IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Cross-reattività nei test sierologici per brucellosi: valutazione della risposta immunitaria indotta da *Escherichia coli* O157:H7 e *Yersinia enterocolitica* O:9

Acronimo progetto: EMIDA *Brucmel*

Barbara Bonfini

Brucella melitensis: biotyping and differential diagnostic

ERA-Net (rete dello spazio europeo della ricerca): azioni di coordinamento e supporto nell'ambito del 7°PQ di ricerca dell'Unione Europea

Obiettivo: incrementare la cooperazione e il coordinamento di attività di ricerca gestite a livello nazionale e regionale dagli Stati Membri e Associati

EMIDA: Emerging and Major Infectious Diseases of Livestock

Brucmel: Partner

Italia

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise (IZSAM) → **Project coordinator**
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia (IZSSi)

Grecia

- National Agricultural Research Foundation, Veterinary Research Institute of Thessaloniki (NAGREF)

Israele

- Kimron Veterinary Institute, Beit Dagan

Brucmel: Obiettivi

Migliorare il controllo delle infezioni causate da *B. melitensis*

Migliorare il programma di profilassi nelle aree del Mediterraneo e oltre

APPROCCIO PROTEOMICO:
Identificare proteine target specifiche di *B.mel.* per sviluppare strumenti diagnostici in grado di discriminare animali:
- infetti
- vaccinati con Rev.1
- portatori di patogeni cross-reattivi

Potenziare gli strumenti epidemiologici per le indagini di trace-back dei focolai

APPROCCIO GENOMICO:
Caratterizzazione molecolare di ceppi di campo *B.melitensis* e ceppo vaccinale Rev.1

Obiettivo

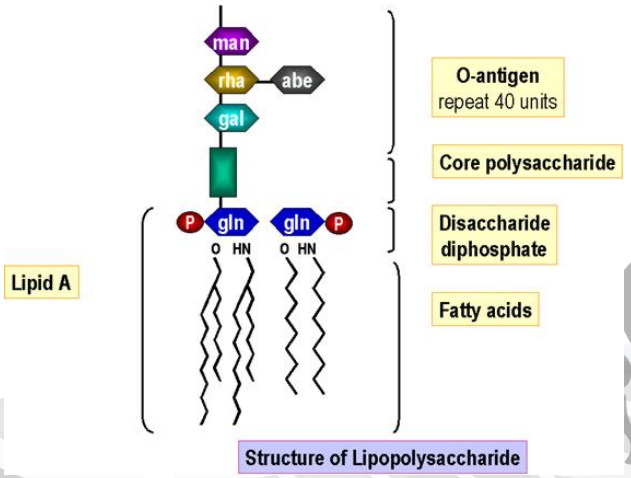
Valutare la risposta anticorpale di due gruppi di ovini immunizzati con *E. coli* O157:H7 e *Y. enterocolitica* O:9 nei confronti degli antigeni omologhi e degli antigeni ufficiali per Brucellosi, al fine di individuare un protocollo diagnostico differenziale.

Diagnosi sierologica di brucellosi

RBT, CFT ed ELISA consentono di svelare con un buon livello di Se e Sp la presenza di anticorpi diretti contro componenti della membrana esterna, tra cui LPS rappresenta la porzione più importante.

Cross-reazioni: correlazioni antigeniche tra Brucelle in fase S e altri Gram-

(Y.enterocolitica O:9, Salmonelle gruppo N, E.coli O157:H7)



M&M: Disegno sperimentale

per la produzione di sieri cross-reattivi

8 ovini adulti di razza meticcia

- Gruppo 1 - *E. coli*: 3 animali immunizzati con $1,5x10^9$ CFU/ml di coltura viva di *E. coli* O157:H7
- Gruppo 2 - Y. enterocolitica: 3 animali immunizzati con $1,5x10^9$ CFU/ml di coltura viva di *Y. enterocolitica O:9*
- Gruppo 3 - Controllo: 2 animali

M&M: Disegno sperimentale

Gli antigeni sono stati somministrati settimanalmente:

1. gg. 0 → 99: 5 ml per via orale (os)
2. gg. 107 →283: 5 ml per via sottocutanea (sc)
3. gg. 290 → 381: 10 ml per via sottocutanea (sc)

