ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Brucellosi animali: rassegna sul fenomeno delle aspecificità e delle discordanze tra sieroagglutinazione rapida con antigene al rosa bengala e fissazione del complemento

Franco Ciuchini (a), Rosanna Adone (a), Paolo Pasquali (a), Cinzia Marianelli (a), MichelaTarantino (a), Ennio Bandino (b), Antonino Firinu (b), Manuele Liciardi (b), Stefano Lollai (b), Lorenzo Battistacci (c), Manuela Dalla Pozza (d)

(a) Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) Dipartimento Territoriale di Nuoro,
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari
(c) Area Piani di Eradicazione e Sorveglianza Malattie Infettive ,
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia
(d) Centro Regionale di Epidemiologia Veterinaria,
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Padova

ISSN 1123-3117
Rapporti ISTISAN
05/21

Istituto Superiore di Sanità
Rassegna sul fenomeno delle reazioni sierodiagnostiche aspecifiche e delle discordanze tra sieroagglutinazione rapida con antigene al rosa bengala e fissazione del complemento nella diagnosi delle brucellosi animali.
Franco Ciuchini, Rosanna Adone, Paolo Pasquali, Cinzia Marianelli, MichelaTarantino, Ennio Bandino, Antonino Firinu, Manuele Liciardi, Stefano Lollai, Lorenzo Battistacci, Manuela Dalla Pozza
2005, ii, 47 p. Rapporti ISTISAN 05/21

I programmi di eradicazione delle brucellosi animali prevedono una sorveglianza siero-epidemiologica degli allevamenti bovini e ovi-caprini che si avvale delle reazioni di SieroAgglutinazione Rapida con antigene al Rosa Bengala (SAR-Ag:RB) e di Fissazione del Complemento miniaturizzata (FdC-mi), utilizzate, rispettivamente, come reazioni di screening e di diagnosi individuale. Nella diagnosi sierologica di brucellosi si possono verificare reazioni aspecifiche nelle quali i risultati non trovano riscontro con l'effettiva presenza o assenza della malattia sia a livello epidemiologico che clinico o batteriologico. Una particolare importanza rivestono le reazioni falsamente positive che, in una situazione di bassa prevalenza di infezione, possono indurre ad una sovrastima dei casi positivi con restrizioni pesanti a carico degli allevatori. Le due reazioni possono anche fornire risultati discordanti in cui il riscontro effettivo con l'infezione brucellare si ha in uno solo dei due casi. In questa rassegna vengono considerate tutte le possibili cause delle discordanze e delle reazioni aspecifiche, sia falsamente positive che negative, che hanno creato e creano tutt'ora rilevanti problemi nell'ambito della sorveglianza siero-epidemiologica.
Parole chiave: Brucellosi, Reazioni sierologiche aspecifiche, Sieroagglutinazione rapida con antigene al rosa bengala, Fissazione del complemento

Istituto Superiore di Sanità
Causes of nonspecific reactions in serological tests rose bengal plate test and complement fixation test for animal brucellosis diagnosis.
Franco Ciuchini, Rosanna Adone, Paolo Pasquali, Cinzia Marianelli, MichelaTarantino, Ennio Bandino, Antonino Firinu, Manuele Liciardi, Stefano Lollai, Lorenzo Battistacci, Manuela Dalla Pozza
2005, ii, 47 p. Rapporti ISTISAN 05/21 (in Italian)

For the eradication of animal brucellosis, diagnosis is made on the basis of the detection of significant levels of specific antibody by using the Rose Bengal Plate (RBP) and Complement Fixation (CF) tests, used as screening and individual assay, respectively. Ideally, the results of serological tests should be related to the results of cultural examination but this information is often not available and these tests are compared with one another. In some cases, positive reactions cannot be attributed to antibodies arising from infection with Brucella organisms and sera from animals that are not infected give false positive reactions with serological tests. In addition, false negative reactions can also occur. Positive non specific reactions assume particular significance when the prevalence of brucellosis has fallen to a very low level where they may outnumber the cases of brucellosis. In this review, the Authors describe the causes of nonspecific reactions that are source of confusion in the serological diagnosis of brucellosis. The causes of the discordance between the surveillance tests RBP and CF are also discussed.
Key words: Brucellosis, Nonspecific reactions, Rose Bengal Plate Test, Complement Fixation Test

Si ringrazia Massimiliano Francia per il lavoro di collaborazione all'*editing* del rapporto.

Per informazioni su questo documento scrivere a: adone@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione*: Paola De Castro, Sara Modigliani* e *Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2005

INDICE

Introduzione ... 1

Specificità e sensibilità di un test siero-diagnostico ... 3
Dati sulla specificità e sensibilità delle reazioni SAR-Ag:RB e FdC-mi ... 4

Aspecificità delle reazioni SAR-Ag:RB e FdC-mi ... 6
Reazioni falsamente positive ... 6
Cross-reattività sierologiche ... 6
Cross-reattività tra brucellosi ed epididimite del montone ... 7
Uso di vaccinazioni improprie, non autorizzate ... 7
Contaminazione del siero in esame ... 8
Confusione nella identificazione dell'animale in fase di prelievo o scambio di provette ... 8
Presenza di anticorpi materni sia di origine vaccinale che infettiva ... 9
Prodotti del catabolismo anticorpale e anticorpi naturali ... 9
Inadeguata standardizzazione delle reazioni SAR-Ag:RB e FdC-mi ... 9
Inadeguata standardizzazione degli antigeni "unici" nazionali per SAR e FdC-mi ... 10
Errori tecnici ... 10
Casualità temporali ... 11
Reazioni falsamente negative ... 11
Scarsa produzione di anticorpi ... 11
Uso improprio del vaccino vivo B.abortus RB51 in fase R ... 11
Contaminazione del siero e/o eccesso di emolisi ... 11
Confusione nella identificazione dell'animale in fase di prelievo o scambio di provette ... 11
Inadeguata standardizzazione delle reazioni SAR-Ag:RB e FdC-mi ... 12
Inadeguata standardizzazione degli antigeni "unici" nazionali per SAR-Ag:RB e FdC-mi ... 12
Errori tecnici ... 12
Transitorietà o assenza di anticorpi nei sieri ... 12
False negatività riscontrabili nel periodo terminale del parto o aborto ... 12
Casualità temporali ... 13

Discordanze delle reazioni SAR-Ag:RB e FdC-mi ... 14
Mancata standardizzazione di una delle due reazioni ufficiali ... 14
Mancata standardizzazione di uno dei due antigeni "unici" nazionali ... 14
Errore tecnici ... 14
Lettura eccessivamente soggettiva ... 14
Uso improprio di vaccini particolari come 45/20, PBRev1 o PB19 (Pilet-Bonaux) ... 15
Presenza del fenomeno di pre-zona o fenomeno paradosso ... 15
Diagnosi poco tempestive, infezioni brucellari recenti o tardive o croniche ... 15
Diversa sensibilità e specificità delle due reazioni nel rilevare le soglie di positività ... 15

Strategia di studio di reazioni aspecifiche e discordanze ... 17
Indagini storiche ... 17
Nuove indagini ... 17
I fase: profili epidemiologici degli allevamenti "problema" ... 18
II fase: ripetibilità inter-IZS della diagnosi convenzionale ... 18
III fase: prove diagnostiche complementari ... 18
IV fase: indagini sul ruolo di reservoir dei selvatici e dei "bradi" ... 19
V fase: valutazione statistica del fenomeno ... 19

Diagnosi sierologica convenzionale ... 20
SAR:Ag-RB ... 20
FdC-mi ... 21

Diagnosi sierologica complementare ... 24
MRT ... 24
ELISA ... 25

Prove dell'immunità cellulo-mediata ... 26
Prova di intradermoreazione brucellare o prova allergica ... 26
Gamma-Interferon test ... 27

Diagnosi batteriologica ... 28
Ricerca batteriologica ... 28
Esame microscopico diretto ... 29
Passaggi di arricchimento *in vivo* ... 29
Isolamento colturale ... 30
Identificazione del genere ... 30
Identificazione della specie ... 30
Identificazione dei biotipi (biovarianti) ... 30
Identificazione dei ceppi vaccinali ... 31
B. abortus 19 ... 32
B. melitensis Rev1 ... 32
B. suis 2 ... 32
B. abortus RB51 ... 32

Diagnosi biomolecolare ... 33
Polymerase Chain Reaction ... 33
Standardizzazione ... 34
Protocolli ... 35
Protocollo per differenziare *Brucella* da *Yersinia* ... 36
Protocollo AMOS per identificazione *Brucella* ... 36

Sensibilità e specificità delle principali tecniche diagnostiche per la diagnosi di brucellosi ... 38

Bibliografia ... 40

INTRODUZIONE

In Italia, la sorveglianza siero-epidemiologica prevista dai piani di eradicazione della brucellosi negli allevamenti ovini e caprini (DM 2 luglio 1992 n. 453) e negli allevamenti bovini (DM 27 agosto 1994 n. 651) si avvale della reazione di SieroAgglutinazione Rapida con Antigene al Rosa Bengala (SAR-Ag:RB), come reazione di screening, e della reazione di Fissazione del Complemento miniaturizzata (FdC-mi) come reazione individuale atta a definire le positività in base alle unità fissanti il complemento per millilitro (≥20 UFC/mL), come previsto dalle relative direttive comunitarie (90/425, 91/496 e 97/12) in materia di brucellosi degli animali.

Ambedue le reazioni adottano antigeni "unici", a livello nazionale, standardizzati, controllati e certificati dall'Istituto Superiore di Sanità (Dipartimento Sanità Alimentare ed Animale) secondo il DM del 10 novembre 1992, seguendo tutte le indicazioni riportate nel manuale standard dell'*Office International des Epizooties* (OIE) per i test diagnostici e vaccini relativi alle rispettive brucellosi animali (OIE, 2004a, 2004b, 2004c, 2004d).

Attualmente l'antigene "unico" per la FdC-mi viene prodotto e distribuito dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, sede di Brescia, mentre l'antigene "unico" per la SAR-Ag:RB dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, sede di Teramo.

Un sistema di sorveglianza siero-epidemiologico efficiente è uno dei più importanti aspetti strategici che concorrono al successo di qualsiasi piano di eradicazione della brucellosi attraverso la disponibilità di diagnosi il più possibile specifiche, ripetibili e accurate.

Nella diagnosi sierologica di brucellosi, le reazioni aspecifiche sono quelle reazioni i cui risultati non trovano riscontro con l'effettiva presenza o assenza della malattia sia a livello epidemiologico che clinico o batteriologico (Alton *et al*., 1998; Nielsen & Ducan, 1990; Bricker, 2002a; Nielsen, 2002).

Le reazioni discordanti (SAR-Ag:RB positiva/FdC-mi negativa, o viceversa) sono invece reazioni che potrebbero, l'uno o l'altra, trovare riscontro con l'infezione brucellare.

Le reazioni sierodiagnostiche aspecifiche possono essere falsamente positive (spesso dette atipiche o brevemente FPSR: *False Positive Serological Reaction*) o falsamente negative. Queste ultime, quasi sempre in bassissima percentuale rispetto ai veri positivi, non modificano il quadro diagnostico complessivo di prima istanza dell'allevamento. I falsi negativi verrebbero poi rilevati con gli ulteriori accertamenti diagnostici periodici, necessari per la sorveglianza siero-epidemiologica degli allevamenti comunque qualificati. Una reazione falsamente negativa può rappresentare un importante fattore di rischio quando si introduce un soggetto falsamente negativo in un allevamento indenne (Marchevsky *et al.*, 1989).

È logico quindi che il vero problema resta legato alle reazioni falsamente positive, singole o in bassissima percentuale, rilevate in allevamenti qualificati indenni, che non permettono di formulare rapidamente una diagnosi certa, al fine di circoscrivere la malattia, e di limitare nel contempo le restrizioni nei confronti degli allevatori (Pouillot *et al.*, 1999; Godfroid *et al.*, 2002). Il fenomeno delle reazioni falsamente positive è stato subito osservato fin dalle prime diagnosi sierologiche, avvenute 100 anni or sono, utilizzando la sieroagglutinazione lenta. Ciò ha dato avvio ad una serie di modifiche volte a migliorare proprio la specificità del test di agglutinazione, proponendo antigeni particolari o un pre-trattamento dei sieri in esame con sostanze chelanti. Con il tempo anche per altre reazioni antigene-anticorpo è stato osservato lo stesso fenomeno, causando un vero problema quando i piani di eradicazione per le brucellosi riducevano a livelli minimi gli indici di infettività. Negli anni '90 il fenomeno delle reazioni

falsamente positive o atipiche, in Europa, è stato oggetto di approfondite ricerche, le cui acquisizioni sono state pubblicate da numerosi autori (Shoemer *et al*., 1990; Benet *et al*., 1991; Garin-Bastuji, 1993; Johnson *et al*., 1994; Garin-Bastuji & Dufour, 1995; Gerbier *et al*., 1997b; Pouillot *et al.*, 1998). Soprattutto in Francia e in Belgio il fenomeno è stato rilevato in numerosi allevamenti bovini sia in assenza di tutte le manifestazioni cliniche, come l'aborto, sia in assenza di tutti i fattori di rischio per la brucellosi, e con una prevalenza apparente negli allevamenti debolmente positivi. In tale contesto il fenomeno fu affrontato con indagini dirette alla conoscenza e alla precisa descrizione dello stesso, allo studio delle cause e alla messa a punto di procedure capaci di discriminare con certezza gli allevamenti in cui si manifestavano reazioni sierologiche falsamente positive, al fine di poter da una parte qualificare gli allevamenti indenni da brucellosi e dall'altra identificare i focolai di brucellosi clinica o latente. Le acquisizioni delle ricerche svolte furono presentate in un colloquio nazionale organizzato dal CNEVA (*Centre National d'Etudes Vétérinaire et Alimentaires d'Alfort*, Francia) nel 1995 sotto la direzione di Garin-Bastuji J.J. e Dufour B.

Le reazioni sierologiche aspecifiche rappresentano tutt'oggi un notevole ostacolo ai programmi di eradicazione delle brucellosi animali in molti Paesi europei. Anche in Italia sembra che abbiano creato e creino rilevanti problemi nell'ambito della sorveglianza siero-epidemiologica prevista dai piani di eradicazione (Nannini *et al*., 1992; Corrente *et al*., 1996 e 2004; Lillini *et al.*, 1998; Zanardi *et al.*, 2003; Ferroni, 2004).

Di fronte a questo evento, diffuso maggiormente nelle zone di scarsa prevalenza della brucellosi sia bovina che ovi-caprina, una diagnosi di certezza in un intervallo di tempo minimo deve essere una priorità, al fine di circoscrivere rapidamente il focolaio e di limitare le restrizioni nei confronti degli allevatori, che verrebbero screditati ingiustamente. Le restrizioni riguardano in particolare la movimentazione degli animali e la sospensione della qualifica di allevamento ufficialmente indenne, con tutte le relative conseguenze.

In uno studio di epidemiologia comparata (Pouillot *et al*., 1997) si sostiene che in un allevamento le reazioni aspecifiche falsamente positive sono sporadiche. Tali reazioni aspecifiche includono solo 1 o 2 animali nell'80% circa dei casi, e meno di 5 nel 97% dei casi. Gli allevamenti con più di 2 animali falsamente positivi sono in genere grossi allevamenti. Pertanto un numero di animali sieropositivi maggiore di 2 deve far pensare ad una brucellosi quando si tratta di allevamenti con più di 50 animali saggiati. In quelli con più di 50 animali saggiati, la prevalenza intra-allevamento resta tuttavia inferiore al 5% nel 91% dei casi e al 10% nel 99% dei casi.

Negli allevamenti con reazioni falsamente positive bisognerebbe affrontare il problema con studi epidemiologici mirati e avvalersi di altri metodi diagnostici complementari o di nuova concezione, oppure di una combinazioni di questi al fine di poter identificare altri fattori di rischio come l'età degli animali, la specie, le condizioni e le dimensioni dell'allevamento e l'effetto stagionale. In proposito è da ricordare che lo scopo di un programma di eradicazione non è una "sieropositività pari a zero" ma l'assenza d'infezione, anche in presenza di casi di sieropositività di basso livello o aspecifiche (Ferroni, 2004).

Prima di definire le cause delle reazioni aspecifiche, falsamente positive o falsamente negative, è opportuno richiamare il significato di *sensibilità* e *specificità* di una reazione diagnostica o test diagnostico, cioè della capacità di riconoscere tutti, e soltanto, i soggetti destinati a sviluppare la malattia.

Sono questi, infatti, i principali parametri che si utilizzano nella convalida di un test sierologico o più in generale di un test diagnostico e che quindi è opportuno portare a conoscenza come premessa della rassegna sul fenomeno delle aspecificità e delle discordanze nel campo della diagnosi sierologica per brucellosi.

La presente rassegna ha lo scopo di analizzare tutte le possibili cause delle reazioni aspecifiche e delle discordanze, offrendo nel contempo una strategia di intervento sul campo.

SPECIFICITÀ E SENSIBILITÀ DI UN TEST SIERO-DIAGNOSTICO

È noto che specificità e sensibilità, accanto ad altri importanti parametri quali l'accuratezza e la precisione, sono i parametri che nel loro insieme permettono la convalida di un test utilizzato ai fini diagnostici, e quindi la sua *performance*.

Nell'ambito di questa rassegna sul fenomeno delle aspecificità è sufficiente tuttavia conoscere il significato solamente della specificità e sensibilità che sono i parametri tra loro correlati per capire il fenomeno e tutta la problematica connessa.

La *specificità* di un test diagnostico è la capacità di individuare unicamente gli animali non infetti ed è rappresentata come probabilità di identificare gli animali sani da un punto di vista clinico, con un risultato sierologico negativo: in altre parole, nel nostro caso è la capacità di *identificare correttamente i veri siero-negativi evitando i falsi siero-positivi*.

La *sensibilità* di un test diagnostico è, al contrario, la capacità di individuare unicamente gli animali infetti ed è rappresentata come probabilità di identificare gli animali infetti con un risultato sierologico positivo: in altre parole è la capacità di *identificare correttamente tutti i veri positivi evitando i falsi negativi*.

In generale si può affermare che non esiste test diagnostico che abbia una sensibilità capace di svelare il 100% degli animali infetti e nello stesso tempo una specificità capace di riconoscere correttamente il 100% degli animali sani.

Di solito una percentuale intorno al 99%, di ambedue gli aspetti, è considerata di altissimo significato statistico. È noto che all'aumento della sensibilità diminuisce la specificità e viceversa: privilegiare l'una o l'altra dipende dalla funzione del test.

Per un test di massa o screening va privilegiata la sensibilità, per un test di conferma individuale la specificità: l'ideale resta un test diagnostico i cui parametri di sensibilità e specificità si avvicinino ad un perfetto livello di concordanza con la malattia.

La reazione di fissazione del complemento è considerata il test sierodiagnostico per la brucellosi più affidabile proprio perché sensibilità e specificità si avvicinano dello stesso livello nel rilevare la presenza di anticorpi specifici, con una concordanza intorno al 99% rispetto all'isolamento batterico da animali infetti sperimentalmente.

L'*accuratezza* di un test diagnostico è la capacità di misurare correttamente il valore, nel nostro caso di anticorpi anti-brucella nel siero, nel corso di ripetute prove nel tempo in riferimento ad uno standard adottato da centri nazionali e/o internazionali di referenza.

