

LA DIAGNOSI SIEROLOGICA DI CAE/MV IN OTTICA ONE HEALTH: VALIDAZIONE E APPLICAZIONE DEL NUOVO DIA-check MVV/CAEV ELISA Test



E. Carloni ¹, S. Dominici ¹, M. Magnani ², E. Omiccioli ¹

¹ DIATHEVA S.r.l.

² Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università degli Studi "Carlo Bo", Urbino

Introduzione

L'artrite/encefalite caprina (CAE) e la maedi-visna (MV) sono infezioni croniche e persistenti causate da lentivirus che colpiscono capre e pecore. Queste due malattie sono classificate insieme sotto il termine di lentivirus dei piccoli ruminanti (SRLVs). CAEV e MVV si trasmettono principalmente attraverso il colostro e il contatto ravvicinato tra animali. Le forme cliniche e subcliniche sono caratterizzate da lesioni infiammatorie progressive in polmoni, articolazioni, mammella e sistema nervoso centrale. Sebbene la maggior parte degli animali infetti non presenti sintomi clinici, rimangono infetti in modo persistente e possono trasmettere il virus ad altri soggetti. Per controllare la diffusione del virus, è fondamentale identificare ed eliminare gli animali portatori, poiché attualmente non esiste alcun vaccino o trattamento antivirale disponibile. Dal punto di vista One Health, controllare queste infezioni tutela la salute animale, umana e ambientale, migliorando il benessere e riducendo rischi e uso di farmaci¹. Poiché la maggior parte delle pecore e delle capre infette sviluppa una risposta immunitaria umorale, la presenza di anticorpi specifici, rilevabili mediante metodi sierologici, rappresenta un indicatore utile dell'infezione virale. L'approccio più pratico e affidabile per la diagnosi di MV o CAE è la combinazione tra valutazione sierologica e clinica². A supporto delle attività diagnostiche, DIATHEVA ha sviluppato il "DIA-check MVV/CAEV ELISA Test" (AKE0023), un saggio ELISA ad alte prestazioni, specificamente progettato per la rilevazione degli anticorpi contro i lentivirus dei piccoli ruminanti.

Materiali e metodi

I saggi sono stati eseguiti con il kit DIA-check MVV/CAEV ELISA Test (AKE0023). Due sieri ovini negativi all'infezione e 3 sieri positivi sono stati testati in 5 replicati in un'unica corsa per i test di ripetibilità intra-assay e in 3 corse differenti (3 giorni e operatori diversi, 2 strumenti di lavaggio e lettori di piastra diversi) per i test di ripetibilità inter-assay. L'esclusività è stata determinata analizzando 1 campione di siero di ovino positivo a *Clostridium perfringens*, a *Staphylococcus aureus*, a *Brucella melitensis* e a *Salmonella abortus ovis* e 3 campioni di ovino infetti con *Chlamydia abortus*. Per gli studi di inclusività sono stati testati 3 sieri ovini positivi per il genotipo A, B ed E dei virus. La sensibilità analitica è stata determinata utilizzando il controllo negativo MV/CAE AGIDT NEGATIVE CONTROL SERUM (APHA Scientific) e il controllo positivo MV/CAE AGIDT POSITIVE TO GP135 CONTROL SERUM (APHA Scientific). Entrambi i controlli sono stati sottoposti a diluizioni seriali 1:2 v/v in buffer di diluizione del campione e le diluizioni sono state testate in duplicato. Il limite di rilevabilità è definito come il titolo sierico corrispondente al reciproco della massima diluizione del controllo positivo che ha mostrato una differenza significativa rispetto al siero negativo ($p < 0,05$). Le prestazioni diagnostiche del metodo sono state definite internamente analizzando 116 sieri positivi a CAE/MV (6 sieri caprini e 110 sieri ovini) e 178 sieri negativi (10 sieri caprini e 168 sieri ovini), diagnosticati con kit ELISA commerciali. Lo studio di comparazione delle prestazioni con un kit commerciale ampiamente diffuso è stato effettuato in DIATHEVA testando 155 sieri ovini. Inoltre, 92 sieri ovini e caprini, caratterizzati per il loro stato di infezione, sono stati analizzati dal Friedrich-Loeffler Institut (FLI, German National Reference Laboratory for Maedi/Visna and Caprine Arthritis/Encephalitis), utilizzando il DIA-check MVV/CAEV ELISA Test e tre kit ELISA commerciali ampiamente utilizzati. L'analisi statistica è stata eseguita con software GraphPad Prism (ver.10.5.0).