Controlli sierologici settimanali per tutta la durata dell'esperimento

Per ciascun animale sono stati prelevati 40 campioni

M&M: Esami sierologici

Brucella

- RBT, CFT, i-ELISA

Y. enterocolitica O:9

- CFT

E. coli O157:H7

- i-ELISA

M&M: Analisi statistica

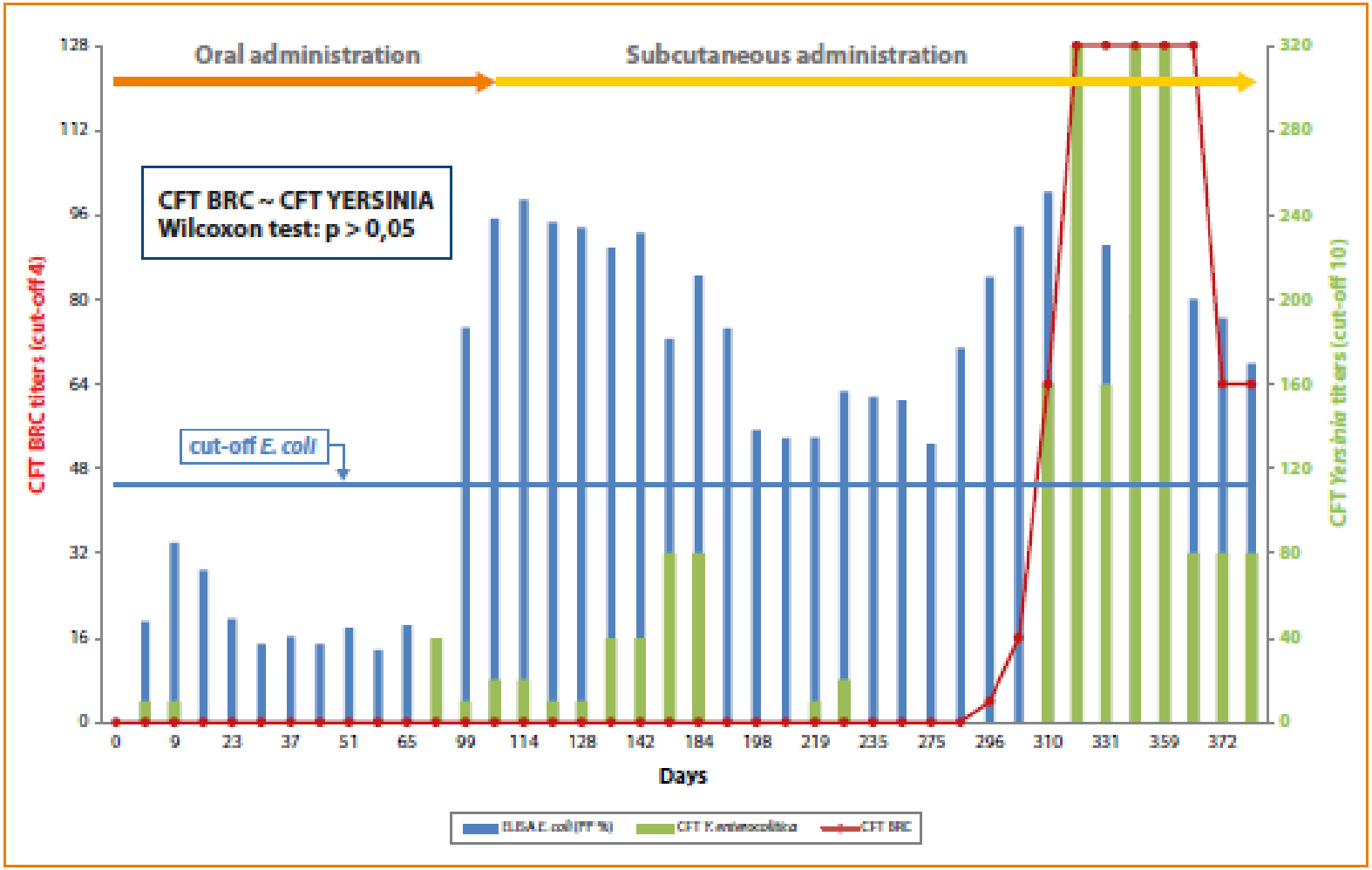
Il test non parametrico di Wilcoxon è stato applicato sui risultati ottenuti da *Brucella* e *Yersinia* CFT

- Valutare la differenza in termini di distribuzione dei risultati piuttosto che di valori assoluti di titoli Ab tra le due prove.

- *p* values < 0.05 sono considerati significativi.