La *precisione* di un test diagnostico è la capacità di riprodurre in modo costante e prevedibile un certo risultato quando il siero da analizzare viene prelevato dallo stesso campione.

Accuratezza e precisione spesso vengono confusi in quanto le definizioni stesse sono al limite: infatti mentre l'accuratezza si riferisce ad una ripetibilità del risultato rispetto ad uno standard, la precisione invece si riferisce ad una ripetibilità rispetto allo stesso campione.

Anche statisticamente assumono significati diversi: l'obiettivo dell'accuratezza può essere ritenuto l'errore sistematico accettabile mentre l'obiettivo della precisione può essere definito come una deviazione standard accettabile.

Acquisire una conoscenza fondamentale sui parametri di convalida di un test diagnostico accresce le capacità diagnostiche di un veterinario permettendogli di interpretare più correttamente i risultati di un test diagnostico, con particolare riferimento a quelli di tipo sierologico, e quindi anche del fenomeno delle aspecificità strettamente connesso.

Non si potevano quindi tralasciare tali conoscenze nell'ambito di un progetto il cui primo obiettivo resta lo studio del fenomeno delle aspecificità e delle discordanze di due reazioni

siero-diagnostiche classiche su cui sono basati tutti i sistemi di sorveglianza sierologica degli allevamenti bovini, bufalini, ovini e caprini, previsti dagli specifici piani di eradicazione per la brucellosi animali, sia a livello nazionaleeì che internazionale.

Le reazioni di Sieroagglutinazione Rapida con Antigene al Rosa Bengala (SAR-Ag:RB) (o RBPT, *Rose Bengal Plate Test*) e la reazione di fissazione del complemento (FdC-mi) (o CF, *Complement Fixation*) sono state oggetto di convalida e standardizzazione a livello nazionale e comunitario proprio tenendo presente i parametri descritti.

Dati sulla specificità e sensibilità delle reazioni SAR-Ag:RB e FdC-mi

Numerosi sono gli autori che si sono cimentati nella valutazione della specificità e sensibilità delle reazioni sierodiagnostiche, in minor numero sono invece coloro che ne hanno analizzato le cause e consigliato appropriate soluzioni (Nannini *et al.*, 1992; Garin-Bastuji & Dufour, 1995; Pouillot *et al.*, 1999; Nielsen, 2002).

Per quanto riguarda la reazione SAR-Ag:RB e la FdC-mi, utilizzate ufficialmente nel nostro Paese per la sorveglianza siero-epidemiologica nei piani di eradicazione delle brucellosi animali, Garin-Bastuji (1995) riporta una sensibilità per SAR-Ag:RB su bovini naturalmente infetti, positivi all'esame batteriologico, del 74,9%-91,8% e una sensibilità per FdC-mi, sugli stessi animali, del 79,0-98,2%. Su bovini sperimentalmente infetti, lo stesso autore riporta una sensibilità del 77,8% per SAR-Ag:RB e del 81,5% per FdC-mi.

La differente valutazione della sensibilità e specificità effettuata su animali infetti naturalmente e animali infetti sperimentalmente sottolinea le difficoltà di questo genere di stima che trova nella sperimentazione valori minori di quelli in campo, nonostante la rigorosità, appunto, sperimentale.

Per quanto riguarda la specificità, la valutazione è stata fatta rispetto ad allevamenti bovini indenni, sia per SAR-Ag:RB che per FdC-mi, e ha raggiunto per ambedue indici del 100%.

Negli ovini naturalmente infetti e positivi all'esame colturale, la sensibilità della SAR-Ag:RB è stata del 96,5-100% e della FdC-mi del 94,8-100%, mentre la specificità è stata del 100% per entrambe le reazioni in allevamenti indenni.

L'insieme delle informazioni ottenuto con studi sperimentali o di campo è attualmente considerato sufficiente per poter valutare i test sierologici proposti per la diagnosi della brucellosi.

Gli ultimi dati di valutazione della sensibilità, specificità e indice di *performance*, relativi alla SAR-Ag:RB sono stati riportati da Nielsen (2002), con le rispettive fonti bibliografiche come riportato in Tabella 1.

Tabella 1. Fonti bibliografiche della sensibilità e della specificità

Test	Sensibilità*	Specificità*	Indice *performance*[#]	Riferimenti bibliografici
RBPT	21,0-98,3	68,8-100	121,0-193,9	Van Aert *et al.*,1984 Samartino *et al.*, 1999
CF	23,0-97,1	30,6-100	123,0-197,5	Huber & Nicoletti, 1986 Van Aert *et al.*, 1984 Saravi *et al.*, 1995

* Valutazioni presentate come range percentuale tra il peggiore e il migliore risultato recepito dalla letteratura citata. I valori più bassi sono quelli calcolati in raffronto con altri test sierologici, mentre quelli più alti sono quelli ottenuti con sieri di bovini positivi all'esame colturale, o infettati sperimentalmente.

[#] Dato dalla somma delle percentuali di sensibilità e specificità.

Per la FdC-mi effettuata con un particolare antigene omologo, privato del potere anticomplementare, per il rilievo della risposta anticorpale in soggetti trattati in campo con il vaccino vivo RB51, rugoso (R), è stata ottenuta (Adone *et al.*, 2001a), a 3 settimane dalla vaccinazione, una sensibilità della tecnica del 97% a fronte di una specificità del 100%.

La sensibilità e la specificità delle reazioni siero-diagnostiche (SAR-Ag:RB e FdC-mi) possono influire sul successo di qualsiasi programma di eradicazione della brucellosi: infatti la scarsa specificità di reazione determina l'eliminazione di una certa percentuale di animali sani, mentre una scarsa sensibilità determina il mantenimento nell'allevamento di una certa percentuale di animali infetti.

Sono eventi tuttavia di bassa incidenza, in quanto il giudizio diagnostico viene espresso sulla base della complementarietà delle due reazioni e, nel caso di valori discordanti, un giudizio dubbio impone una ripetizione delle reazioni dopo un breve intervallo, al fine di elevare il livello di certezza diagnostica.

In merito alla SAR-Ag:RB e alla FdC-mi, previste dai piani nazionali di eradicazione nei bovini, ovini, caprini e bufalini, le cause che possono determinare risposte aspecifiche sono diverse, a seconda che trattasi di risultati falsamente positivi e/o falsamente negativi.

In letteratura, come cause di aspecificità siero-diagnostiche si fa riferimento quasi esclusivamente alle cross-reattività sierologiche dovute a microrganismi che presentano affinità antigeniche, con particolare riguardo a *Yersinia enterocolitica* O9. Questo perché si reputa scontato che le reazioni diagnostiche abbiano un alto livello di standardizzazione, costante nel tempo, con un indice di accuratezza assoluto (100%) del tutto irrealizzabile.

Nella pratica diagnostica basata sulla sierologia nulla si può dare per scontato e di assoluto, per cui tali cause possono dipendere dai limiti intrinseci di accuratezza dei metodi diagnostici, dalla variabilità biologica legata alla specie animale e da fattori di natura umana.

Lo stesso discorso si può affermare in generale per le discordanze, anche se le effettive cause sono legate, in maggior misura, ai limiti intrinseci dei due metodi diagnostici presi in considerazione basati sul rilievo degli anticorpi serici. Non a caso spesso si dice: "la diagnosi di una malattia mediante il rilievo degli anticorpi specifici è paragonabile alla ricerca di un uomo attraverso la sua ombra. E osservare le ombre non garantisce certezza".

La rassegna di tutte le probabili cause delle aspecificità e discordanze legate alle reazioni convenzionali previste dai piani nazionali di eradicazione delle brucellosi animali (SAR-Ag:RB e FdC-mi) rappresenta l'ideale supporto di studio per elaborare una strategia di ricerca per la "Valutazione della specificità delle sieropositività riscontrate nei ruminanti in regioni ufficialmente indenni da brucellosi attraverso la ricerca diretta di differenti determinanti antigenici mediante metodiche biotecnologiche", oggetto di un progetto di ricerca corrente a cui aderiscono tutti gli istituti rappresentati dagli autori della presente rassegna.

Responsabile scientifico del progetto (IZS SA 006/02) è il Dott. Ennio Bandino dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) della Sardegna "G.Pegreffi", Sassari.

Nell'ambito della razionale del progetto emerge chiaramente la necessità di applicare procedure diagnostiche che consentano di discriminare reazioni aspecifiche dai casi in cui l'infezione è realmente presente.

ASPECIFICITÀ DELLE REAZIONI SAR-Ag:RB E FDC-mi

Reazioni falsamente positive

Le reazioni sierologiche SAR-Ag:RB e FdC-mi falsamente positive possono essere dovute alle seguenti cause.

Cross-reattività sierologiche

Sono queste le principali cause di reazioni falsamente positive, sia in bovini che ovi-caprini, dovute a correlazioni antigeniche tra brucelle in fase S e altri microrganismi Gram negativi come *Yersinia enterocolitica* O9, *Salmonella* del gruppo N(O30) di Kaufmann-White, *Escherichia coli* O116 e O157.H7, *Escherichia hermannii*, *Campylobacter jejuni*, *Francisella tularensis*, *Pateurella multocida*, *Pseudomonas maltophila, Vibrio cholerae* O1*, Erlichia canis*, *Afipia clevelandensis*, *Leptospirosi hardjo, Stenotrophomonis maltophila, Leishmania,* (Corbel *et al.*, 1975; Stuart & Corbel, 1982; Corbel *et al.,* 1984; Corbel, 1985; Alton, 1988; Mac Millan, 1990; Reynaud *et al.*,1993; Johnson *et al.,* 1994; Farina & Scatozza, 1995; Corrente *et al.,* 1996; Drancourt *et al., 1996;* Lillini *et al.,* 1998*;* Garin-Bastuji *et al.,* 1999*;* Gourdon *et al.,* 2000*;* Staak *et al.,* 2000; Emmerzaal *et al*., 2002; Nielsen *et al.,* 2004b, Muñoz *et al.,* 2005; Kohanteb & Ardehali, 2005).

Cross-reattività dello stesso tipo si possono avere con altri batteri non patogeni per l'uomo e animali, appartenenti ai generi *Agrobacterium, Sinorhizobium e Ochrobactrum* del gruppo alpha-proteobacteria (Delpino *et al.,* 2004).

Yersinia enterocolitica O9 è il microrganismo che presenta maggiore affinità antigenica con le brucelle, avendo in comune la catena O dell'LPS e ingenerando quindi notevoli confusioni, in quanto la risposta anticorpale è persistente (a volte oltre 6 mesi) con alti titoli spesso sovrapponibili a quelli antibrucellari. *Y.enterocolitica* O9 evoca principalmente anticorpi della classe IgM ma può produrre anche IgG. Sieri monospecifici anti A *Brucella* cross-agglutinano fortemente *Y.enterocolitica* O9 mentre sembra che non reagiscono i sieri specifici anti M *Brucella* (Mac Millan, 1990). Nessun test sierologico attualmente disponibile permette di distinguere in modo certo una reazione sierologica falsamente positiva dovuta a *Y. enterocolitica* O9 da una reazione sierologica legata a vera infezione brucellare. Le procedure usuali per la differenziazione sierologica sono fondate principalmente sulla rapida sieronegativizzazione anche dei titoli elevati (Kittelberger *et al*., 1995b; Pouillot *et al*., 1999).

Nella pratica possono verificarsi anche infezioni associate, che ovviamente vanno a sommare i titoli anticorpali: solo prove sierologiche del tipo western-blotting effettuate con antigeni specifici per *Yersinia*, come le YOPs (Kittelberger *et al*., 1995a, 1995b) oppure per *Brucella* come OMP (55kDa) (Cloeckaert *et al*., 1992; Baldi *et al*., 1996; Correnti *et al*., 1996 e 2004), possono discriminare relativamente le due risposte.

Per una diagnosi sierologica differenziale è stata anche utilizzata l'ELISA, indiretta o competitiva, allestita con YOPs o altri antigeni: di membrana, ricombinanti, solubili (Weynants *et al*., 1996; Erdenebaatar *et al*., 2003) oppure utilizzando la prova del γ-IFN su sangue (Weynants *et al*., 1995, Kittelberger *et al*., 1997; Adone *et al*., 2000; Muñoz *et al.,* 2005).

Per gli altri microrganismi, le cross-reattività si esprimono con titoli molto più bassi, rispetto all'antigene omologo, che quasi sempre decadono molto più rapidamente, di solito entro 1 mese gli anticorpi agglutinanti per *E.coli* O157.

In generale per questi microrganismi una diagnosi differenziale si basa sull'uso di test complementari più sensibili e specifici delle due prove convenzionali, come l'ELISA (Nielsen & Gall, 1994; Erdenebaatar *et al*., 2003), l'ELISA competitiva (Nielsen *et al.,*1995; Silva *et al.,*2000), Western-blotting (Kittelberger *et al*., 1998; Corrente *et al*., 2004), oppure test da applicare sul latte, come il milk ring test o in vivo come la prova allergica (Skin test) (Pouillot *et al*., 1997; Saegerman *et al*.,1999) affiancati da prove di isolamento batterico.

Recentemente sono state utilizzate, in alternativa, prove di immunità cellulo-mediata, come il γ-IFN test (Kittelberger *et al*., 1997; Adone *et al*., 2000), o prove altamente sensibili come FPA (Fluorescence polarization assay), (Gall *et al*., 2000; Nielsen *et al.*,2000; Nielsen & Gall, 2001, McGiven *et al*., 2003 Nielsen *et al*., 2004a).

Tali prove, che tracciano profili immunologici di allevamento più che individuali, dovrebbero essere affiancate comunque dall'isolamenro e l'identificazione dell'agente etiologico, oppure da tecniche di rilevamento biomolecolare (PCR o real-time multiplex PCR) del microrganismo da sangue, siero, latte e/o reperti anatomo-patologici (Bricker & Halling 1994, 1995; Gallien *et al.,* 1998; Adone *et al.,* 2001b; Bricker, 2002, Bricker *et al*., 2003; Lubeck *et al*., 2003; Elfaki *et al*., 2004; Probert *et al*., 2004).

Una diagnosi differenziale possibile è basata su di una combinazione di prove che implicano meccanismi diversi della risposta umorale o cellulo-mediata, oppure una diagnosi basata sulla ripetitività dei prelievi nel tempo.

Sarebbe importante anche avvalersi di una chiave di lettura diagnostica che tenga in considerazione studi epidemiologici *ad hoc* collegati all'età dell'animale, alle dimensioni dell'allevamento all'effetto stagionale.

È noto infatti che nella stagione primaverile più favorevole alla yersiniosi, risultati falsi-positivi per cross-reazione con tale microrganismi possono essere più frequenti

Cross-reattività tra brucellosi ed epididimite del montone

Si verificano nel corso di allestimento di prove sierologiche convenzionali e di prove allergiche di ovini infetti contemporaneamente da *B.melitensis* e *B.ovis* (Alton, 1990).

Sembra che si possano presentare cross-reazioni tra animali vaccinati con *Brucella melitensis* Rev 1 e *Brucella ovis* in prove allergiche o al test di gel diffusione, poiché gli antigeni in fase S o R possono avere degli epitopi in comune; inoltre l'uso di vaccini che contengono un elevato numero di cellule microbiche dissociate può determinare significative cross-reazioni (Blasco *et al*., 1990). Poiché ovini vaccinati con Rev 1 possono reagire con *B.ovis* e *B.abortus* RB51, si possono verificare falsi positivi per la presenza di anticorpi di origine vaccinale anche in reazioni di FdC-mi ed ELISA competitiva, allestite con antigeni di *B.ovis* (Cerri *et al*., 2000; Bianchifiori *et al*., 2000; Adone & Ciuchini, 2001).

Uso di vaccinazioni improprie, non autorizzate

L'uso improprio di vaccinazioni va annoverato come causa di reazioni falsamente positive perché determina una reattività specifica non contemplata dai piani di eradicazione, i quali prevedono l'eliminazione di qualsiasi animale sierologicamente positivo, ma nel contempo proibiscono l'uso di vaccini antibrucellari a qualsiasi età dell'animale.

L'uso improprio di vaccini è un evento di difficile controllo, che sfugge ad ogni indagine epidemiologica. Tuttavia è possibile rilevare l'eventuale utilizzazione di vaccini convenzionali vivi Buck 19 e Rev 1, per la profilassi della brucellosi, attraverso il rilievo e la quantificazione delle diverse classi di immunoglobuline indotte.

È noto infatti che nel corso dell'evoluzione della malattia, a seguito di infezione naturale o sperimentale, le prime immunoglobuline (Ig) a comparire sono le IgM, che caratterizzano un'infezione recente, ma ben presto predominano le IgG, che caratterizzano la cronicità delle infezioni. In questa fase le IgG sono rappresentate in maggior quantità dalle IgG1 e in piccola parte dalle IgG2, mentre il tasso delle IgM si abbassa.

Nelle vaccinazioni con ceppo B19 in fase S, si producono invece precocemente le IgM che persistono a lungo, mentre le IgG, specie le IgG1, che si manifestano più o meno nello stesso tempo, scompaiono alquanto prima delle IgM. Ciò si verifica in particolare quando si vaccinano gli animali dopo i 7 mesi di età.

La SAR-Ag:RB svela maggiormente le IgM rispetto alle IgG1 e alle IgG2; per tale motivo può dar luogo a false positività legate all'abuso del vaccino. Possiede anche il pregio di svelare molto bene le IgG1 e quindi gli animali con infezione cronica.

La FdC-mi mette in evidenza sia le IgM che le IgG1 e le IgG2, ma soprattutto le IgG1, per questa ragione svela molto bene le infezioni croniche e riesce, entro certi limiti, a differenziare gli animali infetti da quelli vaccinati (Farina e Scatozza, 1998).

Ciò vale anche per il Rev1 negli ovini, in quanto gli anticorpi devianti evocati (IgG1) mostrano un più rapido declino, tanto che non sono più titolabili nell'85-90% dei casi dopo 6-8 mesi dalla vaccinazione, ed entro un anno tutti gli animali risultano FdC-mi negativi, sempre che siano stati vaccinati tra 3-6 mesi di età.

L'uso contemporaneo di più test basati su principi diversi (agglutinanti, o fissanti il complemento, o immunoenzimatici) permette di migliorare qualsiasi diagnosi sierologica e nello stesso tempo di migliorare la possibilità di distinguere una risposta sierologica di origine vaccinale da quella di origine infettante: a questo scopo si possono utilizzare tecniche come la ELISA competitiva (Nielsen *et al*., 1989; Bianchifiori *et al*., 2000), test di Coombs (Ciuchini *et al*., 2002), l'analisi con la prova della fluorescenza polarizzata (Nilsen & Gall, 2001), gamma-interferon test (Duran-Ferrer *et al*., 2004).

L'analisi delle immunoglobuline tuttavia, può ingenerare solo un sospetto e non una certezza. Meglio sarebbe isolare l'eventuale ceppo vaccinale e identificarlo in modo specifico mediante PCR, una reazione che può differenziare con rapidità e certezza i ceppi vaccinali eventualmente ritrovati nei linfonodi o nella milza o anche nel sangue e nel latte nei primi periodi della vaccinazione, consentendo di svelare l'uso improprio o non consentito di vaccini in fase S (Bricker & Halling, 1995; Adone *et al.,* 2001b).

