

CONFRONTO TRA I TEST MAT ED ELISA INDIRETTA IMPIEGATI NELLA DIAGNOSI SIEROLOGICA DELLA LEPTOSPIROSI DA *LEPTOSPIRA HARDJO* IN BOVINI E OVINI

COMPARISON OF MAT AND INDIRECT ELISA EMPLOYED IN SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF LEPTOSPIROSIS BY *LEPTOSPIRA HARDJO* IN CATTLE AND SHEEP

PAOLO PINZAUTI ⁽¹⁾, FILIPPO FRATINI ⁽²⁾, MASSIMILIANO AMPOLA ⁽³⁾,
VALENTINA V. EBANI ⁽¹⁾, ERNESTO ANDREANI ⁽¹⁾

RIASSUNTO

Il presente studio ha messo a confronto i risultati ottenuti con la MAT e un kit ELISA indiretta presente in commercio, testando 103 sieri bovini e 91 ovini per la ricerca di anticorpi verso *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. Due sieri bovini, usati come controlli positivi, sono risultati positivi sia alla MAT che al test ELISA, mentre i rimanenti 101 campioni hanno fornito esito negativo con entrambi i test. Tra i sieri ovini i 10 impiegati come controlli negativi, sono risultati tali a MAT ed ELISA, i 3 controlli positivi hanno fornito risposte positive a entrambi i test. Tra i rimanenti 78 sieri ovini testati, 54 (69,23%) sono risultati positivi con la MAT a titoli anticorpali compresi tra 1:100 e 1:1600, mentre i rimanenti 24 (30,77%) hanno dato esito negativo. Con il test ELISA gli stessi sieri hanno fornito 60 (76,92%) risposte positive e 18 (23,08%) negative. Mettendo a confronto i risultati ottenuti, mediante MAT ed ELISA, con i 78 sieri di campo ovini il valore di concordanza tra i due test è risultato del 79,48%. Sebbene l'ELISA abbia fornito risultati soddisfacenti, potendo essa testare i sieri per una sola sierovariante alla volta, non può sostituirsi alla MAT che rimane il *gold standard* della diagnosi sierologica.

Parole chiave: leptospirosi, *hardjo*, microagglutinazione, ELISA, bovini, ovini

SUMMARY

The present study compared the results obtained by MAT and a commercial indirect ELISA kit testing 103 bovine and 91 ovine sera to detect antibodies against *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. Two bovine positive control resulted positive with MAT and ELISA, whereas the remaining 101 sera scored negative with both tests. Ten ovine negative and 3 positive controls resulted respectively negative and positive to both tests. Among the remaining 78 ovine sera, 24 (30.77%) scored MAT negative and 54 (69.23%) positive with antibody titres from 1:100 to 1:1600, whereas 18 (23.08%) resulted negative with ELISA and 60 (76.92%) positive. Comparing the results of MAT and ELISA, a concordance value of 79.48% was obtained. Even if ELISA gave satisfactory results, this test can not replace the MAT which represents the gold standard for the serological diagnosis.

Key words: leptospirosis, *hardjo*, microagglutinations test, ELISA, cattle, sheep.

⁽¹⁾ Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Direttore Prof. Giovanni Braca.

⁽²⁾ Titolare di Borsa di Studio.

⁽³⁾ Dottorando in Produzioni animali, sanità ed igiene degli alimenti nei paesi a clima mediterraneo, Anno 2005.

INTRODUZIONE

La leptospirosi dei ruminanti domestici è una malattia infettiva diffusa a livello mondiale, con particolare incidenza nei Paesi dove gli allevamenti ovini e bovini sono largamente presenti.

Anche in Italia sono stati ripetutamente segnalati, a seguito di indagini sierologiche e batteriologiche, focolai di leptospirosi tra bovini e ovini.

Sia nella pecora che nel bovino le sierovarianti di *Leptospira interrogans* più frequentemente riscontrate sono *icterohaemorrhagiae*, *pomona* e soprattutto *hardjo*, genotipo *hardjobovis* (Cerri et al., 2003).