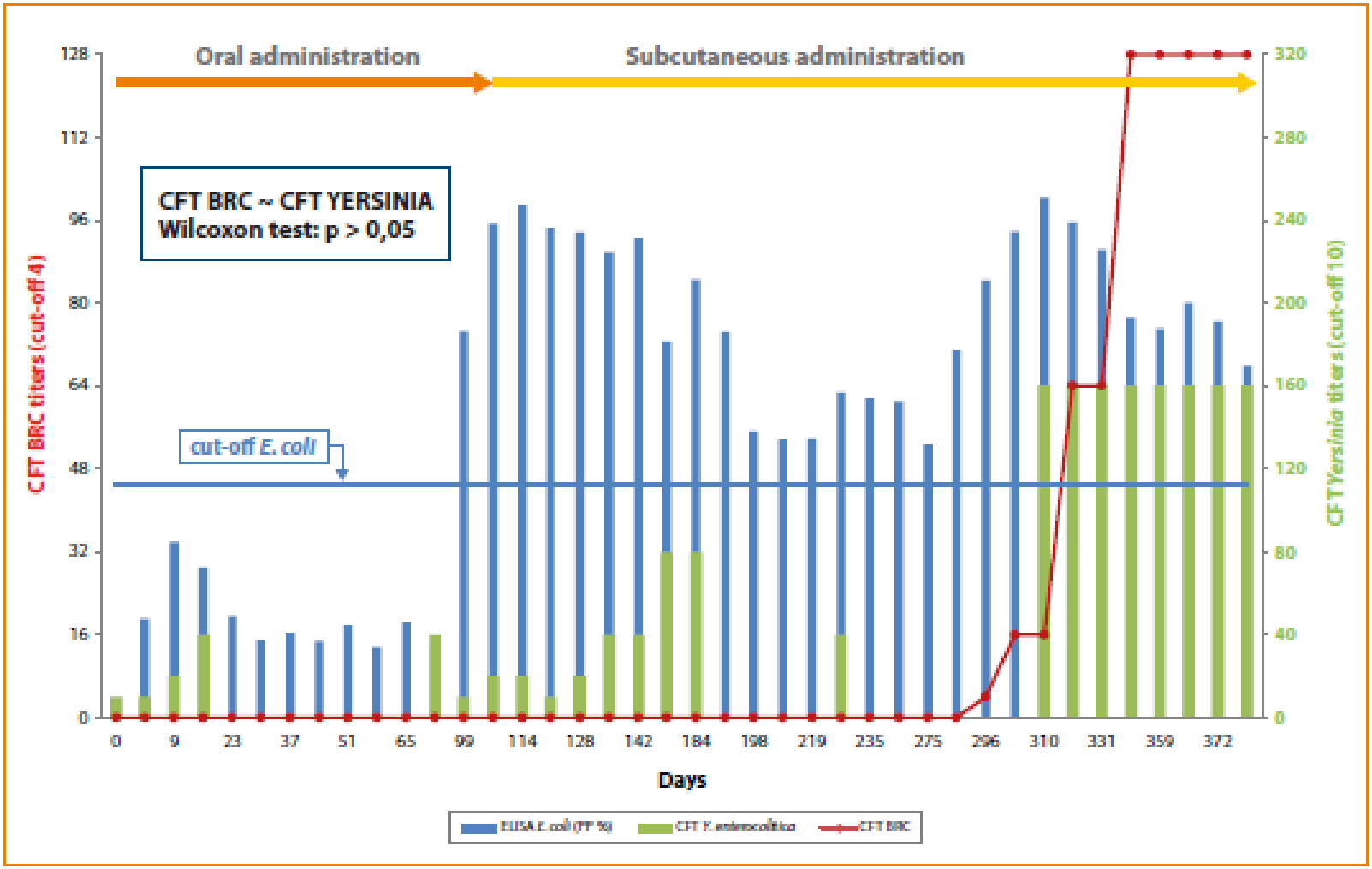
Risultati: gruppo 1 – *E.coli*

Figure 1. Serological Test Results Animal 1 - Group 1 (*E. coli*).