Contaminazione del siero in esame

Una qualsiasi pratica inadeguata del prelievo o della conservazione del siero in esame può determinare un risultato falsamente positivo. Ad esempio un'eccessiva presenza di chilo può alterare la reazione SAR-Ag;RB, mentre un'eccessiva emolisi può influenzare la FdC-mi, oppure una contaminazione microbica (Nannini *et al.,*1992).

Confusione nella identificazione dell'animale in fase di prelievo o scambio di provette

Sono evenienze poco probabili che possono pur tuttavia verificarsi qualora non venissero rispettate tutte le modalità di prelievo e identificazione del campione, le modalità di invio dei campioni di sangue in laboratorio e le modalità di accettazione e registrazione.

Per non fare confusione di sorta, basta seguire le relative procedure ordinarie standard, previste da ogni sistema di qualità in materia di campionamento per quanto attiene le sierodiagnosi ufficiali per brucellosi (Nannini *et al*.,1992).

Presenza di anticorpi materni sia di origine vaccinale che infettiva

È questa una circostanza prevista anche dai piani di eradicazione che impongono l'eliminazione dei giovanissimi soggetti con un titolo anticorpale passivo, indotto cioè con anticorpi specifici anti-brucella di origine materna.

Tale circostanza si verifica attraverso il colostro che veicola immunoglobuline di tipo IgG, IgM e IgA, che trasferitesi nel siero possono determinare reazioni di certo specifiche, da considerarsi tuttavia falsamente positive, perché non esprimono infezione o stimoli vaccinali attivi di origine brucellare nell'animale.

Questo genere di false positività impropriamente dette sono rivelabili sia con la SAR-Ag:RB che con la FdC-mi, in maniera quantitativamente variabile a seconda dei titoli anticorpali delle fattrici, dei titoli anticorpali nel colostro, della quantità di colostro assunto dal vitello e delle modalità e tempi di assunzione del colostro (Poli e Cocilovo, 1996).

Prodotti del catabolismo anticorpale e anticorpi naturali

Sebbene la natura di tali prodotti non sia ben conosciuta, pur tuttavia sembra che alcuni prodotti del catabolismo delle immunoglobuline possano ancora reagire con antigeni specifici, determinando delle positività che non sono indice di un'infezione in evoluzione, ma in decadimento (Poli e Cocilovo, 1996).

Anche gli anticorpi naturali per i quali non si conosce affatto l'origine dello stimolo antigenico possono determinare reazioni positive al limite, da considerare ovviamente aspecifiche. Ambedue i fenomeni sembrerebbero verificarsi sovente nelle specie bovina, suina ed equina (Mac Millan, 1990)

Inadeguata standardizzazione delle reazioni SAR-Ag:RB e FdC-mi

La 1ª standardizzazione delle due reazioni è stata effettuata nel 1991 mediante uno studio collaborativo multicentrico, a cui hanno partecipato le "Unità sierologiche per la diagnosi della brucellosi" delle sedi centrali dei 10 II.ZZ.SS. del nostro Paese (Ciuchini F. e Farina R., 1991).

Lo studio è stato promosso dalla Direzione Generale dei Servizi Veterinari del Ministero della Sanità, sotto l'egida del Consiglio Superiore di Sanità.

Il processo di standardizzazione è avvenuto in riferimento al "2nd International Standard for anti-*Brucella abortus* Serum (2nd ISaBS) bovine", contenente 1000 UA/mL (unità agglutinanti) e 1000 USC/mL (unità sensibilizzanti il complemento), preparato e caratterizzato da "Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, Surrey,UK ". Dal 1° giugno 1998 viene distribuito dal "National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)", Potters Bar, UK, all'Istituto Superiore di Sanità, deputato al controllo centrale ufficiale degli antigeni secondo le direttive comunitarie (90/425/CEE; 91/496/CEE; 97/12/CEE).

Le risultanze della standardizzazione hanno permesso l'elaborazione di 2 metodi standard (SAR-Ag:RB e FdC-mi), normati negli allegati dei piani di eradicazione delle brucellosi ovi-caprina e bovina. I metodi sono stati monitorati nel 1997 e hanno dimostrato di mantenere un significativo livello di standardizzazione (Ciuchini *et al*., 1997).

Un inadeguato livello di standardizzazione dei metodi può determinare reazioni falsamente positive per la non conformità dei controlli di reazione:

- per la FdC-mi, meno di 2 unità di complemento, concentrazione in difetto di antigene, attività anticomplementare dell'antigene, attività anticomplementare del siero, controllo della soglia di positività >20 USC/mL, insufficiente sensibilizzazione del sistema emolitico, scarso titolo del siero nazionale di riferimento o del siero di lavoro giornaliero, lettura ad "occhio metrico" generosa non effettuata per raffronto con il pozzetto delle 20 USC/mL;
- per la SAR-Ag:RB, antigene sfasato, titolo in difetto dell'antigene, lettura tardiva.

L'inadeguatezza di una standardizzazione viene rivelata con processi di revisione delle analisi o idonei ring test effettuati dal Centro di referenza per la brucellosi presso l'IZS di Teramo: quest'ultimo processo deve essere effettuato in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità secondo il comma c, punto 1, art. 2, Decreto 4/10/1999.

Di recente, il Centro di referenza ha elaborato un modello di studio interlaboratorio delle due reazioni adottate in Italia (Nannini *et al.,* 2004).

Inadeguata standardizzazione degli antigeni "unici" nazionali per SAR e FdC-mi

È noto che, a parità di metodo della SAR-Ag:RB e/o della FdC-mi, preparazioni antigeniche diverse a partire dallo stesso ceppo di brucella, che privilegino epitopi diversi, possono condurre a risultati diversi; è altresì noto che non è sempre facile ottenere elevate quantità di antigene le cui caratteristiche siano costanti nel tempo (Alton *et al*., 1988; Nielsen *et al*., 1998). In Italia, la standardizzazione delle due tecniche diagnostiche ha imposto anche una standardizzazione e controllo degli antigeni "unici" nazionali, da effettuarsi su ogni serie di produzione in base al decreto ministeriale 10 nov. 1992, e la cui utilizzazione viene sorvegliata in campo dall'Istituto Superiore di Sanità (Ciuchini & Adone, 1997).

Inadeguati processi di standardizzazione e controllo degli antigeni possono determinare reazione falsamente positive qualora fossero concentrati in difetto rispetto al 2nd SIaBS di Weybridge, verso il quale l'Ag:RB per la SAR dovrebbe reagire fino alla diluizione di 1:47,5, mentre l'Ag per FdC-mi dovrebbe reagire alla diluizione di 1:200 con 2+, cioè con un 50% di emolisi.

Errori tecnici

Sono dovuti alle manualità operative delle reazioni o più precisamente alle manualità previste dai vari passaggi operativi, che vanno dal prelievo all'analisi e alla trasmissione dei dati, soprattutto quando si tratta di operare su un numero notevole di animali.

Casualità temporali

Le casualità sono dovute alla non perfetta e assoluta sensibilità e specificità dei test e la probabilità è data dal rapporto casi favorevoli o attendibili e casi possibili.

Anche nelle mani più esperte è inevitabile che un test sierodiagnostico possa dare risultati falsamente positivi legati al caso, proprio perché non esiste alcun test che abbia un livello di sensibilità del 100% a fronte di una specificità dello stesso livello.

Sono casi molto rari e difficilmente gestibili dall'uomo, tuttavia la ripetibilità del test sullo stesso campione, o su di un campione prelevato in tempi ravvicinati sullo stesso soggetto "problema", risolve l'evenienza.

Reazioni falsamente negative

Le reazioni sierologiche SAR-Ag:RB e FdC-mi falsamente negative possono invece essere dovute alle seguenti cause.

Scarsa produzione di anticorpi

Un'evenienza legata soprattutto all'animale in relazione all'età, al parto, all'estro e ai caratteri genetici, oppure a seguito di terapie immunodepressive (cortisonici, o antibiotici, ecc.), o vaccini, poco prima del prelievo del sangue per la sierodiagnosi, che possono abbassare i titoli anticorpali specifici anche in maniera significativa.

Uso improprio del vaccino vivo *B.abortus* RB51 in fase R

Più che una causa di reazione sierologica falsamente negativa, nell'ambito di una sorveglianza siero-epidemiologica prevista dai piani di eradicazione che impone l'eliminazione di soggetti sierologicamente positivi, l'uso improprio del vaccino RB51 in fase R, che non produce anticorpi verso antigeni SAR e FdC-mi in fase S, sfugge in senso negativo gli obiettivi della sorveglianza, che invece si propone anche di rilevare eventuali usi impropri dei vaccini convenzionali in fase S, sia nei bovini che negli ovi-caprini (Schurig *et al*., 1991; Stevens *et al.,* 1995; Adone & Ciuchini, 1999, 2001a). Tuttavia è possibile rilevare anticorpi specifici anti-R per individuare soggetti vaccinati con RB51 mediante reazioni ELISA o Dot-ELISA allestite con antigene omologo (Olsen *et al.,* 1997, Edmonds *et al.,* 1999). In Italia, si utilizza la FdC-mi allestita con antigene omologo neutralizzato per il forte potere anti-complementare, tipico degli antigeni preparati con microrganismi in fase rugosa (Adone & Ciuchini, 1999; 2001a; Adone *et al.*, 2001c; 2004).

Contaminazione del siero e/o eccesso di emolisi

Una contaminazione del siero e/o un eccesso del fenomeno emolitico a seguito di inadeguato prelievo o inadeguata conservazione possono alterare una lettura tipicamente ad "occhio metrico" e stimare una falsa negatività delle reazione SAR e/o FdC-mi.

Confusione nella identificazione dell'animale in fase di prelievo o scambio di provette

Come già detto, sono evenienze poco probabili, ma che tuttavia possono verificarsi qualora non venissero rispettate tutte le modalità di prelievo e identificazione del campione, le modalità di invio dei campioni di sangue in laboratorio e le modalità di accettazione e registrazione: evenienze che possono incidere sulle reazioni falsamente negative nella stessa misura di quanto detto per le reazioni falsamente positive.

Per non fare confusione di sorta basta seguire le relative procedure ordinarie standard, previste da ogni sistema di qualità in materia di campionamento per quanto attiene le sierodiagnosi ufficiali per brucellosi.

Inadeguata standardizzazione delle reazioni SAR-Ag:RB e FdC-mi

Un inadeguato livello di standardizzazione dei metodi può determinare reazioni falsamente negative per la non conformità dei controlli di reazione: per la FdC-mi, eccesso di complemento, eccesso di antigene, controllo della soglia di positività ≥20 USC/mL effettive, eccesso titolo del siero nazionale di riferimento o del siero di lavoro giornaliero, lettura ad "occhio metrico" generosa non effettuata per raffronto con il pozzetto delle 20 USC/mL; per la SAR-Ag:RB, concentrazione in eccesso dell'antigene, lettura tardiva. Anche l'inadeguatezza di una standardizzazione come causa di falsi-negativi viene rivelata con processi di revisione delle analisi o idonei ring test effettuati dal Centro di referenza per la brucellosi presso l'IZS di Teramo, in collaborazione, come sempre, con l'Istituto Superiore di Sanità secondo il comma c, punto 1, art. 2, Decreto 4/10/1999.

Inadeguata standardizzazione degli antigeni "unici" nazionali per SAR-Ag:RB e FdC-mi

Inadeguati processi di standardizzazione e controllo degli antigeni possono determinare reazioni falsamente negative qualora gli antigeni fossero concentrati in eccesso rispetto al 2nd SIaBS di Weybridge (UK), verso il quale l'Ag:RB per la SAR dovrebbe reagire fino alla diluizione di 1:47,5, mentre l'Ag per FdC-mi dovrebbe reagire alla diluizione di 1:200 con 2+, cioè con un 50% di emolisi.

Errori tecnici

Come già detto, sono dovuti alle manualità operative delle reazioni o più precisamente alle manualità previste dai vari passaggi operativi, che vanno dal prelievo all'analisi e alla trasmissione dei dati, soprattutto quando si tratta di operare su un numero notevole di animali. Questi errori possono determinare indifferentemente, e in ugual misura, reazioni falsamente positive o falsamente negative, e possono essere evitati solo operando secondo quanto previsto dai sistemi di qualità.

Transitorietà o assenza di anticorpi nei sieri

Non sempre nei giovani animali figli di madri infette è possibile rivelare tassi anticorpali al di sopra delle soglie di positività, tuttavia il regolamento ne prevede l'eliminazione anche se sierologicamente negativi e il divieto di utilizzarli per le rimonte o di introdurli in allevamenti ufficialmente indenni.

Sotto questo aspetto sono stati arbitrariamente considerati falsamente negativi.

False negatività riscontrabili nel periodo terminale del parto o aborto

Più che una causa è una evenienza che si può verificare in corrispondenza del parto o di aborti sia nei bovini che negli ovi-caprini naturalmente infetti. È stato infatti notato, nella

pratica, che appena dopo il parto o l'aborto, in un soggetto infetto, spesso si verifica una caduta repentina del titolo anticorpale specifico per poi gradualmente risalire.

Casualità temporali

Anche in questo caso è inevitabile che un test sierodiagnostico a parità di condizioni standard possa dare dei risultati falsamente negativi legati a casualità temporali, proprio perché non esiste test che abbia una specificità del 100% a fronte di una sensibilità dello stesso livello.

DISCORDANZE DELLE REAZIONI SAR-Ag:RB E FDC-mi

Altro problema concatenato alle aspecificità riguarda le discordanze tra le due reazioni sierodiagnostiche ufficiali: SAR-Ag:RB e FdC-mi. Gli effetti sono dello stesso ordine, basti ricordare che i piani nazionali prevedono severe misure restrittive in presenza di sieropositività anche della sola SAR-Ag:RB, pertanto anche in tal caso è importante discriminare le discordanze legate a false positività o a false negatività, o se invece trattasi di vere discordanze legate alla diversa sensibilità e specificità della SAR-Ag:RB rispetto alla FdC-mi in funzione anche della specie animale di origine del siero. Come è stato detto in precedenza, infatti, le due reazioni possono differire di sensibilità anche di 2-3 punti percentuali nei bovini a favore della FdC-mi, mentre negli ovini sembrerebbe l'inverso, a parità invece di specificità (100%).

Secondo Garin-Bastuji e Dufour (1995), una delle due reazioni falsamente positiva può verificarsi nell'ordine dell'8-15% degli allevamenti indenni da brucellosi.

Le cause delle discordanze sono in parte quelle descritte per le aspecificità delle due reazioni, che possono riguardare in maniera più o meno determinante l'una o l'altra reazione.

Le discordanze possono comunque essere legate alle seguenti cause.

Mancata standardizzazione di una delle due reazioni ufficiali

Sono queste le discordanze che potrebbero essere evitate monitorando le due reazioni in parallelo con ring test periodici, predisposti secondo quanto previsto dal decreto 4 ottobre 1999 in collaborazione con il Centro nazionale per la brucellosi presso l'IZS di Teramo.

Mancata standardizzazione di uno dei due antigeni "unici" nazionali

Anche queste discordanze potrebbero essere evitate con lo stesso monitoraggio periodico delle due reazioni: discordanze che dovrebbero essere segnalate tempestivamente al produttore dell'antigene e all'Istituto Superiore di Sanità, come prevede il relativo decreto sugli antigeni.

Errore tecnici

Sono legati al fatto che spesso le due reazioni vengono effettuate da operatori diversi, che lavorano in differenti laboratori e che spesso non comunicano direttamente su quelli che potrebbero essere dettagli operativi determinanti errori cosiddetti tecnici.

Lettura eccessivamente soggettiva

Una lettura cioè che non tiene nel dovuto conto i principi che regolano qualsiasi stima ad "occhio metrico": lettura che, secondo il nostro parere, deve assolutamente avvenire per raffronto con un controllo di soglia delle positività, previa conformità dei controlli di reazione giornalieri.

Uso improprio di vaccini particolari come 45/20, PBRev1 o PB19 (Pilet-Bonaux)

Sono vaccini poco utilizzati in passato, in fase R come il 45/20 oppure saturati con sieri anti-brucella come i vaccini PBRev 1 e PB19, definiti non agglutinogeni perché non inducono anticorpi agglutinanti, ma che tuttavia fissano il complemento (SAR-Ag:RB negativa e FdC-mi positiva).

Presenza del fenomeno di pre-zona o fenomeno paradosso

Questo fenomeno è legato principalmente agli anticorpi incompleti oppure da un eccesso di anticorpi completi nelle reazioni di agglutinazione in quanto non formano il reticolo di Marrack che rende visibile l'agglutinazione sedimentando nella provettina. Inoltre è noto che nella FdC-mi il complemento può fissarsi ad alcuni tipi di anticorpi incompleti, per esempio quelli prodotti da uno stimolo antigenico vaccinale in fase S, ma non a quelli prodotti dal vaccino RB51, in fase R, tuttavia ambedue i tipi rilevabili con il test di Coombs (Ciuchini *et al*., 2002). Per questi motivi si possono verificare negatività alla SAR-Ag:RB a fronte di positività alla FdC-mi

Diagnosi poco tempestive, infezioni brucellari recenti o tardive o croniche

Questo fenomeno è legato alle diversa sensibilità della SAR-Ag:RB e della FdC-mi alle variazioni quantitative delle varie immunoglobuline nell'evoluzione della malattia.

Secondo Garin-Bastuji, la SAR-Ag:RB reagisce molto bene con le IgG_1 e le IgM, (IgG_1 +, IgG_2–, IgM +, IgA–); mentre la FdC-mi reagisce bene con le IgG1, meno bene con le IgM (IgG_1+, IgG_2–, IgM +/–,IgA– Nel corso dell'evoluzione della malattia a seguito di infezione naturale o sperimentale, le prime immunoglobuline a comparire sono le IgM, che caratterizzano un'infezione recente, ma ben presto predominano le IgG_1 e in piccola parte le IgG_2, mentre il tasso delle IgM si abbassa. In questo caso, poiché la SAR-Ag:RB svela maggiormente le IgM rispetto alle IgG_1, si può osservare SAR-Ag:RB positiva e FdC-mi negativa. La SAR-Ag:RB possiede anche il pregio di svelare molto bene anche le IgG_1 e quindi gli animali con infezione cronica.

La FdC-mi è considerata la reazione Ag/Ac più sensibile e specifica tra quelle tradizionali, e in qualche Paese avanzato ha sostituito del tutto le reazioni basate sul principio dell'agglutinazione – SAR:Ag:RB, SAL in tubi, MRT (*Milk Ring Test*), card test.

La FdC-mi mette in evidenza sia le IgM che le IgG_1 e le IgG_2, ma soprattutto le IgG_1; per questa ragione svela molto bene le infezioni croniche ed entro certi limiti riesce a differenziare gli animali infetti da quelli vaccinati, come in precedenza è stato detto (Farina e Scatozza, 1998). Inoltre può svelare anche anticorpi incompleti, tanto che possono verificarsi situazioni FdC-mi positive a fronte di SAR-Ag:RB negative.

Questa situazione trova un effettivo riscontro effettuando il test di Coomb o test dell'agglutinazione indiretta sui sieri che hanno manifestato tali discordanze.