Il bovino rappresenta il principale ospite di mantenimento di *L. hardjo*, con localizzazione a livello genitale e renale. Alla pecora, per molto tempo considerata ospite accidentale di tale sierovariante, è oggi riconosciuto il ruolo di secondo ospite di mantenimento, essendo portatore renale fino a 11 mesi (Cousins et al., 1989; Farina et al., 1996).

La diagnosi di leptospirosi prevede accertamenti colturali o molecolari per evidenziare l'agente eziologico in campioni biologici, soprattutto urine, ma essenzialmente si basa sull'esecuzione di esami sierologici, che sono in grado di fornire risposte attendibili in tempi più brevi. La diagnosi sierologica è uno strumento fondamentale non solo per accertare in un animale la presenza di anticorpi specifici verso una determinata sierovariante qualora si abbiano sospetti in seguito a manifestazioni cliniche come l'aborto, ma anche per controllare periodicamente i capi presenti in un allevamento e quelli di nuova introduzione. L'esame sierologico considerato di referenza è la microagglutinazione in campo oscuro di Martin e Pettit (MAT), in grado di rilevare gli anticorpi specifici nei confronti delle diverse sierovarianti.

L'ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) indiretta è stata impiegata a partire dagli anni ottanta, inizialmente in medicina umana dove anche oggi trova un più largo utilizzo (Levett et al., 2001; Flannery et al., 2001; Zochowski et al., 2001; Levett e Branch, 2002; Bajani et al., 2003; Vitale et al., 2004; Mulla et al., 2006; Oeteman et al., 2006). Solo in un secondo momento questo test è stato impiegato anche in medicina veterinaria, sebbene più a scopo di ricerca che di diagnosi routinaria. Il test ELISA è stato utilizzato per la diagnosi sierologica di poche specie animali, soprattutto cani e bovini, e per la ricerca di anticorpi verso una sola sierovariante alla volta (Ribotta et al., 2000; Surujballi e Mallory, 2001; Vanasco et al., 2001; Bomfim et al., 2005; Mariya et al., 2006).

Scopo del presente studio è stato quello di mettere a confronto i risultati ottenuti, testando sieri bovini e ovini, mediante la tradizionale MAT e un kit ELISA indiretta disponibile in commercio, creato appositamente per la ricerca di anticorpi verso *L. hardjo*.

MATERIALI E METODI

Al fine dello studio sono stati testati, mediante MAT e un kit ELISA indiretta, 194 emosieri dei quali 103 di bovini e 91 di ovini. Tra i primi, 100 erano di campo e

3 di controllo, in dotazione con il kit ELISA, dei quali 2 positivi e 1 negativo. Tra i secondi, 78 erano di campo e 13 di controllo, di cui 10 negativi e 3 positivi a diverso titolo anticorpale provenienti da pecore infettate sperimentalmente con *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*.

Il test MAT è stato eseguito utilizzando come antigene la sierovariante *hardjo* (100 milioni di batteri/ml) in collezione presso il laboratorio di batteriologia del Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi e Igiene degli Alimenti dell'Università di Pisa, secondo il protocollo descritto da Faine et al., 1999. I sieri con titolo anticorpale $\geq 1:100$ sono stati considerati positivi.

Il kit ELISA del commercio prevede l'utilizzo su sieri bovini, per cui il protocollo suggerito dalla casa produttrice è stato in parte modificato in modo da poter esaminare anche i sieri ovini. A tale scopo è stato impiegato il siero anti-IgG ovine coniugato con perossidasi (Sigma – Aldrich, Milano) alla diluizione 1:2000, determinata dopo titolazione. Il test è stato eseguito su piastre a 96 pozzetti già adsorbite con antigene inattivato allestito a partire da *L. interrogans* serovar *hardjo*. I sieri bovini e ovini sono stati diluiti 1:200 con il tampone di diluizione del kit, distribuiti in doppio (50 μ l/pozzetto) e incubati a 37°C per un'ora. Dopo i lavaggi eseguiti con l'apposito tampone del kit, sono stati distribuiti in tutti i pozzetti 50 μ l del siero anti-IgG, bovine (diluizione 1:30) o ovine a seconda dei sieri in esame, coniugato con perossidasi. Dopo incubazione della piastra a 37°C per un'ora e ulteriori lavaggi, è stata distribuita in tutti i pozzetti la soluzione substrato-cromogeno. La piastra è stata incubata per 15 minuti a temperatura ambiente e, dopo bloccaggio della reazione colorimetrica, letta mediante spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 450 nm.