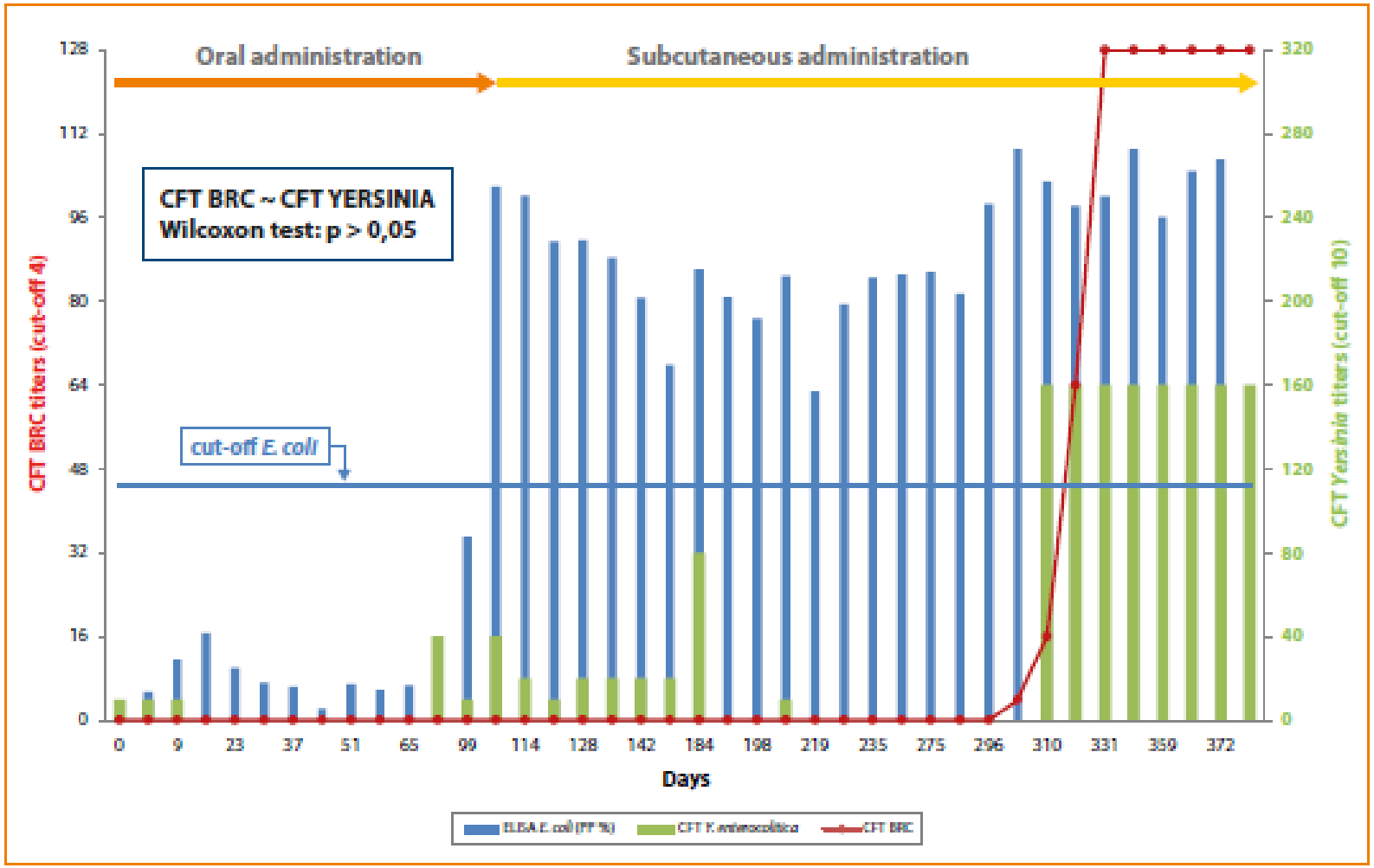
Risultati: gruppo 1 – *E.coli*

Figure 2. Serological Test Results Animal 2 - Group 1 (*E. coli*).



Risultati: gruppo 1 – *E.coli*

Figure 3. Serological Test Results Animal 3 - Group 1 (*E. coli*).