Diversa sensibilità e specificità delle due reazioni nel rilevare le soglie di positività

Questa diversità di sensibilità e specificità è infatti acclamata dal fatto che la SAR-Ag:RB deve essere interpretata come reazione qualitativa di screening o di massa, atta ad identificare allevamenti siero-positivi, mentre la FdC-mi come reazione individuale quantitativa, atta a

definire in maniera precisa le unità sensibilizzanti per soggetto che indicano la soglia di riferimento delle positività (≥20UFC/mL). Tuttavia tali discordanze, soprattutto se isolate, sono risolvibili con un'interpretazione dei dati in riferimento alla anamnesi di allevamento, o più semplicemente con una ripetizione ravvicinata delle prove sierodiagnostiche, previo accertamento del loro livello di standardizzazione.

Indagini effettuate per dosare le diverse classi di immunoglobuline in casi di esiti sierologici discordanti per una interpretazione scientifica delle discordanze sono tuttora aleatori, ma questa sembrerebbe una delle vie per discriminare reazioni specifiche da reazioni aspecifiche propriamente dette, dovute a cross-reattività sierologiche (Pizzoni, 1997).

STRATEGIA DI STUDIO DI REAZIONI ASPECIFICHE E DISCORDANZE

La strategia di studio che viene proposta è stata elaborata sulla base degli obiettivi previsti dal progetto di ricerca corrente presentato dall'IZS della Sardegna "G. Pegreffi" e accettato dal Ministero della Salute con il n. identificativo IZS SA 006/02. Tutti gli istituti sono presenti con unità operative distinte i cui responsabili scientifici sono gli autori della presente rassegna.

La strategia di studio dovrebbe prevedere due tipi di indagini: indagini storiche e nuove indagini, con obiettivi e significati diversi.

Indagini storiche

Hanno il compito di dimensionare e individuare il fenomeno nelle regioni sotto l'egida degli IZS che partecipano al progetto, sulla base dei dati sierologici del passato collegati ad "allevamenti o soggetti problema", o ai cosiddetti "singleton reactors", o a discordanze analitiche tra SAR-Ag:RB e FdC-mi, non risolte.

L'esistenza di sieri con i relativi dati potrebbe permettere una ripetizione inter-Istituto delle analisi volta a confermare il fenomeno e individuarne le effettive cause, cioè verificare se trattasi di aspecificità legate a cross-reattività sierologiche oppure a cause legate ai reagenti non ben titolati e/o standardizzati, a passaggi metodologici o ad errori e casualità operative.

Inoltre sarebbe opportuno risalire agli allevamenti da cui provenivano tali sieri e rintracciarl, al fine di renderli oggetto di nuove indagini atte ha dimostrare la persistenza del fenomeno delle aspecificità o discordanze.

Nuove indagini

Hanno il compito di affrontare il problema delle aspecificità e delle discordanze sierologiche nel corso delle attuali campagne di sorveglianza epidemiologica previste dai piani di eradicazione delle brucellosi animali (bovini, bufalini, ovini e caprini), e ancora in essere.

Gli IZS partecipano al progetto in convenzione secondo un piano di studio concordato che potrebbe svilupparsi come segue.

Per lo studio delle aspecificità e delle discordanze vanno innanzittutto rimosse le eventuali cause legate al campionamento e al campione, alla standardizzazione delle tecniche e degli antigeni che potrebbero comunque generare tali fenomeni. Successivamente, adottare una strategia di valutazione da sviluppare in quattro fasi distinte, così definibili:

- rilievo dei profili epidemiologici degli allevamenti "problema",
- ripetibilità inter-II.ZZ.SS. dei risultati,
- prove diagnostiche complementari di tipo sierologico, batteriologico, immunoenzimatico, biomolecolari,
- indagini sul ruolo di reservoir e dei "bradi",
- infine, valutazione statistica del fenomeno negli allevamenti provenienti dai territori o regioni sotto sorveglianza siero-epidemiologica degli IZS partecipanti al progetto.

I fase: profili epidemiologici degli allevamenti "problema"

Il profilo epidemiologico dell'allevamento (bovino, ovino caprino) da cui proviene il soggetto o i soggetti che abbiano manifestato una diagnosi falsamente positiva (aspecifica) o discordante (SAR-Ag:RB = pos. e FdC-mi = neg.) permette di stabilire, orientativamente, la probabilità che la diagnosi effettuata sia legata ad una vera infezione brucellare (Pouillot *et al*., 1999).

Il profilo epidemiologico di allevamento deve quindi evidenziare:

a) la dimensione dell'allevamento e l'età media degli animali (nei focolai di brucellosi, gli animali giovani sono quelli che presentano in minor numero reazioni sierologiche falsamente positive);
b) tutti gli eventuali interventi sanitari effettuati negli ultimi mesi (esempio: vaccini stabulogeni allestiti con microrganismi che possono cross-reagire con brucelle, terapie, interventi impropri ecc.);
c) l'insieme delle possibili fonti di contaminazione (contatti, vicinanze, trasferimenti di animali da allevamenti colpiti o sospetti);
d) segni clinici (aborti, parti prematuri, morti-natalità, ritenzioni placentari, fenomeni di sterilità, lesioni agli organi genitali ecc.);
e) prevalenza intra-allevamento, cioè numero degli animali con reazione sierologica atipica (falsamente positiva o discordante) sul totale dei testati sierologicamente;
d) un eventuale effetto stagionale; infatti le yersiniosi animali di solito si manifestano prevalentemente nei mesi primaverili o autunnali.

Nonostante la chiave di lettura di un completo profilo epidemiologico, la diagnosi differenziale può risultare molto complessa sia negli allevamenti bovini che ovi-caprini, soprattutto all'inizio dell'infezione la cui origine è spesso difficile da identificare.

II fase: ripetibilità inter-IZS della diagnosi convenzionale

La ripetizione della diagnosi convenzionale (SAR-Ag:RB e FdC-mi), sullo stesso campione di siero, da parte di tutti gli Istituti diagnostici partecipanti al progetto, in virtù del principio di ripetibilità del dato scientifico nel tempo e nello spazio, dovrebbe escludere la non conformità delle tecniche e degli antigeni ed eventuali errori tecnici e/o casuali per quelle che sono le tecniche convenzionali previste dai piani.

Per eliminare eventuali discordanze legate alle false positività della SAR-Ag:RB rispetto ad FdC-mi negative, si potrebbero trattare i sieri sospetti a 56 °C per 2 ore in bagnomaria e ripetere la reazione, oppure trattare i sieri con mercaptoetanolo prima della sieroagglutinazione rapida come per *B. canis*.

III fase: prove diagnostiche complementari

Questa fase prevede l'adozione di alcune prove diagnostiche complementari con caratteristiche e principi di reazione diversi, più sensibili e/o più specifiche della SAR-Ag:RB e della FdC-mi, in combinazione tra loro.

Tali prove possono essere di tipo immuno-umorale (antigene/anticorpo), ormai considerate classiche, come l'MRT o prova dell'anello sul latte, la gel immunoprecipitazione, la SAL (SieroAgglutinazione Lenta in provetta), il test di Coombs o degli anticorpi incompleti (Ciuchini *et al.,* 2002) e l'ELISA indiretta (Nielsen *et al.,* 1989; Ferriera *et al*., 2003; Erdenebaatar *et al*., 2003; Bajani Ari *et al.*, 2004) o competitiva (Nielsen *et al.,* 1995; Marìn *et al*., 1999), che svelano

differenti classi di immunoglobuline e spesso risultano più sensibili o più specifiche, oppure prove come la flurescence polarization assay (FPA), (Gall *et al*., 2000; Nielsen *et al.*, 2000; Nielsen & Gall, 2001, McGiven *et al*., 2003 Nielsen *et al*., 2004) o il *western blotting* (Kittelberger *et al.,*1998; Corrente *et al*., 2004). Per eliminare eventuali discordanze legate alle false positività dell'ELISA si possono trattare i sieri con chelanti del tipo EDTA: trattamenti che fanno diminuire i falsi positivi legati principalmente a Ig M (Nielsen *et al*., 1994; Pouillot *et al*., 1999).

Prove di tipo cellulo-mediato possono essere il gamma interferon test (γ-IFN) (Weynants *et al*., 1995; Kittelberger *et al*., 1997; Ciuchini *et al*., 1998, 2000; Adone *et al*., 2000; Duran-Ferrer *et al*., 2004), il dosaggio di alcune importanti citochine (Pasquali *et al*., 2001) e la prova allergica di intradermoreazione (Pouillot *et al*., 1997; Saegerman *et al*., 1999), che permettono invece una valutazione della reattività cellulo-mediata indotta da brucella.

Queste tecniche immunologiche complementari, combinate con le convenzionali adottate in Italia (SAR-Ag:RB e FdC-mi), da effettuarsi su latte, siero e sangue, con un nuovo campionamento sul "soggetto problema", consentono nel loro insieme un aumento della sensibilità e specificità diagnostica e quindi della capacità di discriminare diagnosi falsamente positive o falsamente negative.

Bisogna ricordare che in un contesto di reazioni sierologiche falsamente positive, nella brucellosi bovina o ovi-caprina, è impossibile formulare una diagnosi di certezza sulla base dei risultati dei test convenzionali, anche se ripetuti, effettuati su un solo prelievo (Pouillot *et al*., 1999); meglio quindi adottare la strategia di una combinazione di test da valutare in relazione a studi epidemiologici *ad hoc* (Ferroni, 2004).

Per aumentare la specificità diagnostica si possono adottare in parallelo le classiche tecniche di diagnosi diretta come l'isolamento batterico, molto specifica ma di bassa sensibilità (Alton *et al.,*1988; Adone *et al*., 1998;) oppure tecniche biomolecolari altamente sensibili e specifiche come la PCR su latte, sangue, sperma, secreti vaginali, reperti abortivi od organi interni dei soggetti inviati al macello per l'eliminazione (Bricker & Halling, 1994, 1995; Paganico *et al*., 1996; Pouillot *et al.,* 1999; Adone *et al.,* 2001b; Bricker, 2002; Bricker *et al*., 2003, Elfaki *et al*., 2004), oppure PCR-ELISA (Morata *et al*., 2003; Vrioni *et al*., 2004), Real-time multiplex PCR (Probert *et al.,* 2004).

Queste due ultime prove, se positive, consentono di discriminare e valutare in maniera assoluta diagnosi aspecifiche e tutte le discordanze possibili tra SAR-Ag:RB ed FdC-mi.

IV fase: indagini sul ruolo di reservoir dei selvatici e dei "bradi"

Queste indagini hanno lo scopo di dimostrare il ruolo dell'eventuale presenza di brucellosi negli animali selvatici o negli animali allevati allo stato brado, che condividono il territorio degli allevamenti "problema" o allevamenti con "singleton reactors", e di studiarne le eventuali correlazioni epidemiologiche. Come è noto infatti, anche in Italia, la brucellosi è stata rinvenuta nel cinghiale (Gennero *et al*., 2004), nel camoscio e nel cervo delle Alpi, e nella lepre bruna (Lavazza *et al*., 2000; Dondo *et al*., 2003) alla stregua di molti altri Paese europei, quali Francia, Austria, Repubblica Ceca e Svizzera (Godfroid, 2002; Maurin, 2005).

V fase: valutazione statistica del fenomeno

Tale valutazione dovrebbe essere seguita dalla pubblicazione dei risultati più significativi collegati alle diverse realtà regionali prese in considerazione, secondo sistemi ormai codificati che riguardano i principi di validazione di un test diagnostico per malattie infettive degli animali (OIE Manual, 2004e).

DIAGNOSI SIEROLOGICA CONVENZIONALE

In Italia i piani di sorveglianza sierologica dei programmi di eradicazione delle brucellosi animali prevedono l'uso combinato della SAR-Ag:RB e la prova di FdC-mi: reazioni che utilizzano antigeni "unici" nazionali S99, controllati ufficialmente dall'Istituto Superiore di Sanità, come impone la direttiva comunitaria aggiornata del 1997.

SAR-Ag:RB e FdC-mi sono due test sierologici che si basano su un principio unico che è la reattività antigene-anticorpo osservabile *in vitro* direttamente o indirettamente. La scelta in Italia di due test che utilizzano micro-quantità è dovuta all'adozione di antigeni "unici" su tutto il territorio nazionale. Tuttavia bisogna ricordare che la direttiva comunitaria prevede come test di screenig alternativi alla SAR-Ag:RB, la sieroagglutinazione in provetta o su piastra, la prova dell'anello su latte e l'ELISA (Regolamento CE N. 535/2002).

Le diverse tecniche di applicazione dei vari test assumono denominazioni che ne sottolineano le peculiarità di esecuzione.

L'adozione di test di screening e individuali effettuati di concerto fanno si che la diagnosi sierologica costituisca lo strumento su cui si basa la sorveglianza epidemiologica prevista dai piani di eradicazione che fanno ricorso alla strategia del *test and slaughter*.

I piani di eradicazione vietano l'uso di qualsiasi vaccino in quanto da una strategia di controllo e risanamento degli allevamenti dalla brucellosi, si è passati ad una strategia per l'eliminazione dell'agente eziologico della malattia dal territorio e attribuire così ogni caso di reinfezione all'introduzione di soggetti infetti da altri territori.

Nell'ambito di una strategia di studio delle reazioni aspecifiche e delle discordanze le reazioni convenzionali avranno come principale obiettivo di escludere quelle cause che possono essere legate ad una inadeguata standardizzazione dei metodi, degli antigeni o ad errori tecnici.

Questo obiettivo si realizza con una ripetizione delle reazioni SAR-Ag:RB e FdC-mi nei laboratori sierodiagnostici dei quattro Istituti che partecipano al progetto, sui sieri randomizzati opportunamente, al fine di definire le vere aspecificità e discordanze che ne costituiscono il "problema". I sieri "problema" dovranno essere analizzati con metodi diagnostici complementari, innovativi, di diversa sensibilità e specificità, in combinazione tra loro, e valutati in riferimento al profili epidemiologici degli allevamenti di origine dei sieri

SAR:Ag-RB

La SAR-Ag:RB è un test rapido, che utilizza un antigene acido a pH 3,5 colorato con Rosa Bengala, considerato di screening o di massa che permette di individuare gli allevamenti infetti o sospetti o comunque con anticorpi serici verso antigeni brucellari.

L'acidità dell'antigene conferisce una notevole sensibilità alla reazione. Svela molto bene le IgM, IgG_1 e IgG_2. È un test semplice, rapido, economico e sensibile, che in Italia ha sostituito la sieroagglutinazione lenta come screening di massa per il controllo degli allevamenti sottoposti ai piani di eradicazione della brucellosi.

Tutte le metodologie di applicazione pratica di questa reazione, messe in qualità ormai in ogni Istituto Zooprofilattico, dovranno innanzittutto rispettare, pedissequamente, gli allegati tecnici dei decreti 2/7/1992, n.453 e 27/7/1994, n.651.

La reazione di SAR-Ag:RB deve essere applicata secondo le seguenti norme tecniche pubblicate nei decreti in questione:

1. Il siero di riferimento comunitario è rappresentato dal secondo siero internazionale standard anti-Brucella abortus, fornito dal Central Veterinary Laboratory di Weybridge, Surrey, Inghilterra, contenente 1000 unità internazionali agglutinanti per millilitro (Second International Standard anti-Brucella Serum: 2nd ISaBS).
2. Il siero nazionale standard per il controllo della reazione deve essere calibrato sul secondo siero internazionale standard anti-Brucella abortus di Webridge.
3. Il siero di lavoro, di origine ovina (o bovina), per il controllo giornaliero della reazione deve essere calibrato sul siero nazionale standard.
4. L'antigene al rosa bengala è unico su tutto il territorio nazionale deve essere:
   - preparato con il ceppo B.abortus 99 o 1119 (USDA) o qualunque altro ceppo di sensibilità equivalente in fase S;
   - sospeso in tampone deve avere pH 3,5± 0,05 e essere colorato mediante rosa bengala;
   - controllato nei confronti di otto sieri liofilizzati riconosciuti rispettivamente positivi e negativi;
   - standardizzato in modo da dare una agglutinazione visibile alla dil. 1:45 (nuovo limite secondo Regolamento CE N.535/2002) e da non dare agglutinazione alla dil. 1:50 del 2nd ISaBS di Weybridge, U.K.;
   - fornito pronto per l'uso e riportare sull'etichetta di confezionamento il periodo di validità.
5. La reazione di SAR-Ag:RB deve essere effettuata nel modo seguente:
   - porre una goccia (0,03 mL) di antigene a fianco di una goccia (0,03 mL) del siero nativo in esame su una piastra bianca;
   - mescolare i due reagenti con una bacchetta di vetro o plastica, prima in linea retta, poi tracciando dei cerchi del diametro di 20-30 mm circa;
   - agitare manualmente la piastra con movimenti circolari oppure servendosi di un oscillatore a movimenti rotatori, a velocità di circa 30 movimenti, per almeno 4 minuti;
   - leggere la reazione in buone condizioni di illuminazione: in mancanza di agglutinanti la reazione sarà considerata negativa mentre in presenza di qualsiasi grado di agglutinazione la reazione è considerata positiva, salvo quando appare chiaro una eccessiva essiccazione ai mergini della reazione.
6. La siero-agglutinazione rapida con antigene al rosa bengala può essere allestita con apparecchiature automatiche.
7. La sorveglianza e il controllo del siero nazionale standard e dell'antigene sono effettuate dall'Istituto Superiore di Sanità, su ogni serie prodotta.

FdC-mi

La FdC-mi è un test individuale che permette di qualificare gli animali infetti in base alle unità sensibilizzanti il complemento per millilitro riscontrate nei sieri con anticorpi specifici: ≥ 20 usc/mL=animale infetto, < 20 usc/mL= animale non infetto.

La FdC-mi è considerata la reazione sierologica più sensibile e specifica, viene utilizzata per la diagnosi di brucellosi bovina, bufalina, ovi-caprina e umana, e può dimostrare anche la presenza di anticorpi incompleti, purché si leghino all'antigene. È basata sul principio che gli antigeni, sia corpuscolati che solubili, a contatto con il loro siero specifico immune formano un complesso antigene-anticorpo che fissa ed esaurisce il complemento presente nel siero.

La reazione in pratica si articola in due sistemi antigene-anticorpo la cui misura della reattività è data dal complemento titolato in precise unità, che oscilla tra il primo o il secondo sistema rivelatore a seconda che vi sia o meno la formazione del complesso antigene-anticorpo.

Il primo sistema è costituito dal siero in esame scomplementato e diluito per raddoppio a partire da 1:2 e antigene prodotto da *B. abortus* ceppo 99 in fase S a cui si aggiunge il complemento. I sieri vengono inattivati a varie temperature per 30' a seconda la specie di appartenenza: a 56°C i sieri bovini, a 62 °C i sieri di ovini e caprini, 60 °C i sieri di bufali.

Il primo sistema così allestito (Ac+Ag+C') è posto in incubazione in termostato a 37°C per 30'. Si aggiunge il secondo sistema, detto emolitico o rivelatore, costituito da emazie di montone sensibilizzate con emolisina.