RISULTATI

Bovini

I sieri di controllo forniti dal kit indicati come mediamente positivo (controllo 1), altamente positivo (controllo 2) e negativo (controllo 3), alla MAT hanno dato risposta rispettivamente 1:200, 1:800 e negativa, mentre con l'ELISA sono stati rilevati valori di densità ottica (OD) pari a 0.56, 0.84 e 0.12.

I 100 sieri bovini di campo sono risultati tutti negativi sia alla MAT che al test ELISA. Quest'ultimo, per il quale la casa produttrice indicava un cut off di 0.30, ha registrato valori di OD compresi tra 0.06 e 0.26.

Ovini

I 10 sieri ovini utilizzati come controllo negativo hanno dato valori di OD compresi tra 0.21 e 0.56. Il valore di cut off, calcolato sommando 3 deviazioni standard alla media aritmetica dei valori di OD dei 10 controlli negativi, è risultato pari a 0.63. I 3 sieri impiegati quale controllo positivo, che alla MAT hanno dato titolo anticorpale 1:200, 1:800 e 1:1600, hanno mostrato valori di OD rispettivamente di 0.73, 0.74 e 0.94.

Tra i 78 sieri ovini testati, 54 (69,23%) sono risultati positivi con la MAT a titoli anticorpali compresi tra 1:100 e 1:1600, mentre i rimanenti 24 (30,77%) hanno dato

esito negativo. Con il test ELISA gli stessi sieri hanno fornito 60 (76,92%) risposte positive e 18 (23,08%) negative.

Mettendo a confronto i risultati ottenuti, mediante MAT ed ELISA (Tab. I), con i 78 sieri di campo ovini è stato calcolato il valore di concordanza tra i due test sierologici che è risultato del 79,48%.

Tab. I. Confronto dei risultati ottenuti ai test MAT ed ELISA indiretta. <i>Comparison of MAT and indirect ELISA results.</i>		
	MAT +	MAT -
ELISA +	49	11
ELISA -	5	13

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti evidenziano una perfetta concordanza tra il test MAT e il kit ELISA quando vengono impiegati i sieri bovini. Pur ricordando che il kit è stato messo a punto dalla casa produttrice appositamente per rilevare gli anticorpi verso la serovar *hardjo* negli emosieri bovini, è tuttavia da sottolineare che nel corso del presente studio sono stati esaminati sieri di bovino che alla MAT sono risultati sempre negativi.

Quando il kit ELISA è stato impiegato per testare gli emosieri ovini, sono stati registrati risultati in alcuni casi discordanti con quelli ottenuti mediante la MAT. Dei 78 sieri di campo, infatti, 54 erano positivi alla MAT e 60 al test ELISA. Se la differenza in questo modo può sembrare non significativa, la situazione cambia se prendiamo in considerazione il valore di concordanza tra i due test sierologici. Questo infatti, calcolato sulla base dei risultati ottenuti con i sieri ovini di campo, è risultato pari al 79,48%.

Il maggior numero di campioni risultati positivi con il test ELISA conferma la sua maggiore sensibilità rispetto ad altri test sierologici. Purtroppo questa caratteristica va spesso a scapito della specificità, per cui i risultati positivi che vengono forniti in alcuni casi hanno il significato di false positività.

Alla luce dei risultati ottenuti si può concludere che, sebbene il kit ELISA abbia fornito risposte soddisfacenti soprattutto per quanto riguarda i sieri bovini, la MAT conferma il suo ruolo di test *gold standard* nella diagnosi sierologica della leptospirosi. La MAT offre infatti il grande vantaggio di poter testare lo stesso siero con diverse sierovarianti, valutando con quale leptospira il bovino/ovino, recettivo a *L. hardjo* ma anche a *pomona*, *bratislava*, *icterohaemorrhagiae*, *tarassovi*, si è infettato. La MAT inoltre ha costi molto ridotti rispetto al test ELISA, anche qualora quest'ultimo fosse eseguito non con un kit del commercio, ma venisse messo a punto nel laboratorio di esecuzione, poiché i reagenti come le immunoglobuline coniugate con perossidasi e il substrato-cromogeno hanno costi non contenuti.