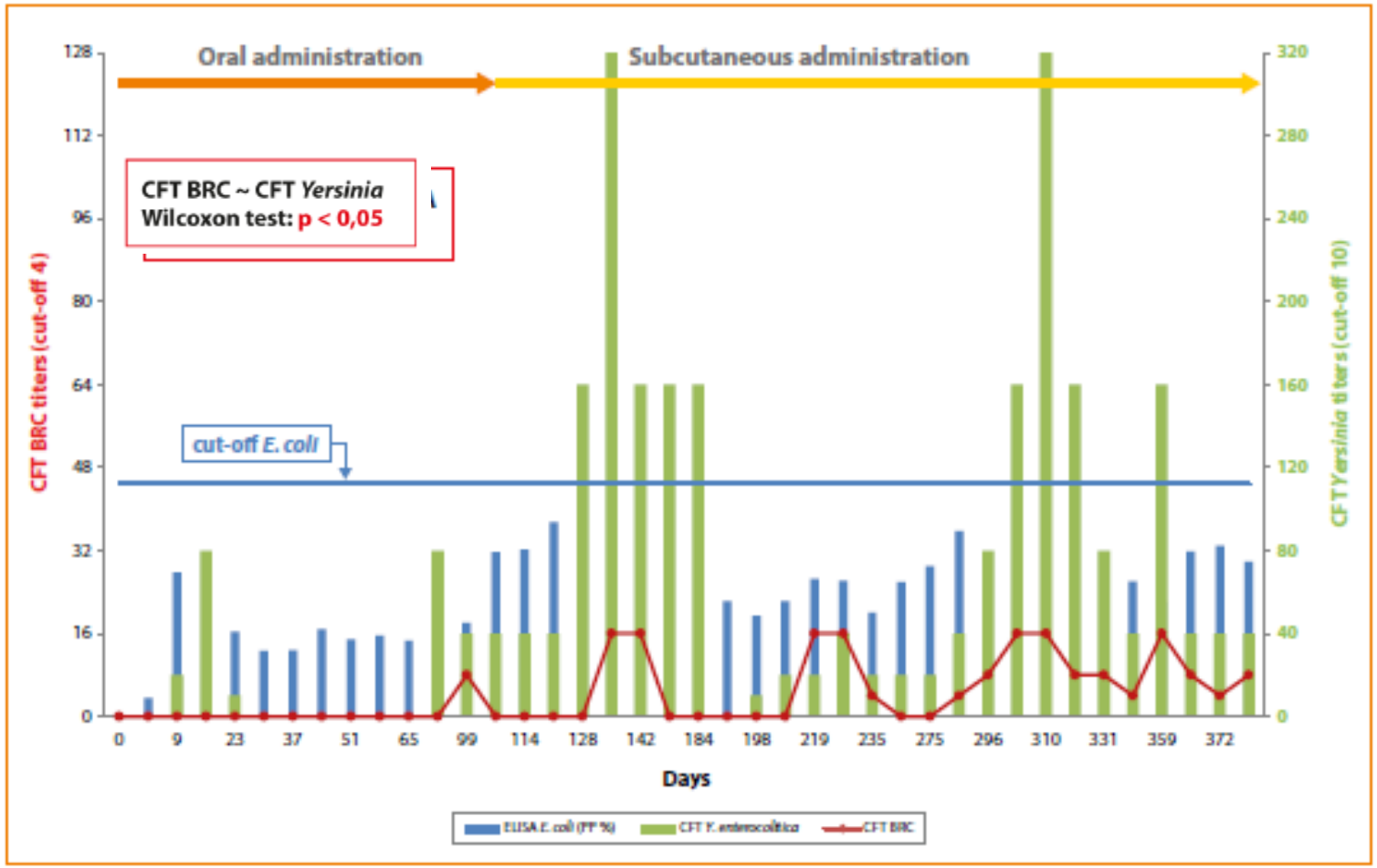
Risultati: gruppo 1 – *E.coli*

- *E.coli* (i-ELISA) la positività compare tra i gg. 99 e 106 e perdura fino alla fine dello studio
- *Y.enterocolitica* (CFT) dopo una leggera positività iniziale si registra un primo picco tra i gg. 92 e 184 e un secondo dal giorno 310 alla fine
- *Brucella* (CFT) positività a partire dai gg. 296-303; picchi 320-352

La valutazione statistica dei risultati CFT tra *Brucella* e *Yersinia* non fornisce differenze significative ($p>0,05$)