La reazione, corredata di opportuni controlli dei vari elementi, viene ulteriormente incubata a 37°C per 30'. Se tra gli elementi del primo sistema (antigene brucellare+anticorpo del siero in esame) vi è stretta specificità, si forma un complesso immune che fissa tutto il complemento aggiunto; se invece non vi è specificità e il complesso immune non si forma, il complemento rimane libero e viene fissato o deviato dal secondo sistema determinando l'emolisi dell'emazie.

La reazione positiva viene quindi resa visibile da una chiarificazione della reazione per sedimentazione dei globuli rossi sul fondo della provetta o del pozzetto. La reazione negativa invece è resa visibile da una netta emolisi delle emazie.

I titoli di ogni siero positivo sono dati dall'end point di reazione e possono essere convertiti in unità sensibilizzanti internazionali.

Nei ruminanti la classe anticorpale che lega prevalentemente il complemento è rappresentata dalle $IgG_{1\ e}$ in parte dalle IgM ma possono legarsi anche anticorpi incompleti indotti da brucelle in fase S.

Tutte le metodologie di applicazione pratica di questa reazione, messe in qualità ormai in ogni Istituto Zooprofilattico, dovranno innanzittutto rispettare pedissequamente gli allegati tecnici dei decreti 2/7/1992, n.453 e 27/7/1994, n.651.

La reazione di fissazione del complemento deve essere applicata secondo le seguenti tecniche pubblicate nei decreti in questione:

1. Il siero di riferimento comunitario è rappresentato dal secondo siero internazionale standard anti-Brucella abortus (2nd ISaBS) di Weybridge, Surrey, Inghilterra, contenente 1000 unità internazionali agglutinanti e fissanti il complemento per millilitro.
2. Il siero nazionale standard per il controllo della reazione deve essere calibrato sul secondo siero internazionale standard anti-Brucella abortus di Weybridge.
3. Il siero di lavoro, di origine ovina (o bovina), per il controllo giornaliero della reazione deve essere calibrato sul siero nazionale standard.
4. Un siero in esame che contiene 20 o più unità internazionali fissanti il complemento è considerato positivo.
5. L'antigene è unico su tutto il territorio nazionale e deve essere:
   - preparato con il ceppo *B.abortus* 99 o 1119 (USDA) o qualunque altro ceppo di sensibilità equivalente, in fase S;
   - sospeso in soluzione fisiologica 0,85 NaCl e fenolato;
   - standardizzato rispetto il secondo siero internazionale standard standard di Weybridge;
   - fornito concentrato e sull'etichetta di confezionamento riportare coefficiente di dil. E data di scadenza.
6. La reazione di FdC-mi deve essere effettuata secondo il seguente schema unificato:
   a) inattivare i sieri in esame, nativi o prediluiti, a 60°C (o 56° se di origine bovina);
   b) diluire per raddoppio i sieri inattivati;
   c) distribuire l'antigene alla diluizione d'uso;
   d) distribuire 2 unità di complemento;

e) agitare e porre in incubazione a 37°C per 30';
f) aggiungere il sistema emolitico contenente 2 unità di emolisina e una concentrazione del 2% di globuli rossi lavati, pari a 54x107 cellule per millilitro;
g) allestire i seguenti controlli di reazione:
   - controllo del potere anticomplementare dei sieri;
   - controllo dell'antigene;
   - controllo del sistema emolitico;
   - controllo delle unità di complemento utilizzate;
   - controllo di lettura % di emolisi;
   - controllo del siero nazionale standard e del siero di lavoro positivo;
   - controllo del siero negativo;
h) agitare e porre in incubazione a 37°C per 30'
i) verificare la qualità dei controlli;
j) leggere il titolo dei sieri in esame, rappresentato dalla più alta diluizione che ha determinato il 50% di emolisi o di fissazione, e trasformare il titolo in unità internazionale fissanti il complemento.

7. La reazione può essere allestita con apparecchiature automatiche.
8. La sorveglianza e il controllo del siero nazionale standard e dell'antigene sono effettuati dall'Istituto Superiore di Sanità, su ogni serie prodotta.

DIAGNOSI SIEROLOGICA COMPLEMENTARE

La diagnosi sierologica complementare ha l'obiettivo di confermare e integrare i risultati ottenuti nella diagnosi convenzionale.

Si avvale di prove basate sul principio delle reazioni antigene/anticorpo che tuttavia hanno caratteristiche diverse, o più sensibili o più specifiche, perché coinvolgono classi anticorpali diverse come per esempio la prova dell'anello sul latte (IgA) oppure un maggior numero di classi come l'ELISA indiretta (IgG_1, IgG_2, IgM, IgA).

Nel capitolo sulla strategia di studio delle aspecificità e delle discordanze che caratterizzano i sieri "problema", sono state indicate molte altre prove antigene/anticorpo per una diagnosi complementare, come la sieroagglutinazione in tubi (SAT), il test di Coomb o degli anticorpi incompleti, l'ELISA sul latte, l'ELISA competitiva, la fluorescenza polarizzata (FP). Alcune di queste sono previste dal recente regolamento (CE) N.535/2002 della Commissione CEE che modifica l'allegato C della direttiva 64/432/CC del Consiglio e la decisione 2000/330/CE, pubblicato sulla *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee*, L80/22 del 23/3/2002.

Per i nostri studi una diagnosi complementare può essere basata solo sulla prova dell'anello sul latte e l'ELISA sui sieri, le cui positività rilevate con le reazioni convenzionali costituirebbero un "problema" in quanto troverebbero riscontro reale con la malattia o con le sue manifestazioni cliniche più eclatanti quale l'aborto o l'infertilità.

MRT

La prova dell'anello sul latte (*Milk Ring Test*, MRT) è utilizzata per svelare gli anticorpi nel latte di vacca, sia come prova individuale che in pool di massa; in quest'ultimo caso con l'aumentare dei soggetti di un gruppo il test diventa sempre meno sensibile e affidabile.

L'antigene prodotto da *B. abortus,* colorato con ematossilina, viene mescolato in una provettina nella proporzione di una 30µl per mL di latte fresco da saggiare: le miscele sono incubate a 37°C per 1 h.

La reazione positiva si manifesta con il formarsi di un anello rosso sulla superficie della colonna di latte, in conseguenza al fatto che i complessi antigene-anticorpo adsorbiti alla superficie dei globuli di grasso vengono veicolati in superficie.

A reazione negativa l'anello di panna è bianco e la colonna di latte sottostante di colore rosso dovuto all'antigene. In caso di positività della prova tutti i soggetti della stalla devono essere sottoposti a ulteriori test sierologici individuali.

Nella reazione sono coinvolte le IgA prodotte localmente e in quantità minore le IgM e le IgG_1 che hanno origine nel sangue. Queste ultime possono disturbare la prova determinando un precipitato sul fondo della provettina e interferendo di conseguenza con la capacità di agglutinare degli altri isotipi.

La prova dovrà essere eseguita conformemente a quanto previsto dal recente regolamento N.535 della Commissione delle Comunità europee, pubblicato sulla G.U. della CEE, L 80/22 del 23/3/2002.

ELISA

L'ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) è una reazione immunoezimatica, solo di recente utilizzata per la diagnosi sierologica. Può essere effettuata sul siero, sul latte e sul colostro.

Il principio della reazione è basato sulla messa in evidenza degli anticorpi specifici presenti in un siero mediante un antigene brucellare fissato alla fase solida (piastra microtitre) con un siero policlonale o monoclonale o passivamente.

Se nel siero in esame sono presenti anticorpi specifici, si forma un complesso antigene-anticorpo che viene evidenziato dall'aggiunta di anti-gammaglobuline marcate con perossidasi o fosfatasi alcalina (enzimi).

L'aggiunta del substrato dell'enzima determina una reazione colorimetrica la cui intensità ovviamente è proporzionale alla quantità del complesso antigene-anticorpo formatosi.

L'intensità colorimetrica può essere stimata ad "occhio metrico" per confronto con controlli negativi, oppure misurata allo spettrofotometro. L'ELISA è un metodo molto valido capace di svelare le IgG_1, IgG_2,IgM e IgA: in grado quindi di identificare animali con infezione iniziale o in stato avanzato.

Una versione della tecnica, l'ELISA catching, può essere utilizzata anche per la ricerca dell'antigene brucellare, fissando alla fase solida i relativi anticorpi (monoclonali o policlonali) che lo catturano. L'ELISA competitiva è un'altra versione che può essere utile per rilevare cross-reazioni sierologiche con i microrganismi antigenicamente simili quali ad esempio la *Y.enterocolitica* O9.

In Italia, in campo veterinario l'ELISA competitiva è stata utilizzata sperimentalmente per distinguere negli ovini le risposte vaccinali da Rev1 (biotipo 1) da quelle infettanti notoriamente determinate dal biotipo 2 (Farina *et al*., 1995).

L'ELISA indiretta, impiegata per il rilievo di anticorpi anti-*Brucella* nel latte o nel siero, può essere autorizzata per la certificazione degli animali provenienti da allevamenti ufficialmente indenni, purché eseguita conformemente al regolamento (CE) N.535/2002 (G.U.della CEE L80/22 del 23/3/2002) e alla decisione della Commissione 2004/226/CE (G.U. della CEE n.L 068 del 06/03/2004 pag.0036-0037).

PROVE DELL'IMMUNITÀ CELLULO-MEDIATA

La diagnosi complementare prevista in combinazione con la diagnosi convenzionale per lo studio delle aspecificità e discordanze sierodiagnostiche, prevede anche prove che permettono una valutazione della reattività cellulo-mediata indotta negli animali da antigeni brucellari.

Tali prove sono: la classica prova di intradermoreazione o prova allergica, la prova della blatizzazione linfocitaria, il dosaggio di alcune importanti citochine e il gamma interferon test (γ-IFN).

La prova di intradermoreazione e il γ-IFN sono già state utilizzate per lo studio delle reazioni falsamente positive, risultando ambedue con una buona specificità mentre il γ-IFN anche con un'ottima sensibilità. Queste due prove vengono riproposte nell'ambito della diagnosi complementare al fine di valutare la risposta immunitaria del comparto cellulo-mediato nei confronti della brucella. Tale risposta spesso permette di riconoscere le aspecificità falsamente positive o falsamente negative.

La specificità del γ-IFN, spesso permette di discriminare animali a sierologia negativa in presenza di brucellosi cronica (Weynants *et al*.,1995, Gerbier *et al*.,1997a; Saegerman *et al*.,1999) o di trattamenti con vaccini del tipo RB51 in fase R (Adone *et al*.,2000).

La prova di intradermoreazione allestita con antigeni allergizzanti provenienti da *B.melitensis* in fase rugosa si è rivelata molto utile per distinguere gli animali infetti dagli animali a sierologia atipica che davano false positività (Garin-Bastuji, 1993; Pouillot *et al*.,1997; Saegerman *et al*., 1999).

Prova di intradermoreazione brucellare o prova allergica

La prova di intradermoreazione è una prova *in vivo* che rileva lo stato di ipersensibilità ritardata indotta dall'infezione brucellare o anche da vaccini negli ovini, caprini e bovini.

Viene utilizzata nella pratica come prova complementare alle prove sierologiche ma attualmente in Italia non è contemplata tra le prove ufficiali.

Un eventuale utilizzo dovrà comunque essere conforme a quanto riportato nel recente "Regolamento (CE) N.535/2002":

Condizioni per l'uso dell'intradermoreazione

a) L'intradermoreazione per la brucellosi non può essere utilizzata per la certificazione negli scambi intracomunitari.
b) L'intradermoreazione per la brucellosi è una delle prove più specifiche per l'individuazione della brucellosi in animali non vaccinati; tuttavia la diagnosi non deve essere effettuata esclusivamente sulla base di reazioni intradermiche positive.
c) I bovini che sono risultati negativi ad una delle prove sierologiche descritte nel presente allegato e che reagiscono positivamente all'intradermoreazione brucellare devono essere considerati infetti.
d) I bovini che sono risultati positivi ad una delle prove sierologiche descritte nel presente allegato possono essere sottoposti all'intradermoreazione brucellare per rafforzare l'interpretazione dei risultati delle prove sierologiche, particolarmente nei casi in cui negli allevamenti indenni o ufficialmente indenni da brucellosi non può essere esclusa una reazione incrociata con anticorpi contro altri batteri.

La prova deve essere condotta utilizzando un preparato allergenico contro la brucellosi standardizzato e definito, che non contenga antigene lipopolisaccaride liscio (LPS), poiché questo

potrebbe provocare reazioni infiammatorie non specifiche o interferire con le successive prove sierologiche.
Uno di questi allergeni è la Brucellina INRA preparata da un ceppo non liscio di *B. melitensis.*
I requisiti per la sua produzione sono descritti nella sezione B2 del capitolo 2.4.2 del Manuale di norme per le prove diagnostiche e i vaccini per animali terrestri, dell'OIE (2004b).
Procedura di prova.

0,1 mL di brucellina vengono iniettati per via intradermica nella plica caudale, nella pelle del fianco o in un lato del collo.
La lettura deve essere eseguita dopo 48-72 ore.
Lo spessore della cute deve essere misurato nel punto di inoculazione con un calibro di Vernier prima dell'inoculazione e al momento della lettura.

Interpretazione dei risultati.

Una reazione molto evidente è facilmente riconoscibile dalla presenza di gonfiore e indurimento locale.
L'intradermoreazione brucellare deve essere considerata positiva quando si ha un ispessimento della cute di 1,5-2 mm o più.

Gamma-Interferon test

Il Gamma-Interferon test (γ-IFN test) è di recentissima applicazione nel campo diagnostico della brucellosi bovina mentre è stato ampliamente sperimentato per la diagnosi sperimentale di tubercolosi e paratubercolosi.

È un test che si applica sul sangue *in toto* per il rilievo della risposta cellulo-mediata indotta in bovini da ceppi di *Brucella* spp e può costituire un test di supporto alla diagnosi sierologica, potendo individuare risposte specifiche cellulo-mediate in soggetti che non reagiscono alle metodiche sierologiche convenzionali, come per esempio vitelli di madri infette o soggetti anergici, o soggetti cosiddetti "problema" con sierologia atipica.

Il γ-INF test è un sistema immunoenzimatico che misura la quantità di γ-INF rilasciato dai linfociti T attivati *in vitro* da un allergene brucellare specifico.

Molti utilizzano (Adone *et al.,* 2000) come allergene una frazione batterica purificata del ceppo in fase rugosa B115 di *B. melitensis*, cioè la brucellina INRA

L'esecuzione della prova prevede i seguenti passaggi:

- prelevare dall'animale da saggiare almeno 10 mL di sangue in provette contenenti litio-eparina (15 U/mL);
- cimentare due aliquote di 1,5 mL di sangue ciascuna, rispettivamente con 100 µl di allergene e 100 µl di PBS (0,01M, pH 7,2) per verificare l'assenza di stimolazione aspecifica;
- incubare le colture per 18-20 h a 37°C in termostato umidificato, con 5% di CO_2;
- raccogliere i campioni di plasma sensibilizzati e conservare a -20°C, fino al momento dell'uso;
- dosare il γ-INF rilasciato nel plasma con il kit per il rilievo immunoenzimatico del γ-INF bovino (es. BOVIGAM della GSL Ltd, Melbourne, Australia);
- i risultati sono valutati come indice di stimolazione (IS), determinato dal rapporto fra la media delle densità ottiche (A_{450}) delle colture in esame e la media delle densità delle colture di sangue di soggetti sicuramente indenni da brucellosi e non vaccinati, ottenute dopo stimolazione in parallelo con lo stesso allergene

DIAGNOSI BATTERIOLOGICA

Il quadro clinico della brucellosi non è patognomonico e quindi si rendono necessarie procedure diagnostiche di laboratorio a conferma del sospetto eziologico, sia di tipo colturale che sierologico (Alton *et al*., 1988).

La ricerca batteriologica di *Brucella* è il solo metodo che, in caso di positività, permette una diagnosi certa di infezione (Adone *et al*., 1998; Pouillot *et al*., 1999) poiché risponde *in primis* a quelli che sono i tradizionali postulati di Koch.

In passato la diagnosi batteriologica basata sull'isolamento di brucelle dal materiale patologico era considerato inattuabile, sia per la scarsa presenza del batterio nei reperti, sia per la possibilità di un'elevata contaminazione dei reperti stessi.

Lo sviluppo di facili tecniche di macerazione dei tessuti repertati e la produzione di terreni altamente elettivi e selettivi consentono di ricorrere alla diagnosi batteriologica attraverso esami colturali con notevole probabilità di successo.

Ha quindi un notevole interesse in tutti i casi di sospetta brucellosi. A causa della sua inda ginosità, la ricerca batteriologica dovrebbe essere effettuata in tutte le situazioni in cui, in un contesto epidemiologico o sierologico che fa pensare alla brucellosi, non vi è alcun indizio che permetta di orientare la diagnosi *(esempio, nessuna variazione della sierologia, presenza di aspecificità in numero significativo, discordanze tra le due prove ufficiali consistenti, numerosi titoli al limite della soglia di positività*). Tuttavia la ricerca batteriologica manca di sensibilità e un risultato negativo non permette da solo di escludere l'infezione brucellare: infatti, è soprattutto nelle forme latenti (senza manifestazioni cliniche, cioè con scarsa espressione sierologica) che la ricerca batteriologica rischia di mancare di sensibilità, dato che le brucelle sono poco numerose nei prelievi. Una sensibilità maggiore si può ottenere moltiplicando i prelievi sull'animale vivo (secrezioni genitali: tampone endo- o pericervicale, latte) o sull'animale morto (linfonodi cefalici, retromammari e iliaci, milza e organi genitali) (Garin-Bastuji, 1993; Pouillot *et al*.,1999).

Nel contesto della strategia di studio delle aspecificità e discordanze, la diagnosi batteriologica deve affiancare la diagnosi biomolecolare per indagare i soggetti "problema" da cui derivano i sieri con aspecificità falsamente positive o falsamente negative.

Ricerca batteriologica

Alla raccolta dei campioni, liquidi o tessuti, deve seguire una immediata refrigerazione (o congelamento a –20°C se il campione non viene utilizzato nell'arco di 12 h); ideali per il trasporto risultano le borse con ghiaccio secco. Il numero di brucelle vive in tessuti mantenuti a –20°C, o a temperature inferiori, non subisce variazioni significative per almeno 18 mes.Ciò si riferisce ai tessuti non trattati e non ai tessuti macerati o sospesi in diluente e poi congelati. Naturalmente, ripetuti cicli di congelamento e scongelamento determinano una maggiore perdita di vitalità da parte delle brucelle, anche se favoriscono la fuoriuscita dalle cellule.

L'isolamento di brucelle può essere tentato da tutti i tessuti, tuttavia quelli più significativi, soprattutto dopo un aborto, sono la placenta (i cotiledoni), i tessuti fetali (il contenuto dell'abomaso, il polmone e il fegato), il tampone vaginale, il sangue, il latte e lo sperma.

Per il latte e il sangue in particolare poiché in questi campioni, a differenza dei tessuti direttamente coinvolti nell'episodio abortivo, il numero di brucelle è scarso, è opportuno

utilizzare, prima della semina in terreno selettivo, un terreno liquido di arricchimento contenente una miscela di antibiotici per prevenire la crescita di contaminanti.

