

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DEL MEZZOGIORNO

*Centro di Referenza Nazionale sull'Igiene e le Tecnologie
dell'Allevamento e delle Produzioni Bufaline*

RELAZIONE FINALE

Responsabile scientifico: Dr Giorgio Galiero

**Valutazione di innocuità, ecotossicità ed immunogenicità del vaccino
Brucella abortus RB 51 nella bufala mediterranea: vaccinazione di
soggetti adulti in lattazione**

Introduzione

Il vaccino RB 51 è un vaccino vivo attenuato derivato da un ceppo virulento di *Brucella abortus* 2308 mediante passaggi seriali di colonie in fase rugosa in presenza di concentrazioni variabili di rifampin. L'utilizzo del vaccino per la profilassi della brucellosi nella bufala mediterranea è subordinata alla sperimentazione in questa specie di un protocollo di somministrazione che ne dimostri innocuità, immunogenicità ed efficacia.

Nei giovani soggetti è ampiamente dimostrato che il vaccino è innocuo, non viene eliminato attraverso l'emuntorio renale e stimola una robusta immunità umorale e cellulomediata (Iovane et al., 2007, Il Progresso Veterinario 1:19-21). L'utilizzo del vaccino nelle bufale adulte non è stato ancora sperimentato. Poiché nell'ambito di un piano di controllo della malattia, potrebbe rendersi necessario il ricorso alla somministrazione di tale presidio immunizzante anche nei soggetti adulti al fine di contenere la diffusione dell'infezione nelle aziende infette, si rende necessario valutare se il vaccino risulta sostanzialmente innocuo anche per i soggetti gravidi, se vi è eliminazione del ceppo vaccinale attraverso il latte, al fine di escludere importanti implicazioni di sanità pubblica ed il livello di immunogenicità conferito ai soggetti vaccinati. In merito all'innocuità nei soggetti gravidi il dato bibliografico (Galiero et al., 2006 Vet. Rec. 159: 563-564) riguardante vaccinazione di bufale in condizioni di somministrazione non controllate circa i dosaggi utilizzati, il numero di interventi e l'età dei soggetti trattati, evidenzia la possibilità di rinvenire il ceppo vaccinale in feti abortiti nell'ultima parte della gravidanza. In quanto al latte prodotto da soggetti vaccinati, la letteratura riporta dati non conclusivi (Mallardo et al., 2007 Italian Journal Animal Science 6: 889-892) poiché a fronte di indagini batteriologiche costantemente negative, è stata evidenziata una sporadica e transitoria positività alla PCR. Tali risultati lascerebbero intendere che per un principio di massima precauzione, sarebbe consigliabile prevedere la pasteurizzazione del latte proveniente da soggetti vaccinati durante la lattazione.

Materiali e metodi

Animali

Gli animali sono stati individuati random nell'ambito di due aziende bufaline ubicate in provincia di Salerno ufficialmente indenni da brucellosi e negative per la presenza di anticorpi verso la fase liscia e rugosa di *Brucella* spp. Gli animali prescelti sono stati visitati al fine di stabilirne l'epoca della gravidanza e sono stati selezionati i soggetti che presentavano gravidanze comprese tra 3 e 6 mesi. Nel complesso sono stati prescelti 10 capi.

Vaccino

Il vaccino utilizzato è prodotto dalla ditta CZ veterinaria lotto 06005 scad. 5/2007 somministrato alla dose di $3 \times 1-3.4 \times 10^{10}$ per via sottocutanea nella regione prescapolare.

Visite cliniche

Successivamente alla vaccinazione gli animali sono visitati quotidianamente al fine di verificare se il vaccino ha indotto reazioni avverse locali o sistemiche. Con cadenza quindicinale e per tutto il periodo di gravidanza, i soggetti sono sottoposti a visite ginecologiche allo scopo di valutare eventuali reazioni avverse a carico del prodotto del concepimento.