Risultati e discussione

Il metodo DIA-check MVV/CAEV ELISA Test ha mostrato buone prestazioni in termini di ripetibilità, con $CV \leq 15\%$ sia nei test intra-assay che inter-assay. Per la determinazione dei parametri diagnostici, sono stati analizzati 294 campioni di siero prelevati sul campo, raccolti in oltre 20 aziende agricole distribuite su tutto il territorio nazionale italiano. I campioni sono stati ottenuti impiegando diversi tipi di provette di raccolta e presentavano livelli eterogenei di emolisi, riflettendo la tipica variabilità analitica (presenza di interferenti) riscontrabile in condizioni operative reali. Il kit è stato testato su sieri positivi ad altri agenti batterici responsabili di patologie negli ovini (*C. perfringens*, *S. aureus*, *B. melitensis*, *C. abortus* e *S. abortus ovis*), inclusi patogeni abortigeni. Non sono state osservate reazioni crociate (Tabella 1).

POSITIVITÀ	N. CAMPIONI	S/P
<i>Clostridium perfringens</i>	1	0,37
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0,17
<i>Brucella melitensis</i>	1	0,28
<i>Chlamydia abortus</i>	3	(0,24 – 0,10 – 0,10)
<i>Salmonella abortus ovis</i>	1	0,23

Tabella 1: Specificità analitica basata sui sieri di animali sieropositivi per altre malattie

Inoltre, il test ha rilevato correttamente i genotipi A, B ed E. La sensibilità analitica ha evidenziato un limite di rilevabilità pari a 1:3200 (log 3,5). Le prestazioni diagnostiche del test sono state valutate su 116 sieri positivi e 178 sieri negativi. Il valore soglia S/P determinato per la discriminazione tra campioni positivi e negativi è stato fissato a 0,500, con $AUC = 9,945$ ($p < 0,0001$). Il test ha mostrato una sensibilità diagnostica del 95,69% e una specificità del 97,19%, con valori predittivi positivi e negativi rispettivamente del 95,7% e 97,2% (Tabella 2).

DIA-check MVV/CAEV ELISA Test	POSITIVI NOTI	NEGATIVI NOTI
	111	5
NEGATIVI	5	173
Risultati	Sensibilità Diagnostica 95,69% (90,31% to 98,15%)*	Specificità Diagnostica 97,19% (93,59% to 98,79%)*

Tabella 2: Sensibilità e specificità diagnostica (tabella 2x2)
*95% CI

ILLR+ (34,07) e ilLR- (0,044) forniscono forti evidenze per confermare o escludere l'infezione, supportate dall'analisi della distribuzione dei campioni positivi e negativi all'infezione (Figura 1).