Il terreno arricchito viene incubato a 37°C in 10% di CO_2 (per *B. abortus* e *B. ovis*) per circa 6 settimane, durante il quale vengono eseguiti sub-passaggi settimanali seminando su terreno selettivo. Alternativamente, si può utilizzare il metodo bifasico di Castañeda che permette di ridurre il numero delle sub-colture: questo metodo viene utilizzato soprattutto per il sangue.

Il latte viene campionato prelevandone almeno 20 mL per ogni quadrante della mammella: il pool viene centrifugato (6-7000g x 15') e il sedimento dopo aver scartato la schiuma alla superficie con estrema attenzione viene seminato su terreno solido selettivo oppure in bottiglie contenente il terreno bifasico (1 mL e 2 mL in due bottiglie). Questo particolare procedimento viene adottato perché l'infezione brucellare della mammella può essere confinata in uno o più quarti nel bovino e in ogni lato della mammella nelle pecore e nelle capre.

Il sangue viene seminato con maggiore facilità in terreno liquido, molto usato è il terreno bifasico di Castañeda, costituito da un sistema che utilizza contemporaneamente nella stessa bottiglia un terreno in parte solido e in parte liquido. Circa 10 mL di sangue, prelevati dalla giugulare con un vacutainer contenente come anticoagulante citrato di sodio, sono inoculati nelle bottiglie che sono poi disposte in posizione verticale ed esaminate ogni 3 giorni. Ogni colonia che si sviluppa sulla parte solida viene sub-colturata per ulteriori indagini. In assenza di colonie, la bottiglia deve essere inclinata ogni 3-7 giorni, in modo che il liquido bagni il terreno solido, e poi rimessa in posizione verticale. Con questo sistema lo sviluppo delle colonie può manifestarsi anche dopo 35 giorni di incubazione.

Esame microscopico diretto

Tutti i campioni possono essere esaminati direttamente attraverso l'osservazione di vetrini allestiti per impronta della superficie di taglio e colorati con opportune tecniche, quali Ziehl-Neelsen modificato e colorazione di Köster.

Le brucelle appaiono colorate di rosso in campo blu: nei vetrini provenienti dalle membrane fetali, si possono rinvenire granuli all'interno delle cellule, che risultano colorate in blu. Tuttavia altri microrganismi, responsabili di aborti (*Clamydia* e febbre Q), si colorano di rosso all'interno delle cellule ed è quindi difficile con l'osservazione microscopica fare anche un'identificazione presuntiva senza ulteriori prove colturali, biochimiche e sierologiche.

Passaggi di arricchimento *in vivo*

Per stimolare la moltiplicazione, quindi aumentare il numero di brucelle in campioni omogeneati di tessuto o di sangue o di latte e suoi derivati, si possono effettuare passaggi su cavie inoculate per via sottocutanea o intramuscolare.

In caso di presenza di brucelle nei campioni, si instaura un'infezione cronica che rende facile l'isolamento in purezza del germe dai vari organi della cavia, la quale presenterà anche elevati titoli anticorpali nel siero. Prima di sacrificare l'animale si procede ad un accertamento sierologico a 20 giorni dall'inoculazione del campione, dopodiché si sacrifica l'animale per l'isolamento dai vari organi.

Isolamento colturale

L'isolamento resta lo standard di riferimento classico altamente specifico e sensibile, in particolare per le brucellosi che molto spesso decorrono asintomatiche e latenti.

Gli svantaggi di questa metodica per le brucelle possono essere legati alla qualità del campione (povero di germi), alle esigenze colturali un po' particolari, al tempo necessario per l'esecuzione e al costo delle operazioni. I vari campioni seminati, prima in eventuali terreni di arricchimento oppure direttamente in terreni selettivi per l'isolamento, dopo 3-4 giorni di incubazione a 37 °C, se contaminati da brucelle, possono determinare in terreni solidi lo sviluppo di colonie a crescita lenta, piccole, lucenti, trasparenti, se in forma S, opache e rugose, se in forma R. In terreni liquidi la crescita delle brucelle determina un lieve intorbidamento e la formazione di un leggero sedimento sul fondo facilmente riconducibile in sospensione. Tra i terreni di arricchimento tipico è il *serum dextrose broth* addizionato di supplementi: fungizone, cicloserina, vancomicina, acido nalidixico, bacitracina. Tra i terreni solidi, il terreno di Farrell è quello più conosciuto, costituito da *serum dextrose agar* addizionato con bacitracina, polimixina B, cicloesamide, acido nalidixico e vancomicina.

Ogni colonia tipica isolata da un caso sospetto di brucellosi che risulta costituita da batteri coccobacillari Gram negativi deve essere sottoposta ad una serie di prove di laboratorio per la conferma della tipizzazione presuntiva di genere e per l'identificazione finale di specie e biotipo, dove l'uso di monoclonali rappresenta un metodo innovativo di recente applicazione.

Identificazione del genere

Le prove fondamentali da effettuarsi per differenziare le caratteristiche del genere B*rucella* da altri generi Gram-negativi sono la fermentazione negativa del lattosio su *agar MacConkey*, la mancanza di produzione di acidi su *agar* contenente glucosio (*B. neotomae* in alcuni casi può fermentarlo), la mancanza di emolisi su *agar* sangue, le prove biochimiche: catalasi +, ossidasi + (eccetto *B. ovis*, *B. neotomae* e occasionalmente *B. abortus*), ureasi + (eccetto *B. ovis* e occasionalmente *B. abortus*), riduzione dei nitrati + (eccetto *B. ovis*, che non li riduce), utilizzazione dei citrati negativa, determinazione della fase e prove sierologiche con sieri policlonali specifici e/o monoclonali anti-A, anti-M e anti-R.

Identificazione della specie

Nell'ambito del genere, le 6 specie di brucella si identificano mediate tipizzazione fagica, la determinazione del profilo del metabolismo ossidativo, la determinazione della fase con acriflavina, il profilo antigenico con sieri specifici o monoclonali anti-A, anti-M e anti-R (Tabelle 2 e 3).

Identificazione dei biotipi (biovarianti)

Nell'ambito delle specie i vari biotipi si differenziano sulla base della richiesta di CO_2 per la crescita, della produzione di H_2S (effettuata con la cartina di acetato di piombo), sulla base della sensibilità alla tionina e fucsina, e infine sulla base del titolo agglutinante con sieri monospecifici o monoclonali anti-A, anti-M e anti-R (Tabelle 2 e 3).

Tabella 2. Schema convenzionale per classificare specie e biotipi di *Brucella*

Specie	Biotipi	Esigenza di CO_2	Produzione di H_2S	Crescita in presenza di					Agglutinazione con sieri monospecifici		
				tionina			fucsina				
				a	b	c	b	c	A	M	R
B.melitensis	1	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
	2	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
	3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
B.abortus	1	±	+	-	-	-	+	+	+	-	-
	2	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
	3	±	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	4	±	+	-	-	-	+	+	-	+	-
	5	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
	6	+	±	-	+	+	+	+	+	-	-
	7	-	±	-	+	+	+	+	+	+	-
	9	±	+	-	+	+	+	+	-	+	-
B.suis	1	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
	2	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
	4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	5	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
B.ovis		+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
B.canis		-	-	+	+	+	-	±	-	-	+
B.neotomae		-	+	-	-	+	-	-	+	-	+

Legenda: a= dil.1/25000, b=dil.1/50000 c=1/100000

Tabella 3. Sensibilità ai fagi delle varie specie di *Brucella*

Specie	Fagi a RDT					
	Tb*	Wb	BK_2	Iz_1**	R/C	R/O
B.melitensis	-	-	+	-	-	-
B.abortus	+	+	+	+	-	-
B.suis	-	+	+	+	-	-
B.neotomae	-	+	+	+	-	-
B.ovis	-	-	-	-	+	+
B.canis	-	-	-	-	+	-

* a RDT x 104 lisa anche *B.suis*; ** a RDT lisa anche *B.melitensis* e *B.suis* in fase R, a RDT x 104 lisa anche *B.melitensis*; Tb=Tblisi, Wb=Weybridge, BK_2=Berkely, Iz_1=Izatnagar.

Identificazione dei ceppi vaccinali

In aree dove vengono utilizzati vaccini vivi, occasionalmente è possibile isolare dal latte e suoi derivati o da materiale patologico i ceppi di origine vaccinale. È necessario pertanto procedere ad ulteriori prove di differenziazione nell'ambito del biotipo di appartenenza dei ceppi vaccinali, al fine di distinguerli dai ceppi virulenti da strada. I vaccini vivi classici sono allestiti con *B. abortus* ceppo 19 per bovini e bufali, oppure con *B. melitensis* ceppo Rev1 per ovi-caprini. Di recente in America viene utilizzato il vaccino ceppo RB51, tuttora sotto l'egida delle autorità federali, in condizioni di campo sperimentali (Schurig *et al.* 1991). In Italia e in

molti paesi europei non è ammessa la vaccinazione sia nei bovini e bufali che negli ovi-caprini, se non dietro una richiesta di autorizzazione concessa in deroga dalle autorità sanitarie nazionali e comunitarie. È una particolare strategia di eradicazione basata sull'individuazione sierologica dei soggetti infetti e del loro abbattimento, dietro opportuno risarcimento da parte dello Stato, che ha reso obbligatorio ogni piano per ottenere i propri territori indenni dalla malattia come previsto dalla Comunità europea. Anche se è vietato l'uso di vaccini vivi, tuttavia in presenza di isolamenti degli stessi biotipi è opportuno procedere ad una caratterizzazione che permetta di distinguerli dagli omonimi vaccinali. Per i vaccini inattivati come il 45/20 o H38, teoricamente dovrebbe essere esclusa ogni remota possibilità di reisolamento.

B. abortus 19

Il ceppo 19 di *B. abortus*, biotipo 1, viene utilizzato per la produzione del vaccino Buck 19, attenuato, per la profilassi della brucellosi bovina.

Il vaccino determina risposte anticorpali intense e può localizzarsi nella mammella ed essere emesso con il latte. Caratteristiche differenziali con il biotipo di origine: non richiede CO_2 in primo isolamento, non cresce su terreni agarizzati contenenti tionina (2 μg/mL), i-eritritolo (1 mg/mL) e penicillina (5 IU/mL), inoltre presenta una patogenicità residua per le cavie significativamente inferiore al ceppo virulento.

B. melitensis Rev1

Il ceppo Rev1 di *B. melitensis*, biotipo 1, viene utilizzato per la preparazione del vaccino Rev1, attenuato, per la profilassi della brucellosi ovi-caprina. Caratteristiche differenziali con il biotipo di origine: su terreni solidi sviluppa colonie molto piccole, non cresce in terreni colturali contenenti tionina (20 μg/mL) o fucsina (20 μg/mL) o penicillina (5 IU/mL), ma cresce in presenza di streptomicina (2,5μg/mL), inoltre presenta una patogenicità residua per i topini significativamente inferiore rispetto al ceppo da strada.

B. suis 2

Il ceppo 2 di *B. suis*, biotipo 1, viene utilizzato da molto tempo in Cina per la vaccinazione orale degli ovi-caprini. Principale caratteristica differenziale è la sua patogenicità residua su cavia simile a quella di *B.abortus* in fase R.

B. abortus RB51

Il ceppo RB51 di *B. abortus* viene utilizzato negli Stati Uniti per allestire il vaccino RB51, vivo, in fase R, di nuova generazione (Schurig *et al*.,1991). Il ceppo è un mutante rugoso rifampicina-resistente, la cui principale caratteristica è la mancanza dell'antigene O dell'LPS di membrana, per cui non provoca anticorpi svelabili con le reazioni antigene/anticorpo che adottano antigeni in fase S. La risposta anticorpale specifica può essere monitorata con le reazioni ELISA o dot-ELISA (Olsen *et al.,* 1997; Edmonds *et al*., 1999) oppure con la reazione di fissazione del complemento (Adone e Ciuchini, 1999). Caratteristiche differenziali con il biotipo di origine: non richiede CO_2 in primo isolamento, cresce in terreni contenenti rifampicina (40 μg/mL) e penicillina (10 IU/mL), presenta un metabolismo ossidativo negativo per nitrati, malato e arabinosio, viene reisolato in fase R.

DIAGNOSI BIOMOLECOLARE

Obiettivo principale della diagnosi biomolecolare è evidenziare il DNA della brucella nel sangue, latte o nei tessuti degli animali da cui provengono i sieri che alla SAR-Ag:RB e alla FdC-mi hanno dato risultati considerati aspecifici o atipici o discordanti.

Le principali prove adottate per una diagnosi complementare sono la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) di tipo essenzialmente qualitativo e la *Real-time* PCR di tipo quantitativo (Al Dahouk *et al*., 2004).

Nella nostra strategia di studio delle aspecificità e discordanze è sufficiente adottare la PCR di tipo qualitativo che molti laboratori applicano per motivi di ricerca proprio in materia di brucellosi animale (Briker *et al*., 1994, 1995; Leal-Klevezas *et al*., 1995; Gallien *et al*., 1998; Adone *et al*., 2001; Zerva *et al.,* 2001 Briker, 2002; Briker *et al*., 2003; Lubek *et al*., 2003).

Polymerase Chain Reaction

La *Polymerase Chain Reaction* (PCR) si basa sull'azione di una DNA polimerasi termostabile, come la *Thermus acquaticus* (*Taq*) *polimerase*, per duplicare uno specifico frammento di DNA delimitato alle due estremità da due *primer* oligonucleotidici, sequenze specifiche che ibridizzano con le eliche complementari in orientazione opposta. Ogni ciclo di amplificazione è composto da tre reazioni a temperature diverse (specifiche per ogni coppia di *primer*): denaturazione del DNA (92-98 °C); ibridizzazione o *annealing* dei *primer*; estensione e sintesi di un nuovo filamento (72 °C). I prodotti di questo processo di duplicazione sono complementari e quindi capaci di ibridizzare tra loro e con i *primer*.

Sfruttando le proprietà di resistenza all'inattivazione termica della *Taq* polimerasi o di altre polimerasi termostabili è possibile sottoporre il campione a cicli termici successivi (generalmente tra 25-40) ottenendo l'amplificazione esponenziale del frammento compreso tra i due *primer*. L'automazione della procedura mediante appositi termostati programmati permette di completare il processo in una o poche ore senza l'intervento dell'operatore. Per accertare la specificità dei prodotti di amplificazione si utilizza tradizionalmente il metodo di separazione elettroforetica su gel di agarosio o di poliacrilammide, caricando una piccola aliquota della miscela di reazione e colorando il gel con etidio bromuro o altri coloranti più sensibili. Questa tecnica si è dimostrata valida per l'individuazione delle brucelle, soprattutto nel latte, nel colostro e nel sangue. L'utilizzo poi della tecnica dell'elettroforesi in campo pulsante (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PFGE) ottiene una migliore separazione dei frammenti in profili specifici per ciascuna specie di brucella. L'osservazione diretta dei pattern di restrizione enzimatica del DNA di brucella mediante PFGE risulta quindi un metodo rapido e facilmente riproducibile per la caratterizzazione e la classificazione di brucelle in specie e biotipi.

La PCR, anche se da vari autori è stata messa a punto come tecnica di diagnosi su campioni liquidi e omogenati di tessuto, nei laboratori diagnostici non trova tuttavia grande applicazione nella routine.

La PCR resta senz'altro il metodo diagnostico più sensibile e specifico attualmente conosciuto, ma proprio per l'elevata sensibilità si possono avere risultati falsi positivi che derivano dall'amplificazione di DNA estraneo penetrato nel campione dall'esterno. Per quanto riguarda la specificità, c'è un limite teorico che dipende dal fatto che bisogna conoscere almeno in parte la sequenza da amplificare per poter sintetizzare i *primer* specifici.

I parametri che influenzano sensibilità e specificità della PCR sono molteplici:

- concentrazione e qualità del templato;
- concentrazione e tipo di polimerasi;
- concentrazione di desossinucleotidi trifosfati;
- tampone di reazione;
- tipo di *primer*;
- numero di cicli di amplificazione,
- parametri dei cicli di amplificazione:
    a) temperatura e tempo di denaturazione,
    b) temperatura e tempo di *annealing* (influenzano la specificità),
    c) temperatura e tempo di estensione (influenzano la specificità).

La scelta dei *primer* è fondamentale, infatti è stato osservato che diverse coppie di *primer*, a parità di specificità, risultavano con una diversa sensibilità, dovuta probabilmente alla configurazione spaziale dei frammenti da amplificare.

Altri fattori determinanti che possono influenzare la reazione e la sua efficienza sono:

1) caratteristiche della sequenza (tipo di sequenza e dimensioni),
2) presenza di impurità nel campione,
3) "mismatches" dei *primer* (appaiamento tra *primer* e templato non ottimale),
4) pericolo di contaminazioni durante il normale processamento del campione (trattamento con vortex delle provette, pipettamento, centrifugazione),
5) variabili "non prevedibili", che di fatto possono essere sempre presenti.

La PCR come metodo diagnostico per brucellosi è stata oggetto di indagini preliminari per un processo di armonizzazione tra i vari istituti che affronteranno lo studio delle aspecificità e discordanze proprio da un punto di vista biomolecolare.

Standardizzazione

La standardizzazione della PCR prevede due aspetti essenziali che possono procedere di pari passo oppure distinguersi:

1. ottimizzazione dei protocolli sui quali esista il consenso di uno o più gruppi di persone incaricate appositamente per la loro applicazione in laboratori diversi,
2. ottimizzazione delle soluzioni e dei reattivi standard da impiegare, che devono essere preparati per avere la massima sensibilità e specificità della reazione; per esempio, le soluzioni tampone possono variare tra lotti diversi nei diversi laboratori e influenzare in modo determinante la reazione, reperirle già pronte diminuisce queste variabili e accelera l'intero processo.

Il problema della standardizzazione si affronta mediante una corretta impostazione di studi multicentrici che permettano di raccogliere dati di importanza fondamentale per lo sviluppo di standard accettabili e di opportuni controlli di qualità: *controlli negativi puri* per rilevare le eventuali contaminazioni durante il processo e *controlli positivi deboli* per verificare la sensibilità della PCR.

La PCR è una reazione di tipo esponenziale in cui anche variazioni minime possono portare a variazioni drammatiche nella quantità di prodotto finale.

I fattori che la condizionano sono molteplici e proprio questo rende particolarmente difficile la sua standardizzazione.

Per raggiungere un buon livello di standardizzazione, qualsiasi laboratorio dovrebbe seguire e attuare le seguenti raccomandazioni:

a) fare estrema attenzione e tutte le precauzioni da prendere per evitare le contaminazioni;
b) utilizzare protocolli collaudati e reagenti standardizzati;

c) utilizzare pannelli di controllo già collaudati per verificare il proprio processo adeguati controlli debolmente positivi e controlli sicuramente negativi, per ogni ciclo di reazioni;
d) aggiornarsi continuamente sugli studi multicentrici che vengono effettuati sull'argomento;
e) procurare le eventuali linee guida ufficiali o standardizzate per migliorare le operazioni;
f) partecipare a corsi teorici e pratici specifici per seguire l'evoluzione tecnologica della PCR.

