1992): Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. J.Clin.Microb. 30, 5,1134-1139
4. Sweeney R.W., Whitlock R.H., Buckley C.L., Spencer P.A., (1995): Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. J.Vet.Diagn.Invest. 7, 488-493
5. Whitlock R.H., Wells S.J., Sweeney R.W., Van Tiem J. (2000): ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. Vet. Microb. 77, 387-398.