Campionamenti

Latte: con le cadenze di seguito riportate, da tutti i soggetti è stato effettuato un prelievo di latte nella misura di 50 cc a capo, ottenuto dalla mungitura completa dei soggetti sottoposti a vaccinazione. I campioni sono stati utilizzati per la ricerca del ceppo vaccinale di *Brucella abortus*.

Giorno prelievo latte postvaccinazione:

Giorno 3
" 4
" 10
" 11
" 15
" 16
" 20
" 30
" 40

Dopo il parto

Giorno 7
" 14

Sangue: sono stati effettuati campionamenti di emosiero secondo il seguente calendario per le indagini sierologiche volte a dimostrare la presenza di anticorpi anti *Brucella* in fase rugosa

Giorno 30
" 60
" 80
" 90

Aborti: eventuali feti abortiti con i relativi invogli, sono stati sottoposti ad indagini batteriologiche, per la ricerca di *Brucella* spp. al fine di diagnosticare la causa dell'interruzione della gravidanza.

Tamponi vaginali ed invogli fetali: al parto da tutti i soggetti sono stati prelevati gli invogli fetali e per 7 gg. tamponi vaginali per la ricerca di *Brucella* spp.

Valutazione immunità cellulo mediata mediante *Skin test*: al 70° giorno *post-vaccinazione* è stata effettuata la prova intradermica con brucellina secondo procedura indicata nel Regolamento CE n 535/2002.

Esami di laboratorio

Per la ricerca di *Brucella* spp. da latte, tamponi ed invogli fetali è stato utilizzato il protocollo indicato dall'OIE (Manual of Diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 2004). Tutti i ceppi isolati e biochimicamente tipizzati come *Brucella* spp., sono stati inoltrati presso il Centro di Referenza Nazionale delle Brucellosi ubicato presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Abruzzo e Molise, per l'ulteriore caratterizzazione biochimica e molecolare.

Le indagini sierologiche sono state condotte mediante metodi di prova concordati ed armonizzati con il Centro di Referenza.

Risultati e discussione

I risultati ottenuti nell'ambito dell'intero disegno sperimentale sono stati riassunti nella tab. 1

Nel complesso il vaccino alle dosi utilizzate non ha dato luogo a reazioni avverse locali o sistemiche postinoculazione.

Le prove sierologiche volte ad evidenziare la capacità di indurre anticorpi testimoniano che il vaccino ha stimolato una significativa produzione anticorpale, la quale appare ancora molto evidente a distanza di tre mesi dalla somministrazione. Anche la prova allergica ha evidenziato reazioni positive in tutti i soggetti, confermando che il vaccino, anche negli adulti, conferisce una buona risposta in termini di immunità umorale e cellulo-mediata.

Tutti i campioni di latte prelevati durante la gravidanza e successivamente al parto hanno dato esito costantemente negativo. Il vaccino alle dosi utilizzate, non viene eliminato attraverso l'emuntorio mammario. Diverso è il riscontro ottenuto mediante l'esame dei tamponi vaginali prelevati al parto, in quanto in un caso è stato possibile isolare il ceppo vaccinale, a dimostrazione del fatto che il presidio immunizzante non è del tutto privo di ecotossicità, in quanto i soggetti vaccinati potrebbero rendersi responsabili di eliminazione del microrganismo attraverso le lochiazioni.

Per quanto riguarda l'effetto del vaccino sul prodotto del concepimento, solo sei soggetti sono giunti regolarmente al parto. Dei rimanenti quattro, due bufale hanno avuto prolasso vaginale e a distanza di qualche giorno hanno abortito. Il problema prolasso è particolarmente diffuso in alcune aziende bufaline, le cause non sono del tutto note. Nel nostro caso la patologia è stata riscontrata in un periodo di caldo torrido che si è protratto per più giorni, per cui è ipotizzabile che alcuni capi vaccinati si trovassero in uno stato di particolare stress. In ogni caso entrambe le bufale prolasse sono risultate negative per ricerca *Brucella* RB 51 dai tamponi vaginali ed anche dai feti espulsi non è stato riscontrato il ceppo vaccinale. Altri due soggetti hanno abortito, uno, espulso intorno al sesto mese di gravidanza, è risultato positivo per *Brucella* RB 51, la quale è stata isolata da vari tessuti fetali.

