



Validazione di un test ELISA disponibile in commercio per la determinazione della Milk Amyloid A nel latte ovino come marker di mastiti subcliniche

M MONTAGNANI¹, A SANTINI¹, L CIOFI¹, T GALLI¹, E GASPARONI², A BIANCHERI MANTOVANI¹, F BONELLI³, C BOSELLI¹, G FICHI¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri"

² Veterinario libero professionista

³ Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Pisa

PAROLE CHIAVE: Milk Amyloid A, latte ovino, validazione ELISA, cut off

La Milk Amyloid A (MAA), apolipoproteina chemiotattica, è in parte prodotta dalle cellule della ghiandola mammaria e in parte deriva dalla Serum AA di origine principalmente epatica. Alcuni studi propongono questo marker come il più sensibile per la diagnosi di mastite nella specie ovina ma sottolineano la mancanza di un cut off per discriminare tra mammella sana e affetta da mastite subclinica (MSC). Gli scopi della presente ricerca sono stati: a) la validazione di un kit ELISA per la determinazione della MAA nel latte di pecora, b) determinazione del valore medio di MAA in latte di pecore sane e c) del cut off tra mammella sana e affetta da mastite.

Per la validazione e la determinazione di un cut off, 410 campioni di latte di emimammella (EM) sono stati prelevati da soggetti di razza Lacaune x Sarda, mentre per determinare il valore il medio di MAA in latte di animali sani, è stato prelevato settimanalmente il latte di EM di 30 animali (9 prelievi, 352 campioni). La validazione è stata condotta utilizzando il test ELISA "PHASE"TM Milk Amyloid A Mast (MAA) Assay (Tridelta Development Ltd). La diluizione per l'analisi dei campioni è stata da 1:100 a 1:100.000 quando il valore superava il limite di lettura del kit. Sono stati effettuati i calcoli dell'esattezza su due livelli, della linearità su diluizioni scalari, mentre la robustezza è stata valutata sulla differenza del Coefficiente di Variazione (CV) invertendo l'ordine di inserimento nel pozzetto del campione con l'Anti-MAA/HPR.

In assenza di un test gold standard per la diagnosi di MSC, il cut off della MAA è stato calcolato secondo il metodo delle classi di latenza (EM sana: conta delle cellule somatiche (CSS) ≤ 500.000 cell/mL ed esame batteriologico negativo; EM con MSC: CSS > 500.000 cell/mL ed esame batteriologico positivo). La CSS sui campioni di latte è stata effettuata con gli strumenti FossomaticTM FC e Fossomatic 7 DC (Foss Electric, Hillerød, Denmark) mentre l'esame batteriologico è stato effettuato secondo le procedure standard interne.

Dai campionamenti effettuati per la determinazione dei valori di MAA nel latte di animali sani, 12 soggetti sono risultati esenti da MSC per tutta la durata della fase di sperimentazione e hanno presentato un valore di MAA di 3,84 $\mu\text{g/mL}$.

L'esattezza calcolata sui due livelli è risultata accettabile per entrambi, la linearità ha presentato un R^2 di 0,87 e la robustezza una differenza di CV di 1,72%. Il valore di cut off è risultato di 21,10 $\mu\text{g/mL}$. I valori della MAA più elevati sono stati osservati nelle emimammelle da cui sono stati isolati *Streptococcus bovis* e *Staphylococcus aureus*.

Nel presente studio, è stato determinato sperimentalmente per la prima volta il cut off della MAA nella specie ovina e valutato il valore di MAA in soggetti sani che è risultato inferiore rispetto a quello di soggetti considerati sani secondo le classi di latenza sopraindicate. Il presente studio è stato finanziato dal Ministero della Sanità, Ricerca Corrente LT 05-18.

Validation of a commercially available ELISA test for the determination of Milk Amyloid A in sheep milk as a marker of subclinical mastitis

Key words: Milk Amyloid A, sheep milk, ELISA validation, cut off