Ogni processo di standardizzazione avviene attraverso tre fasi:

– *Prima fase o fase conoscitiva e propositiva*
consiste nell'analizzare una serie di campioni positivi e negativi secondo i protocolli in uso nei singoli laboratori partecipanti alla standardizzazione, e successivamente valutare i procedimenti seguiti nei laboratori che hanno ottenuto i risultati migliori;

– *Seconda fase*
analisi di una nuova serie di campioni con un procedimento standard concordato sulla base dei risultati della prima fase;

– *Terza fase*
valutare la sensibilità reale della PCR mediante analisi di campioni non diluiti e diluiti da 1/10 a 1/10000, mediante il procedimento standard affiancato a quello in uso nei singoli laboratori; questa fase può essere effettuata contemporaneamente alla seconda mediante distribuzione dei campioni secondo numeri d'ordine dei campioni assolutamente diversi per ogni laboratorio, a conoscenza soltanto del laboratorio organizzatore.

Protocolli

Non essendoci metodologie ufficializzate per la diagnosi biomolecolare si riportano i protocolli seguiti dall'Istituto Superiore di Sanità, utilizzati nelle indagini preliminari per il processo di standardizzazione, iniziato dai 4 istituti partecipanti al progetto in questione.

PROTOCOLLO GENERALE
Estrazione di DNA genomico da batteri (secondo ISS per identificazione biomolecolare)

Stemperare un'ansata di coltura batterica in Eppendorf da 1,5 mL contenente:
- 467 μL di buffer di lisi TE (10 mM TrisHCl pH 8; 1mM EDTA pH 8),
- 30 μL SDS 10%,
- 3 μL proteinasi K (20 mg/mL).

Mix e incubare 1 h a 37 °C per la digestione.
Aggiungere un ugual volume di fenolo, capovolgere più volte il tubo fino a che le fasi siano omogenee tra loro.
Centrifugare alla max velocità per 15 minuti a +4°C.
Recuperare il sovranatante e trasferirlo ad un nuovo tubo.
Aggiungere un ugual volume di fenolo/cloroformio/alcool isoamilico (25:24:1), mixare e ricentrifugare alla max velocità per 15 minuti a +4°C.
Recuperare il sovranatante, trasferirlo ad un nuovo tubo e precipitare il DNA con 1/10, rispetto al volume iniziale, di sodio acetato (3M pH 5.2) e un volume di isopropanolo.
Lasciare a –20°C overnight.
Centrifugare alla max velocità per 15 minuti a +4°C.
Lavare il pellet di DNA con 500 μL di etanolo al 70%.
Centrifugare alla max velocità per 15 minuti a +4°C.
Recuperare il sovranatante e lasciare asciugare il pellet sotto cappa o in essiccatore (Concentrator 5301 della Eppendorf).
Risospendere il pellet in 50 μL di nucleasi-free water.

Protocollo per differenziare *Brucella* da *Yersinia*

Il protocollo che viene riportato è stato proposto da Lubeck (Lubek *et al.,* 2003).

***Primer* utilizzati**	**Sequenze (5'-3')**
per-12	GCA-GAC-GGG-GGC-AAA-AGT-A
per-14	CAC-CTT-GAT-TTT-TTA-AAT-GGC-AT
bruc-1	CGG-TTT-ATG-TGG-ACT-CTC-TCG
bruc-5	CAG-TAT-TCT-CGT-GTA-GGC-GAA-GTA

La coppia di *primer* per12-per14 discrimina la *Y. enterocolitica* O:9 mentre la coppia bruc1-bruc5 discrimina la *Brucella*. La reazione viene fatta in 2 provette separate perché i prodotti di amplificazione differiscono, come peso molecolare, per soli 10 nucleotidi. Ciò non rende distinguibili le due bande con elettroforesi su gel.

PCR

Preparazione della mix
(secondo la procedura consigliata dalla ditta produttrice del kit)

PCR Buffer 10x		5 μL
$MgCl_2$ solution (25 mM)		5 μL
dNTP mix (10 mM)		1 μL
Taq polymerase (5 U/μL)		0,5 μL
Primer	per12 - per14	
	oppure bruc1 - bruc5 (25 pmoli/μL ciascuno)	2 μL (1 μL ciascuno)
DNA per μL		circa 1 μg
Acqua quanto basta per ottenere un volume totale di		50 μL

Condizioni di amplificazione

1 ciclo	94 °C per 5 minuti
35 cicli	94 °C per 30 secondi
	52 °C per 30 secondi
	72 °C per 50 secondi
1 ciclo	72 °C per 7 minuti

Protocollo AMOS per identificazione *Brucella*

Il protocollo che viene riportato è stato proposto da Bricker & Halling nel 1994 (Bricker & Halling, 1994).

***Primer* utilizzati AMOS**	**Sequenze (5'-3')**
B.abortus-specific *primer*	GAC-GAA-CGG-AAT-TTT-TCC-AAT-CCC
B.melitensis-specific *primer*	AAA-TCG-CGT-CCT-TGC-TGG-TCT-GA
B.ovis-specific *primer*	CGG-GTT-CTG-GCA-CCA-TCG-TCG
B.suis-specific *primer*	GCG-CGG-TTT-TCT-GAA-GGT-TCA-GG
IS711-specific *primer*	TGC-CGA-TCA-CTT-AAG-GGC-CTT-CAT

PCR

Preparazione della mix
(secondo la procedura consigliata dalla ditta produttrice del kit)

PCR Buffer 10x	5 μL
$MgCl_2$ solution (25 mM)	5 μL
dNTP mix (10 mM)	1 μL
Taq polymerase (5 U/μL)	0,5 μL
Primer AMOS (25 pmoli/μL ciascuno)	5 μL (1 μL ciascuno)
DNA estratto per μL	circa 1 μg
Acqua quanto basta per ottenere un volume totale di	50 μL

Condizioni di amplificazione

1 ciclo	94°C per 5 minuti
35 cicli	94°C per 1 minuto e 15 secondi
	55°C per 2 minuti
	72°C per 2 minuti
1ciclo	72°C per 7minuti

SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ DELLE PRINCIPALI TECNICHE DIAGNOSTICHE PER LA DIAGNOSI DI BRUCELLOSI

Nelle Tabelle 4-6 sono riportati alcuni quadri, ripresi da lavori scientifici in bibliografia, in cui sono raccolti dati di correlazione e/o comparazioni delle sensibilità e specificità delle tecniche nominate nell'ambito della strategia di studio delle aspecificità e discordanze sierodiagnostiche.

Tabella 4. Sensibilità diagnostica delle principali tecniche sierologiche in relazione alle varie sottoclassi di immunoglobuline (Ciuchini, 2001)

Classe	MRT	SAL	RBPT	F.d.C	ELISA
IgG_1	- *	-	+	+	+
IgG_2	-	+	-	-	+
IgM		++	±	±	+
IgA	+	+ **		-	+

* possono disturbare gli altri anticorpi
** polimeriche.

Tabella 5. Sensibilità, specificità e indice di *performance* dei principali sierologici per brucellosi (Nielsen, 2002)

Test	Sensibilità	Specificità	Indice *performance*	Riferimenti bibliografici
SAT	29,1-100	99,2-100	129,1-200	Van Aert *et al.*, 1984 Lord *et al.*, 1989
RBPT	21,0-98,3	68,8-100	121,0-193,9	Van Aert *et al.*, 1984 Samartino *et al.*,1999
2ME	56,2-100	99,8-100	156,2-200	Stemshorn *et al.*, 1985 Saravi *et al.*, 1995
FdC-mi	23,0-97,1	30,6-100	123,0-197,5	Huber & Nicoletti, 1986 Van Aert *et al.*, 1984 Saravi *et al.*, 1995
ELISA	92,5-100	90,6-100	190,9-200	Dohoo *et al.*,1986 Rojas & Alonso, 1994
ELISAc.	97,5-100	99,7-99,8	197,3-199,8	Samartino *et al.*,1999 Nielsen & Gall, 2001
FPA	99,0-99,3	96,9-100	195,9-199,3	Dajer *et al.*,1999 Nielsen & Gall, 2001

Le valutazioni della sensibilità e specificità sono state presentate come range percentuale tra il peggiore e il migliore risultato recepito dalla letteratura citata.
I valori più bassi sono quelli calcolati in raffronto con altri test sierologici, mentre quelli più alti sono quelli ottenuti con sieri di bovini positivi all'esame colturale, o infettati sperimentalmente. L'indice *performance* è dato dalla somma delle percentuali di sensibilità e specificità.

Tabella 6. Diagnosi differenziale della brucellosi e delle reazioni falsamente positive (Pouillot, 1999)

Clinica	Falsi positivi	Infezione brucellare	
		Inizio infezione	Infezione manifesta
	neg.	*niente fino all'aborto e/o all'orchite*	*aborto e/o all'orchite*
Esami sierologici			
RBPT pos./FdC-mi pos	++	+	+++
RBPT pos./FdC-mi neg	++	++	+
SAL pos.	++	++	++
ELISA pos	+++	+++	+++
Brucellina +	-	++	++
MRT +	-	++	++
Esami batteriologici			
Brucella	-	±	+
Yersinia	±	±	±
Profilo sierologico			
aumento dei titoli	±	+++	++
sieronegativizzazione	+++	± (periodo intorno all'aborto, animali giovani)	±
Profilo epidemiologico			
Introduzione	*?*		
Età degli animali	*giovani:*++	acquisti,ricomparsa, in genere vicinanza di animali puberi, soprattutto se vecchi.	
Numero dei casi	*1 o 2 casi:*+++	alcuni casi	>10%
Forma epidemiol.	*sporadica*	a volte enzootica	spesso epizootica

- estremamente rara; **±** rara; **+** piuttosto frequente; **++** frequente; **+++** molto frequente

Tabella 7. Isolamento di *Brucella* spp. con differenti metodi (Leal-Klevezas *et al*., 1995)

Gruppo capre	Numero campioni			N. campioni positivi PCR su totale n. campioni	
	totale	*sieropositivi*	*isolamento-positivo*	*latte*	*sangue*
I	22	14	1	11/17	19/22
II	15	0	0	NT	2
III	3	3	3	3	3
Capre infette sperimentalmente	3	3	3	3	3
Pazienti umani	3	3	3	3	3

NT= non testato

Tabella 8. Confronto di risultati di PCR e esame batteriologico (Gallien *et al.,* 1998)

Bovino	Utero		Polmone		Milza		Linfonodi		Rene		Fegato	
	EB	PCR	EB	PCR	EB	PCR	EB	PCR	EB	PCR	EB	PCR
A	+	+	-	(+)	+	+	+	+	-	(+)	-	(+)
B	+	+	+	+	-	(+)	+	+	-	(+)	+	+
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

EB: esame batteriologico; **+** positivo, **-** negativo, **(+)** debolmente positivo

BIBLIOGRAFIA

Adone R, Ciuchini F, Lillini E, Cerri D, Andreani E. Isolamento di *B.melitensis* biovar 1 da campioni di latte di bufali sieropositivi. *Selezione Veterinaria* 1998;2:77-83.

Adone R, Ciuchini F. Complement fixation test to asses humoral immunità in cattle and sheep vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1999;6(6):787-90.

Adone R, Ciuchini F, Pistoia C, Piccininno G. Uso del gamma-interferon test per il rilievo della risposta cellulo-mediata indotta nei bovini da ceppi di *Brucella* spp. *Selezione Veterinaria* 2000;supplemento:225-32.

Adone R, Ciuchini F. *Brucella abortus* RB51 and hot saline extract from *Brucella ovis* as antigens in a complement fixation test used to detect sheep vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2001a;8(1):119-22.

Adone R, Ciuchini F, La Rosa G, Marianelli C, Muscillo M. Use of polymerase chain reaction to identify *Brucella abortus* strain RB51 among *Brucella* field isolates from cattle in Italy. *Journal Veterinary Medicine* B 2001b;48: 107-13.

Adone R, Ciuchini F, Olsen SC. Field validation of the use of RB51 as antigen in a complement fixation test to identify calves vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2001c;8(2):385-87.

Adone R, Pasquali P, Ciuchini F. La reazione di fissazione del complemento per il rilievo degli anticorpi specifici anti-RB51 in bovini e bufali. Uso del vaccino RB-51 come antigene omologo estemporaneo. *Summa* 2004;8:47-53.

Al Dahouk S, Tomaso H, Noekler K, Neubauer H. The detection of *Brucella* spp. using PCR-ELISA and real-time PCR assays. *Clinical Laboratory* 2004;50(7-8):387-94.

Alton GG. *Brucella melitensis*. In: Nielsen K, Duncan JR (Ed.). *Animal brucellosis*. Boca Raton: CRC Press; 1990. p. 383-409.

Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris: INRA Editions; 1988.

Bajani Ari MD, Bragg SL, Plikaytis B, Levett PN. Evaluation of IgM and IgG ELISA and IgM dipstick assays for serodiagnosis of brucellosis. *International Conference on Emerging Infections Diseases*. February 29-March 3, Atlanta, Georgia, USA; 2004.

Baldi PC, Giambartolomei GH, Goldbaun FA, Abdon LF, Velikovsky CA, Kittelberg R, Fossati CA. Humoral immune response against lipopolysaccharide and cytoplasmic proteins of *Brucella abortus* in cattle vaccinated with *B.abortus* S19 or experimentally infected with *Yersinia enterocolitica* serotype O:9. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1996;3(4):472-6.

Bianchifiori F, Garrido F, Nielsen K, Moscati L, Duran M, Gall D. Assessment of a monoclonal antibody-based competitive enzyme linked immunosorbent assay (cELISA) for diagnosis of brucellosis in infected and Rev 1 vaccinated sheep and goats. *Microbiologia* 2000;23:399-406.

Benet JJ, Massard C, Garin-Bastuji B, Mouton F, Dufour B, Zymunt MS, Schaeffer S, Coton T. Réaction sérologique atypiques dans le dèpistage de la brucellose bovina: Enquéte épidèmiologique dans les departments concernès, *Epidèmiologie et Santé Animale* 1991;19:97-130.

Blasco JM. *Brucella ovis*. In: Nielsen K, Duncan JR (Ed.). *Animal brucellosis*. Boca Raton: CRC Press; 1990. p. 351-78.

Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1,2 and 4, *Brucella melitensis, Brucella ovis* and *Brucella suis* biovar 1 PCR. *Journal Clinical Microbiology* 1994;32:2660-6.

Bricker BJ, Halling SM. Enhancement of the AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strain S19 and RB51. *Journal Clinical Microbiology* 1995;33:1640-42.

Bricker B. Diagnostic strategies used for the identification of Brucella. *Veterinary Microbiology* 2002a;90:433-4.

Bricker BJ. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary Microbiology* 2002b;90:435-46.

Bricker BJ, Ewalt DR, Olsen SC, Jensen AE. Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2003;15(4):374-8.

Cerri D, Ebani VV. Innocenti E, Andreani E. Reazioni crociate nella diagnostica sierologica della brucellosi da *Brucella ovis*. *Summa* 2000;1:17-18.

Chukwu CC. Serological investigation on cattle vaccinated with a killed *Brucella abortus* strain 45/20 adiuvant vaccine. *Inernational Journal Zoonoses* 1985;12:14-21.

Ciuchini F, Adone R. La sorveglianza dell'uniformità degli antigeni "unici" nazionali utilizzati nelle reazioni sierodiagnostiche per le brucellosi animali. *Atti Società Italiana Scienze Veterinarie* 1997;51: 297-8.

Ciuchini F, Adone R, Lillini E, Gamberane F, Volpi E. Confronto fra la reazione di fissazione del complemento e il metodo immunoenzimatico per il dosaggio del gamma-interferon nella diagnosi di brucellosi bovina. *Atti Società Italiana Scienze Veterinarie* 1998;52:197-8.

Ciuchini F, Pasquali P, Francia M, Adone R. Reattività sierologiche ed ipersensibilità ritardata in ovini vaccinati sperimentalmente con *Brucella abortus* RB51. *Atti XIV Congresso Nazionale Società Italiana Patologia ed Allevamento Ovini e Caprini* 2000. p. 105-8.

Ciuchini F. In: De Felip G (Ed.). *Recenti sviluppi di igiene e microbiologia degli alimenti.* Milano: Edizione Tecniche Nuove; 2001. p. 571-603.

Ciuchini F, Adone R, Pasquali P. Coombs antiglobulin test using *Brucella abortus* 99 as antigen to detect incomplet antibodies induced by *B.abortus* RB51. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2002;9(6):1398-99.

Ciuchini F, Farina R (Ed.). *1° progetto di standardizzazione delle tecniche sierologiche per la diagnosi delle brucellosi animali: siero-agglutinazione rapida con antigene al rosa bengala (SAR-Ag:RB), siero-agglutinazione lenta in micrometodo (SAL-mi),fissazione del complemento (F.d.C.-mi).* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1991. (Rapporto ISTISAN 91/16).

Ciuchini F, Adone R, Picotto P (Ed.). *Monitoraggio della reazione di sieroagglutinazione rapida con antigene al rosa bengala (SAR-Ag:RB) e della reazione di fissazione del complemento miniaturizzata (F.d.C.-mi).* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1997. (Rapporti ISTISAN 97/7).

Cloeckaert A, Kerkhofs P, Limet JN. Antibody response to *Brucella* outer membrane proteins in bovine brucellosis: immunoblot analysis and competitive enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *Journal Clinical Microbiology* 1992;30(12):3168-74.

Corbel MJ. The serological relationship between *Brucella* spp, *Yersinia enterocolitica* serotype IX and *Salmonella* serotypes of Kaufmann-White group N. *Journal Hygiene Cambridge* 1975;75:151-71.

Corbel MJ. Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reactions. *Veterinary Bulletin* 1985;55:927-42.

Corbel MJ, Stuart FA, Brewer RA. Observations on serological cross-reaction between smooth *Brucella* species and organisms of other genera. *Developments in Biological Standardization* 1984;56:341-8.

Corrente M, Conserva A, Cirone F, Scaltrito D, Consenti B, Buonavoglia C. Diagnosi sierologia di brucellosi negli ovini: valutazione della cross-reattività di *Yersinia enterocolitica* O:9. *Atti XII Congresso Nazionale Società Italiana Patologia ed Allevamento Ovini e Caprini* 1996. p. 114-9.

Corrente M, Desario C, Greco G, Buonavoglia D, Pratelli A, Madio A, Scaltrito D, Consenti B, Buonavoglia C. Development of a western blotting assay to discriminate *Brucella* spp. and *Yersinia enterocolitica* O:9 infections in sheep. *New Microbiologica* 2004;27(2):155-61.

Italia. Decreto legislativo 2 luglio 1992, n.453. Regolamento concernente il piano nazionale per la eradicazione della brucellosi negli allevamenti ovini e caprini. *Gazzetta Ufficiale* n. 276, 23 novembre 1992.

Italia. Decreto legislativo 10 novembre 1992. Produzione, acquisto e distribuzione dell'antigene di brucella tamponato (SAR) e dell'antigene per l'effettuazione della fissazione del complemento ai fini delle diagnosi della brucellosi ovi-caprina. *Gazzetta Ufficiale* n. 277, 24 novembre 1992.

Italia. Decreto legislativo 27 agosto 1994 n.651. Regolamento concernente il piano nazionale per la eradicazione della brucellosi negli allevamenti bovini. *Gazzetta Ufficiale* n. 22, 6 novembre 1994.

Italia. Decreto legislativo 4 ottobre 1999. Centri di referenza nazionali nel settore veterinario. *Gazzetta Ufficiale* n. 300, 23 dicembre 1999.