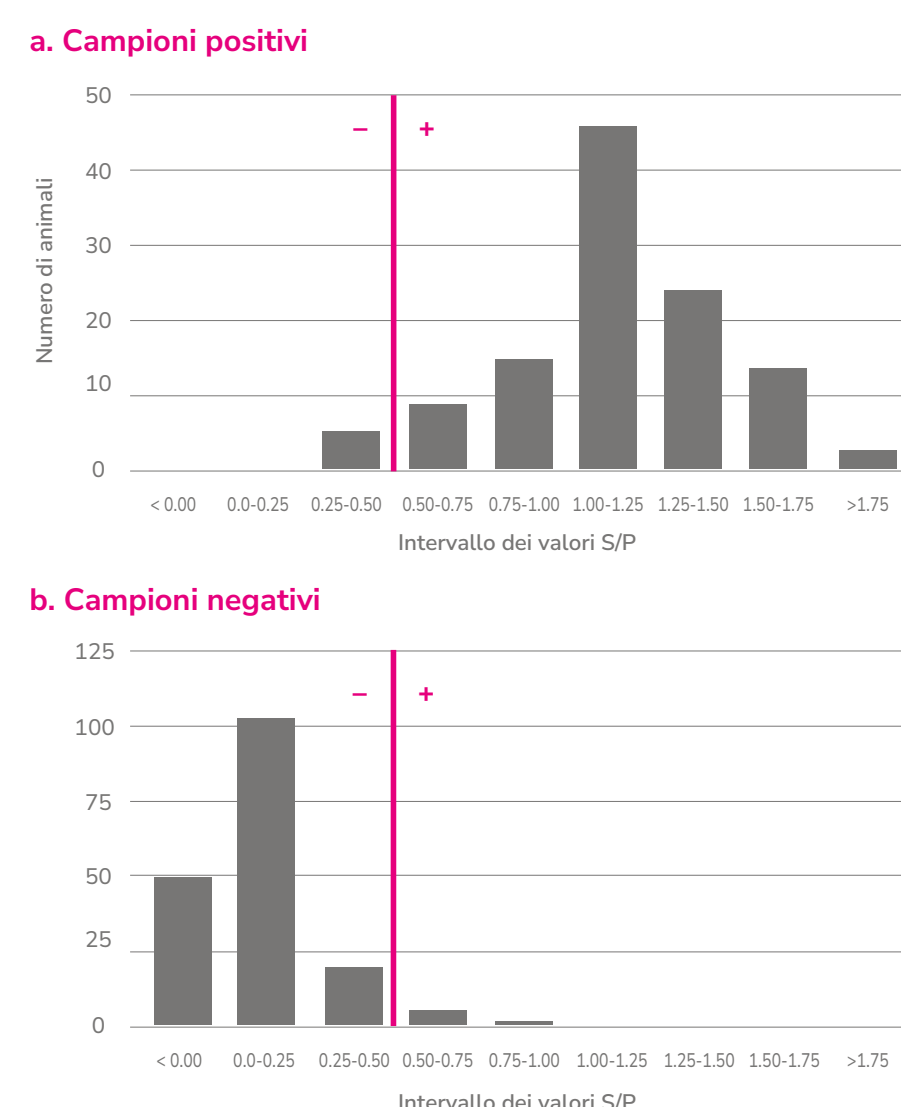


Figura 1: Distribuzione dei valori S/P dei campioni di siero positivi (a) e negativi (b) all'infezione di CAE/MV

Il confronto con un kit ELISA commerciale ampiamente utilizzato ha mostrato un'elevata concordanza, con un coefficiente di correlazione di Spearman pari a 0,86 (IC 95%: 0,8151-0,8994), confermando l'affidabilità del DIA-check MVV/CAEV ELISA test. La validazione condotta dal FLI su 92 campioni ha rilevato un valore del coefficiente di correlazione di Spearman di 0,87 (95% CI: 0,8042-0,9118) confermando la forte correlazione tra risultati attesi e ottenuti. A causa dell'insufficiente disponibilità di campioni sierologici provenienti da capre infette, la fase di validazione dei campioni caprini è attualmente in corso. Oltre alle prestazioni analitiche e diagnostiche dimostrate, il test si caratterizza per la rapidità di esecuzione, l'elevata capacità di processamento (high-throughput) e la chiara interpretazione dei risultati, con assenza della zona grigia. Tali caratteristiche lo rendono particolarmente idoneo per l'impiego previsto, ovvero la dimostrazione dell'assenza di infezione e la verifica dello stato sanitario del singolo animale prima della movimentazione. In conclusione, in assenza di un gold standard universale, il test si dimostra uno strumento affidabile nell'ambito di un approccio diagnostico integrato, basato su sierologia e valutazione clinica.

Bibliografia

¹ Tibebe A., Teshome Y., Tamrat H., Bahiru A. (2025), Mastitis in goat: A review of etiology, epidemiology, economic impact, and public health concerns. One Health, Volume 21, 101131.

² WOAHA Terrestrial manual (2018), Caprine arthritis/encephalitis & Maedi-visna, Chapter 3.8.2