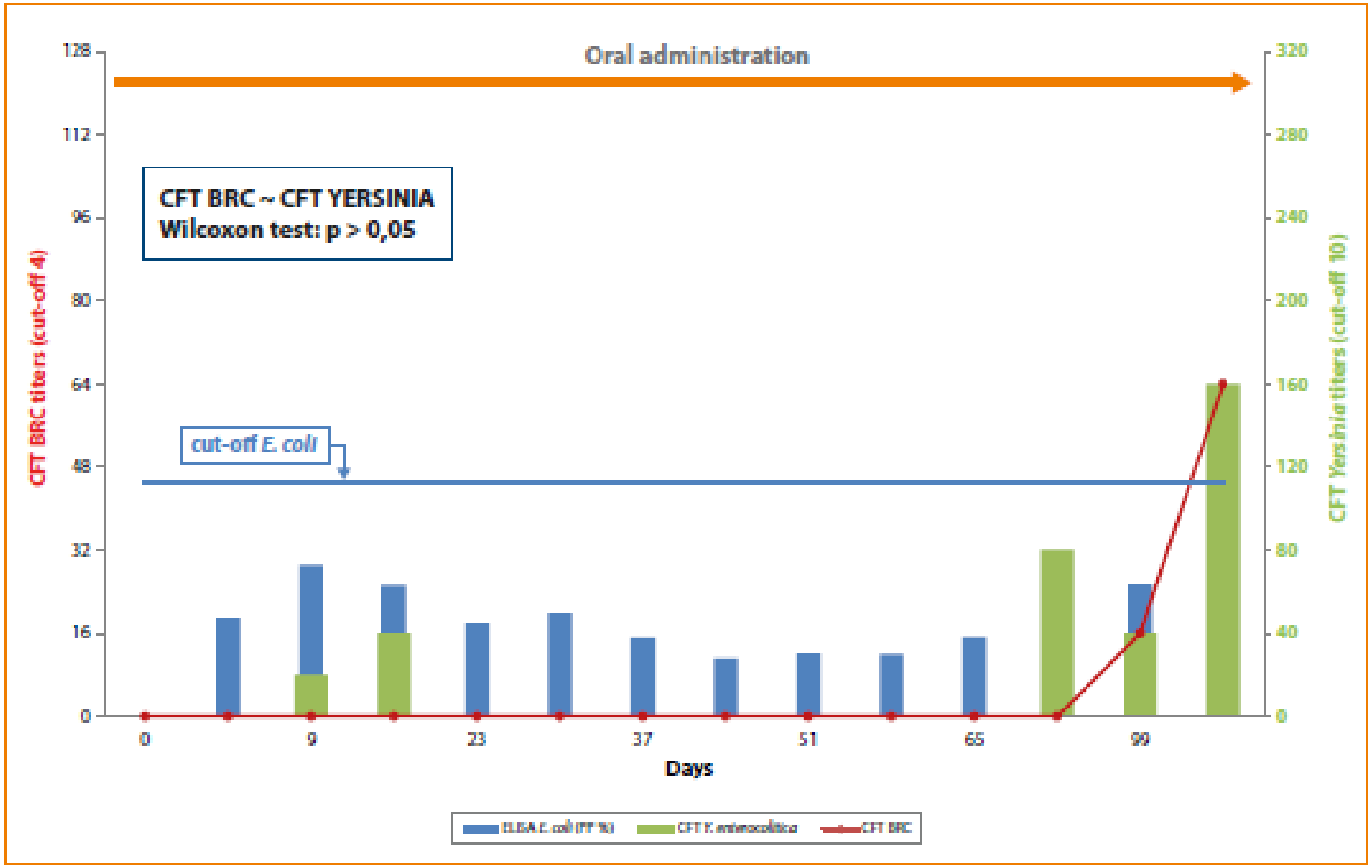
Risultati: gruppo 2 – *Y.enterocolitica*

Figure 4. Serological Test Results Animal 1 - Group 2 (*Yersinia*).