Delpino VM, Fossati CA, Baldi PC. Occurence and potential diagnostic applications of serological cross-reactivities between *Brucella* and other alpha-proteobacteria. *Clinical and Diagnostic Laboratori Immunology* 2004;11(5): 868-73.

CEE. Direttive Comunitarie del Consiglio: 90/425/CEE del 26 giugno 1990; 91/496/CEE del 15 luglio 1991; 97/12/CEE del 17 marzo 1997 che modificano e aggiornano la direttive 64/432/CEE relativa a problemi di polizia sanitaria in materia di scambi intracomunitari di animali delle specie bovina e suina.

Dondo A, Grattarola C, Gennero S, Zoppi S, Di Giannatale E. Osservazioni preliminari sulla presenza di *Brucella suis* biovar 1 nel cinghiale in Piemonte. *Il Progresso veterinario* 2003;58(3).

Drancourt M, Brouqui P, Raoult D. *Afipia clevelandensis* antibodies and cross-reactivity with *Brucella* spp and *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunological* 1996;3(4):472-6.

Duran-Ferrer M, Leon L, Nielsen K, Caporale V, Mendoza J, Osuna A, Perales A, Smith P, De-Frutos C, Gomez-Martin B, Lucas A, Chico R, Delgado OD, Escabias JC, Arrogante L, Diaz-Parra R, Garrido F. Antibody response and antigen-specific gamma-interferon profiles of vaccinated and unvaccinated pregnant sheep experimentally infected with *Brucella melitensis*. *Veterinary Microbiology* 2004;100(3-4):219-31.

Edmonds MD, Schurig GG, Samartino LE, Hoyt PG, Walker JV, Hagius SD, Elzer PH. Biosafety of *Brucella abortus* strain RB51 for vaccination of mature bulls and pregnant heifers. *American Journal Veterinary Research* 1999;60: 722-5.

Elfaki MG, Uz-Zaman T, Al-Hokail AA, Al-Rabiah FA, Nakeeb SM, MacMillan AP, Cutler SA. Detection of *Brucella* DNA in sera from patients with brucellosis by polymerase chain reaction method. *International Conference on Emerging Infections Diseases,* Atlanta, Georgia, USA, 2004.

Emmerzaal A, de Wit JJ, Dijkstra T, Bakker D, van Zijderveld FG. The dutch *Brucella abortus* monitoring programme for cattle: the impact of false-positive serological reactions and comparison of serological tests, *Veterinary Quarterly* 2002;24(1):40-6.

Erdenebaatar J, Bayarsaikhan B, Watarai M, Makino S, Shirahata T. Enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate the antibody responses of animals infected with *Brucella* specie from those of animals infected with *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clinical and Diagnosic Laboratory Immunology* 2003;10(4):710-4.

Farina R, Ciuchini F, Cerri D, Nuvolosi R, Pedrini A, Marni P, Adone R, Andreani E. ELISA competitiva nella diagnosi della brucellosi ovina. *Atti XLIX della Società Italiana delle Scienze Veterinarie* 1995. p 653-4.

Farina R, Scatozza F. *Malattie infettive degli animali.* Torino: UTET; 1998.

Ferriera AC, Cardoso R, Travassos Dias I, Mariano I, Belo A, Rolao Preto I, Manteigas A, Pina Fonseca A, Correa De Sa MI. Evaluation of a modified rose bengal test and an in direct enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Veterinary Research* 2003;34(3):297-305.

Ferroni C. Le reazioni sierologiche aspecifiche nella diagnosi della brucellosis bovina. *L'Osservatorio dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna* 2004;7(6):10-12.

Gall D, Nielsen K, Forbes L, Davis D, Elzer P, Olsen SC, Balsevicius S, Kelly L, Smith P, Tan S, Joly D. Validation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assay for the detection of serum antibody to *Brucella abortus* in bison. *Journal Wildlife Diseases* 2000;36:469-76.

Gallien P, Dorn C, Alban G, Staak C, Protz D. Detection of *Brucella* species in organs of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. *Veterinary record* 1998;142:512-514.

Garin-Bastuji B. Le dépistage de la brucellose des ruminants et ses difficultès. Le cas des sèrologics atypiques en brucellosi bovine. *Le Point Veterinaire* 1993 ;28:375-83.

Garin-Bastuji B, Dufour B. Acquis de la recherche sur les reactions serologiques non specifiques en brucellose, *Colloque national du 11 janvier 1995, organisé par la Direction général de l'alimentation (DGAL), le Centre national d'études vétérinaires (CNEVA) et la Fédération nationale groupements de défense sanitaire du bétail (FNGDSB),* France, 1995.

Garin-Bastuji B, Hummel N, Gerbier G, Cau C, Pouillot R, Da Costa M, Fontane JJ. Non specific serological reactions in the diagnosis of bovine brucellosis: experimental oral infection of cattle with repeated doses of *Yersinia enterocolitica* O:9. *Veterinary Microbiology* 1999;66:223-33.

Gennero MS, Crattarola C, Zopi S, Giannatale E, Dondo A. Brucellosis in wild boars in the Piedmont Region. *Epidemiologie et Santé Animale* 2004 ;45 :77-9.

Gerbier G, Garin-Bastuji B, Pouillot R, Da Costa P, Very P, Kummel N, Cau C, Dufour B, Moutou F. Gamma –interferon EIA in bovine brucellosis diagnosis as a tool to differentiate *Brucella* and *Yersinia enterocolitica* O:9 infection. *Proceedings of the 15th International Symposium W.A.M.I., Salmonellosi-Brucellosi,* Cyprus,16-21 February, 1997a.

Gerbier G, Garin-Bastuji B, Pouillot R, Vèry P, Cau C, Berr V, Dufour B, Moutou F. False positive serological reactions in bovine brucellosis: evidence of the role of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 in a field trial, *Veterinary Record* 1997b;28:375-83.

Godfroid J. Brucellosis in wildlife. *Revue Scientifique et Techniques*. *Office. International des Epizooties* 2002;21:277-86.

Godfroid J, Saegerman C, Wellemans V, Walravens K, Letesson JJ, Tibor A, Mc Millan A, Spencer S, Sanna M, Bakker D, Pouillot R, Garin-Bastuji B. How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. *Veterinary Microbiology* 2002;90:461-77.

Gourdon F, Beytout J, Reynaud A, Romaszko JP, Perre D, Theodore P, Soubelet H, Sirot J. Human and animal epidemic of *Yersinia enterocolitica* O:9,1989-1997, Auvergne, France. *Emerging Infectious Diseases* 2000;5(5):1-4.

Johnson RP, Boag L, Anderson S, Holtslander R, Rahn K, Clarke RC, Renwick SA, Alves D, Wilson JB, Spika J. *Brucella abortus* serology in cattle naturally infected with *Escherichia coli* O 157.H7. *Veterinary Record* 1994;135:382-83.

Kittelberger R, Hilbink F, Hansen MF, Penrose M, de Lisle GW, Letesson JJ, Garin-Bastuji B, Searson J, Fossati CA, Cloeckaert A, Schurig G. Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9. Immunoblot analysis of the antibody response to *Brucella* protein antigens in bovine brucellosis. *Veterinary Microbiology* 1995a;47:257-70.

Kittelberger R, Hilbink F, Hansen MF, Ross GP, Joyce MA, Fenwick S, Heesemann Wolf-Watz H, Nielsen K. Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9. II

The use of *Yersinia* outer proteins for the specific detection of *Yersinia enterocolitica* infections ruminants. *Veterinary Microbiology* 1995b;47:271-80.

Kittelberger R, Reichel MP, Joyce MA, Staak C. Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9, III. Speciificity of the in vitro antigen-specific gamma interferon test for bovine brucellosis diagnosis in experimentally *Yersinia enterocolitica* O:9- infected cattle. *Veterinary Microbiology* 1997;57(4):361-71.

Kittelberger R, Reichel MP, Joyce MA, Staak C. Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9. IV Evaluation of the M- and C-epitope antibody response for the specific detection of *B.abortus* infection. *Veterinary Microbiology* 1998;60(1):45-57.

Kohanteb J, Ardehali S. Cross-reaction of sera from patients with various infections diseases with *Leishmania infantum*. *Medical Principles and Practice* 2005;14:79-82.

Lavazza A, Macchi C. Malattie degli animali selvatici. *L'Osservatorio,* Editore Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Anno 3-n.1, p 9-11, febbraio 2000.

Leal-Klevezas DS, Martìnez-Vàzquez IO, Lòpez-Merino A, Martìnez-Soriano JP. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp from blood and milk of infected animals. *Journal of Clinical Microbiology* 1995;33(12):3087-90.

Lillini E, Adone R, Ciuchini F, Condoleo RU, Miliari R. *Yersinia enterocolitica* O:9 responsabile di reazioni sierologiche atipiche nella diagnosi di brucellosi bovina. *Atti Società Italiana Scienze Veterinarie* 1998;52: 201-202.

Lubeck PS, Skurnik M, Ahrens P, Hoorfar J. A multiplex PCR-detection assay for *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 and *Brucella* spp. based on the perosamine synthetase gene. Application to *Brucella* diagnostics. *Advance Experimantal Medicineand Biology* 2003;529:451-3.

Mac Millan A. Conventional serological tests, in *Animal Brucellosis*, editors Klaus Nielsen and J. Robert Duncan, by CRP Press, Boca Raton Ann Arbor Boston, United States; 1990. p. 153-97.

Marchevsky N, Held JR, Garcia-Carrillo C. Probability of introducing diseases because of false negative test results, *American Journal of Epidemiology* 1989;130(3):611-14.

Maurin M. La brucellose a l'aube du 21e siecle. *Medecine et maladies infectieuses* 2005;35(1):6-16.

Marìn CM., Moreno E, Moriyòn R, Diaz R, Blasco JM. Performance of competitive and in direct enzyme-linked immunosorbent assay, gel immunoprecipitation with native hapten polysaccharide, and standard serological tests in diagnosis of sheep brucellosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1999 ;6:269-72.

McGiven JA, Tucker JD, Perrett LL, Stack JA, Brew SD, MacMillan A. Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT and iELISA. *Journal of Immunological Methods* 2003 ;278:171-8.

Morata P, Queipo-Ortuno MI, Reguera JM, Garcìa-Ordonez Càrdenas A, Colmenero JD. Development and evaluation of a PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human brucellosis, *Journal of Clinical Microbiology* 2003;41(1):144-8.

Muñoz PM, Marin CM, Monreal D, Gonzàles D, Garin-Bastuji B, Diaz R, Mainar-Jaime RC, Moriyon I, Blasco JM. Efficacy of several serological tests and antigens for diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false-positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2005;12(1):141-51.

Nannini D, Giovannini A, Caporale V. Riflessioni sul controllo e l'eradicazione della brucellosi bovina, *Veterinaria Italiana* 1992;28(6):12-5.

Nannini D, Tittarelli M, Ricci L, Conte A, Di Emidio B, Giovannini A, Caporale V. Model proficiency testing scheme for serological diagnosis of brucellosis: interlaboratory study. *Journal of* AOAC *International* 2004;87(4):965-71.

Nielsen K, Cherwonogrodsky J, Duncan R, Bundle D. Enzyme immunoassay for the differentiation of antibody response of *Brucella abortus* infected and vaccinated cattle. *American. Journal Veterinary Research* 1989;50:5-9.

Nielsen K, Ducan JR. *Animal brucellosis*. Boca Raton Florida: CRC Press; 1990.

Nielsen K. The serological response of cattle immunized with *Yersinia enterocolitica* O:9 or O:16 to *Yersinia* and *Brucella abortus* antigens in enzyme immunoassay. *Veterinary Immunological Immunopathology* 1990;24:373-82.

Nielsen K, Kelly L, Gall D, Smith P, Bosse J, Nicoletti P, Kelly W. The use of divalent cation chelating agents (EDTA/EGTA) to reduce non-specific interaction in enzyme immunoassay. *Veterinary Research Communication* 1994;18:437-43.

Nielsen K, Kelly L, Gall D, Nicoletti P, Kelly W. Improved C-ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis. *Veterinary Immunological Immunopathology* 1995;48:285-95.

Nielsen K, Kelly L, Mallory M. Standardization of smooth lipopolysaccharide preparations for use in diagnostic serological tests for bovine antibody *Brucella abortus*. *Journal Immunoassay* 1998;19(4):239-50.

Nielsen K, Lin M, Gall D, Jolley M. Fluorescence polarization immunoassay: detection of antibody to *Brucella abortus*. *Methods* 2000;22:71-6.

Nielsen K, Gall D. Fluoroscence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: a review. *Journal Immunoassay* 2001;22:183-201.

Nielsen K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary Microbiology* 2002;90:447-59.

Nielsen K, Smith P, Draghi de Benitez G, Gall D, Halbert G, Kenny K. Rough lipopolysaccharide of *Brucella abortus* RB51 as a common antigen for serological detection of *B.ovis, B.canis* and *B.abortus* RB51 exposure using indirect enzyme immunoassay and fluorescence polarization. *Journal Immunoassay Immunochemical* 2004;25(2):171-82.

Nielsen K, Smith P, Widdison J, Gall D, Kelly L, Kelly W, Nicoletti P. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. *Veterinary Microbiology* 2004;100 (1-2):25-30.

OIE. Bovine brucellosis. Chapter 2.3.1. In: *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. 5th edition. Paris: Office International des Epizooties; 2004a.

OIE. Caprine and ovine brucellosis. Chapter 2.4.2. In: *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. 5th edition. Paris: Office International des Epizooties; 2004b.

OIE. Ovine epididymitis. Chapter 2.4.1. In: *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. 5th edition. Paris: Office International des Epizooties; 2004c.

OIE. Porcine brucellosis. Chapter 2.6.4. In: *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. 5th edition. Paris: Office International des Epizooties; 2004d.

OIE. Principles of validation of diagnostic assay for infection diseases. Chapter I.1.3. In: *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. 5th edition. Paris: Office International des Epizooties; 2004e.

Olsen SC, Stevens MG, Che ville NF, Schurig GG. Experimental use of a dot blot assay to measure serologic responses of cattle vaccinated with Brucella abortus strain RB-51 vaccine in pregnant cattle. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation* 1997;9:363-4.

Paganico G, Bashiruddin JB, Biancifiori F, Nannini D. Sviluppo e applicazione della PCR per la diagnosi diretta di brucellosi bovina e ovi-caprina. *Veterinaria Italiana* 1996; Anno XXXII-N.22.

Pasquali P, Adone R, Gasbarre LC, Pistoia C, Ciuchini F. Mouse Cytokine Profiles Associated with *Brucella abortus* RB51 Vaccination or *B.abortus* 2308 Infection. *Infection and Immunity* 2001;69(10):6541-44.

Pizzoni E. Indagini sul dosaggio delle classi di immunoglobuline nei sieri bovini in caso di esiti sierologici discordanti per brucellosi. *Veterinaria Italiana* 1997;33(26):32-6.

Poli G, Cocilovo A. *Microbiologia e immunologia veterinaria.* Torino: UTET; 1996.

Pouillot R, Lescoat P, Garin-Batuji B, Repiquet D, Terrier P, Gerbier G, Benet JJ, Sanaa M. Risk factors for false positive serological reactions for bovine brucellosis in Saone-et-Loire (France). *Preventive Veterinary Medicine* 1998;35(3):165-79.

Pouillot R, Garin-Batuji B, Gerbier G, Coche Y, Cau C, Dufour B, Moutou F. The brucellin skin test as a tool to discriminate false positive serological reactions in bovine brucellosis. *Veterinary Research* 1997;28(4):365-74.

Pouillot R, Garin-Batuji B, Dufour B. Diagnosi di brucellosis bovina. Alcune chiavi di lettura in un contesto di reazioni sierologiche falsamente positive. *Summa* 1999; n°2:35-40.

Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, Bystrom SL, Graves MH. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp, *B.abortus* and *B.melitensis*. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42:1290-3.

CEE. Regolamento (CE) N.535/2002 della Commissione del 21/3/2002 che modifica l'allegato C della direttiva 64/432/CEE del Consiglio e la decisione 2000/330/CE. G*azzetta Ufficiale delle Comunità europee L.80/22,l* 23 aprile 2002.

Reynaud A, Del mas C, Vidon JM, Marty-Garrec M, Dubourdieu V. Presence of *Yersinia enterocolitica* O:9 in fecal samples of Brucella abortus ruminants revealing atypical serological reactions against antigens. *Medecine et Maladies Infectieuses* 1993;23:516-9.

Saegerman C, Vo T-K.O, De Waele L, Gilson D, Bastin A, Dubray G, Flanagan P, Limet JN, Letesson JJ, Godfroid J. Diagnosis of brucellosis by Skin test: condition for the test and evaluation of its performance. *Veterinary Record* 1999;21:214-8.

Schurig GG, Roop RM, Bagchi HT, Boyle S, Buhrman D, Sriranganathan N. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Veterinary Microbiology* 1991;28:171-88.

Shoerner C, Wartenberg K, Rollinghoff M. Differentiation of serological responses to *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 and *Brucella* Species by immunoblot or enzyme-linked immunosorbent assay using whole bacteria and *Yersinia* outer membrane proteins. *Journal Clinical Microbiology* 1990;28(7):1570-74.

Silva P, Vigliocco A, Ramondino R, Marticorena D, Bissi E, Briones G, Gorch C, Gall D, Nielsen K. Evaluation of primari binding assays for presumptive serodiagnosis of swine brucellosis in Argentina. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2000;7:828-31.

Staack C, Draeger A, Bahn P, Nockler K. Contribution to the differentiation of cross-reacting antibodies in brucellosis serology. 1. Reaction with various *Yersinia* serotypes and antibody avidity. *Berliner Munchener Tierarztlliche Wochenschrift* 2000;113(10):361-7.

Stevens MG, Olsen SC, Cheville N. Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. *Veterinary Immunology Immunopathology* 1995;44:223-35.

Stuart FA, Corbel MJ. Identification of a serological cross-reaction between *Brucella abortus* and *Escherichia coli* O:157. *Veterinary Record* 1982;110:202-3.

Vrioni G, Gartzonika C, Kostoula A, Boboyianni C, Papadopoulou C, Levidiotou S. Application of a polymerase chain reaction enzyme immunoassay in peripheral whole blood and serum specie for diagnosis of acute human brucellosis. *Euopean Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases* 2004;19:35-41.

Weynants V, Godfroid J, Limbourg B, Saegerman C, Letesson J. Specific bovine brucellosis diagnosis based on in vitro antigen-specific gamma interferon production. *Journal Clinical Microbiology* 1995;33:706-12.

Weynants V, Tibor A, Denoel PA, Saergerman C, Godfroid J, Thiange P, Letesson JJ. Infection of cattle with *Yersinia enterocolitica* O:9 a cause of the false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic tests. *Veterinary Microbiology* 1996;48(1-2): 101-12.

Zanardi G, Bignazzi R, Merli S, Orsi F, Bertoletti I. Su due casi di positività sierologia per brucellosi bovina in provincia di Sondrio. *L'Osservatorio dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna* 2003;6(4):8-10.

Zerva L, Bourantas K, Mitka S, Kansouzidou A, Legakis NJ. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2001;39(4):1661-64.

La riproduzione parziale o totale dei Rapporti *e* Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.

Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma

Roma, settembre 2005 (n. 3) 9° Suppl.