BIBLIOGRAFIA

- BAJANI M.D., ASHFORD D.A., BRAGG S.L., WOODS C.W., AYE T., SPIEGEL R.A., PLIKAYTIS B.D., PERKINS B.A., PHELAN M., LEVETT P.N., WEYANT R.S. (2003). Evaluation of four commercially available rapid serological tests for diagnosis of leptospirosis. *J.Clin. Microbiol.*, 41: 803-809.
- BOMFIM M.R., KO A., KOURY M.C. (2005). Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Vet. Microbiol.*, 109: 89-94.
- CERRI D., EBANI V.V., FRATINI F., PINZAUTI P., ANDREANI E. (2003). Epidemiology of leptospirosis: observations on serological data obtained by a "Diagnostic laboratory for leptospirosis" from 1995 to 2001. *Microbiologica*, 26: 383-389.
- COUSINS D.V., ELLIS T.M., PARKINSON J., MACGLASHAN C.H. (1989). Evidence for sheep as a maintenance host for *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *Vet. Rec.*, 124: 123-124.
- FAINE S., ADLER B., BOLIN C., PEROLA P. (1999). *Leptospira* and leptospirosis. 2nd Edition. MediSci, Melbourne, Australia, pp. 180.
- FARINA R., CERRI D., RENZONI G., ANDREANI E., MANI P., EBANI V.V., PEDRINI A., NUVOLONI R. (1996). *Leptospira interrogans* in the genital tract of sheep. Research on ewes and rams experimentally infected with serovar *hardjo* (*hardjobovis*). *Microbiologica*, 19: 235-242.
- FLANNERY B., COSTA D., CARVAHLO F.P., GUERREIRO H., MATSUNAGA J., DA SILVA E.D., FERREIRA A.G., RILEY L.W., REIS M.G., HAAKE D.A., KO A.I. (2001). Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 3303-3310.
- LEVETT P.N., BRANCH S.T. (2002). Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 66: 745-748.
- LEVETT P.N., BRANCH S.L., WHITTINGTON C.U., EDWARDS C.N., PAXTON H. (2001). Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8: 349-351.
- MARIYA R., CHAUDHARY P., KUMAR A.A., THANGAPANDIAN E., AMUTHA R., SRIVASTAVA S.K. (2006). Evaluation of a recombinant LipL41 antigen of *Leptospira interrogans* serovar *canicola* in ELISA for serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 29: 269-277.
- MULLA S., CHAKRABORTY T., PATEL M., PANDYA H.P., DADHANIVA V., VAGHELA G. (2006). Diagnosis of leptospirosis and comparison of ELISA and MAT techniques. *Indian J. Pathol. Microbiol.*, 49 (3): 468-470.
- OETEMAN M.C., VAGO A.R., KOURY M.C. (2006). Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *J. Microbiol. Methods*, 65: 247-257.
- RIBOTTA M.J., HIGGINS R., GOTTSCHALK M., LALLIER R. (2000). Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of leptospiral antibodies in dogs. *Can. J. Vet. Res.*, 64: 32-37.
- SURUJBALLI O., MALLORY M. (2001). Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Leptospira interrogans* serovar *pomona* antibodies in bovine sera. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8: 40-43.
- VANASCO N.B., LOTTESBERGER J., SEQUEIRA M.D., TARABLA H. (2001). Development and validation of an ELISA for the detection of leptospire-specific antibodies in rodents. *Vet. Microbiol.*, 82: 321-330.

- VITALE G., LA RUSSA C., GALIOTO A., CHIAFARI N., MOCCIARO C., CARUSO R., MICALIZZI A., MANSUETO P., DI ROSA S., MANSUETO S. (2004). Evaluation of an IgM-ELISA test for the diagnosis of human leptospirosis. *Microbiologica*, 27: 149-154.
- ZOCHOWSKI W.J., PALMER M.F., COLEMAN T.J. (2001). An evaluation of three commercial kits for use as screening methods for the detection of leptospiral antibodies in the UK. *J.Clin. Pathol.*, 54: 25-30.