Conclusioni

Alla luce dei risultati conseguiti, pur evidenziando una buona capacità del vaccino di indurre una robusta risposta immunitaria anche in soggetti adulti, e di non essere eliminato attraverso il latte, il presidio immunizzante oggetto della sperimentazione, non sembra del tutto privo di inconvenienti. Si registra, così come hanno evidenziato le indagini batteriologiche sui tamponi vaginali, eliminazione del ceppo vaccinale, anche in soggetti regolarmente partoriti, attraverso il canale del parto. Inoltre il vaccino non è del tutto innocuo per il prodotto del concepimento, in quanto ha indotto aborto in un soggetto. Tale riscontro si evidenzia quindi anche in condizioni controllate a conferma, così come già evidenziato per la specie bovina, del difficile e talvolta rischioso impiego dell' RB 51 in soggetti gravidi.

Tab. 1

n	05.04.07 trattament o immunizza nte (dose 3x1.0-	Stato di gravidanza alla data di vaccinazione	<u>sangu</u> <u>e</u> Prelie vo del 05.05. 07	<u>sangue</u> Prelievo del 06.06.07 Risulati FdC-RB51	Prova allergic a 15.06.07 (0,1 ml di	<u>sangue</u> Prelievo del 26.06.07 Risulati FdC-RB51	<u>sangue</u> Prelievo del 05.07.07 Risulati FdC-RB51	<u>Latte</u> Prelievo al giorno 3°, 4°,10°,11°,1 5°,16°,20°,3 0°,40°; 7°,	Evoluzione gravidanza
---	---	--	--	--	---	--	--	--	-----------------------

	3.0x10 ¹⁰ UF C/dose)		Risultati FdC- RB51		brucellina)			14 °post partum	
1	6 cc RB-51	5 mesi	1:8 +++	1:16 ++++	+	1:16 ++++	1:16 ++++	Assente	Aborto da prolasso (24.06.07) negativo x ricerca di Brucella spp.
2	6 cc RB-51	4 ½ mesi	1:4 +++	1:32 ++	+	1:64 ++	1:32 ++++	Assente	Parto a termine (8.10.07) negativo x ricerca di Brucella spp.
3	6 cc RB-51	4 ½ mesi	1:4 +++	1:16 ++	+	1:64 ++	1:32 ++++	Assente	Parto a termine (10.09.07) negativo x ricerca di Brucella spp.
4	6 cc RB-51	6 mesi	1:4 ++	1:32 ++++	+	1:16 ++++	1:64 +++	Assente	Parto a termine (19.09.07) negativo x ricerca di Brucella spp.
5	6 cc RB-51	4 mesi	1:32 +++	1:64 +++	+	1:128 ++	1:64 ++++	Assente	Parto a termine (30.08.07) isolato RB-51 da tamponi vaginali
6	6 cc RB-51	3 mesi	1:4 ++	1:16 ++	+	1:64 ++	1:32 +++	Assente	Aborto da prolasso (26.06.07) negativo x ricerca di Brucella spp.
7	6 cc RB-51	6 mesi	1:64 +	1:64 +++	+	1:128 ++	1:128 ++	Assente	Aborto (30.07.07) Negativo x ricerca di Brucella spp.
8	6 cc RB-51	4 mesi	1:4 +++	1:64 ++	+	1:128 ++++	1:128 ++++	Assente	Aborto (19.06.07) isolato RB-51 da feto
9	6 cc RB-51	4 ½ mesi	1:32 ++++	1:64 +	+	1:64 ++++	1:64 ++++	Assente	Parto a termine (30.08.07) negativo x ricerca di Brucella spp.
10	6 cc RB-51	3 ½ mesi	Non reattivo	1:4 ++	+	1:16 ++	1:16 ++	Assente	Parto a termine (17.09.07) negativo x ricerca di Brucella spp.