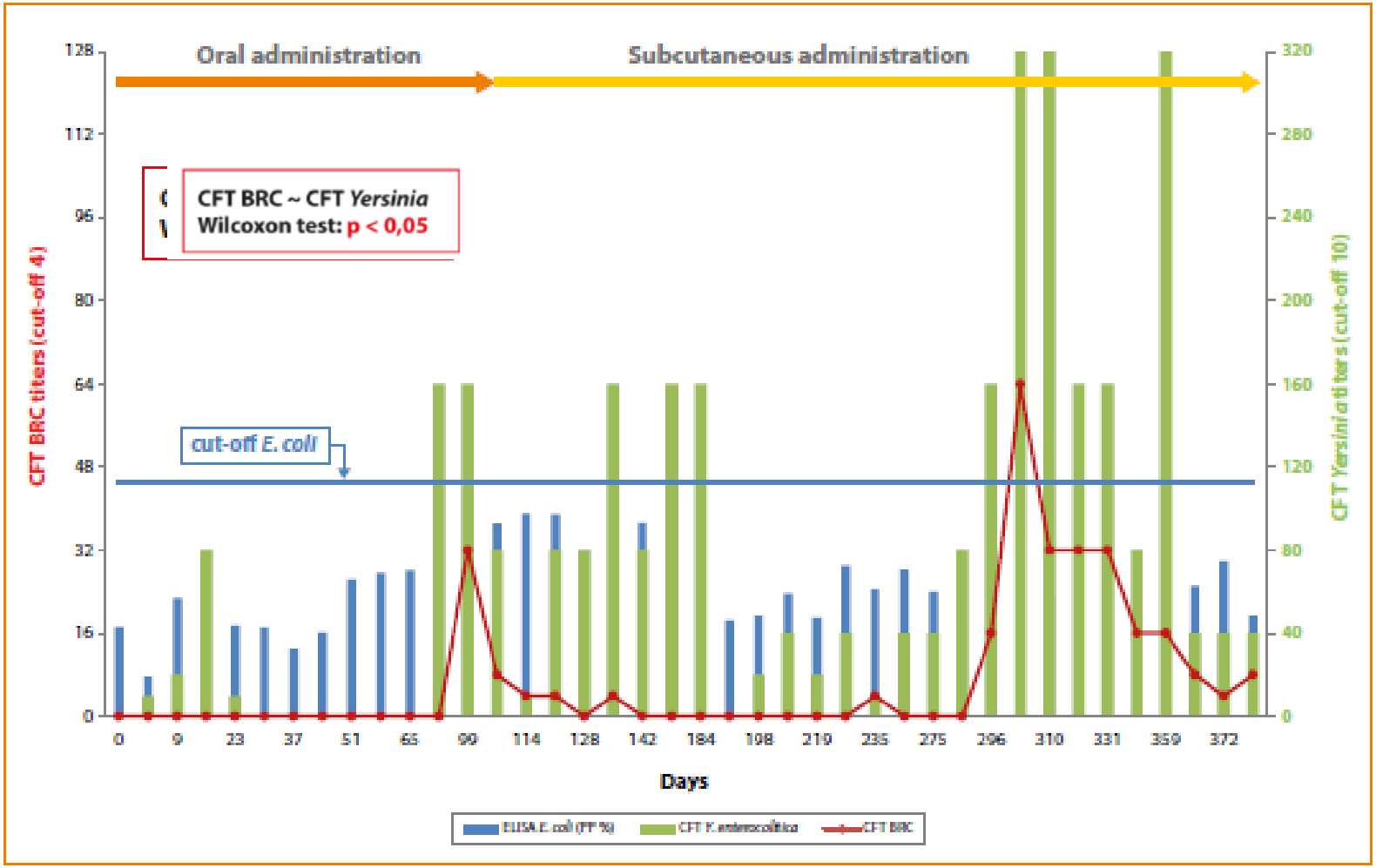
Risultati: gruppo 2 – *Y.enterocolitica*

Figure 5. Serological Test Results Animal 2 - Group 2 (*Yersinia*).



Risultati: gruppo 2 – *Y.enterocolitica*

Figure 6. Serological Test Results Animal 3 - Group 2 (*Yersinia*).



Risultati: gruppo 2 – *Y.enterocolitica*

- *E.coli* (i-ELISA): tutti gli animali risultano sempre negativi
- *Y.enterocolitica* (CFT): incremento della produzione di Abs vs Ye O:9 dopo immunizzazione os e sc.

  3 intervalli di positività: days 9-23; 92-184 e 198-381.
- *Brucella* (CFT): bassi titoli Abs in corrispondenza dei picchi di positività alla *Y.enterocolitica* CFT.

La valutazione statistica dei risultati CFT tra *Brucella* e *Yersinia* fornisce differenze significative ($p<0,05$) per due dei tre animali

Risultati

Table 1 Percentage of cross-reactivity for brucellosis serological tests

	Group 1 (*E.coli*)			Group 2 (*Y.enterocolitica*)			Group 3 (control)		
	RBT	CFT	i-ELISA	RBT	CFT	i-ELISA	RBT	CFT	i-ELISA
Tested	120	120	120	94	94	94	80	80	80
Correctly identified as negative	91	91	94	65	59	56	80	80	80
Cross-reactivity (%)	24.2	24.2	21.7	30.9	37.2	40.4	0.0	0.0	0.0

Sieri provenienti da animali immunizzati con *E. coli* o con *Y.e.* O:9 mostrano cross-reazioni nei test sierologici per brucellosi

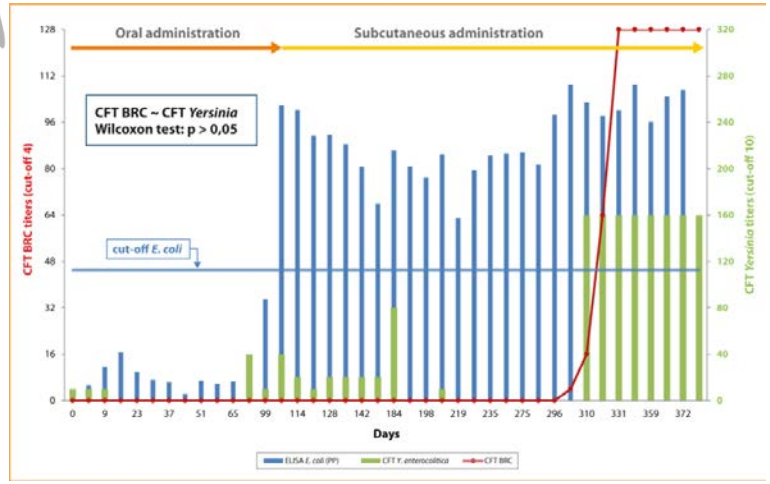
Conclusioni

Sebbene condotto su un limitato numero di animali, lo studio ha fornito rilevanti informazioni su:

- cinetica della risposta anticorpale vs *E.coli* O157:H7 e *Y.enterocolitica* O:9
- FP nei test sierologici per brucellosi

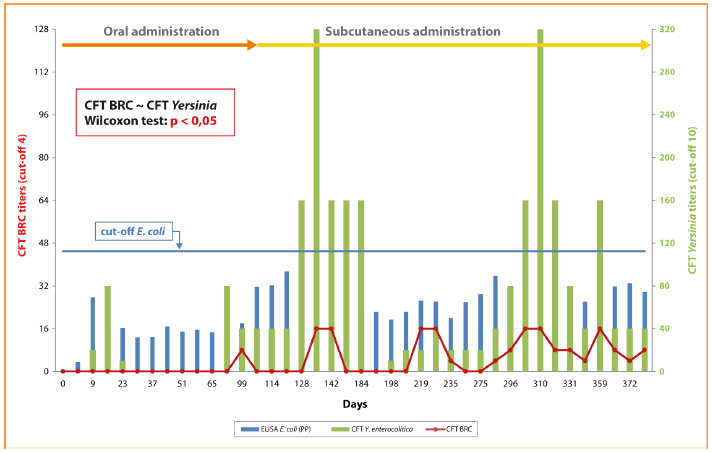
Conclusioni

Immunizzazione con *E.coli* O157:H7



- Aumento della produzione di Abs contro *E.coli* e *Y.e*.
- Risposte umorali vs *Y.e.* e *Brucella* non significativamente differenti

Immunizzazione con *Y.enterocolitica* O:9



- Produzione di Abs verso *Y.e.* ma non verso *E.coli*
- Risposte umorali vs *Y.e*. e *Brucella* significativamente differenti

Le cross-reazioni sierologiche verso Brucella si verificano principalmente a seguito di un'intensa risposta umorale verso gli antigeni omologhi

Conclusioni

Alla luce dei risultati ottenuti è possibile ipotizzare lo sviluppo di un protocollo diagnostico che preveda l'impiego in parallelo dei test sierologici per *Y. enterocolitica* O:9, *E. Coli* O157:H7 e *Brucella*, in grado di evidenziare possibili false positività e di fungere da supporto alle indagini epidemiologiche.

Tale protocollo troverebbe applicazione nei casi in cui, a fronte di reattività ai test sierologici, non vi sono elementi epidemiologici per sospettare l'infezione brucellare.

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosis 2014
Berlin
International Research Conference
Including the 67th Annual Brucellosis Research Meeting
9-12 September 2014

BfR
Bundesinstitut für Risikobewertung

False positive reactions to serological tests for brucellosis: analysis of antibody response to *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* O:9 in experimentally immunised sheep

EMIDA ERA-NET

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosis National Reference Centre

Reference Laboratory Brucellosis

F. Sacchini[1], B. Bonfini[1], G. Chiarenza[2], A. Conte[1], V. Gargano[2], V. Paci[1], R. Salini[1], D. Travaglini[1], G. Vesco[2], S. Villari[2], K. Zilli[1], M. Tittarelli[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale', Teramo, Italy - National Reference Centre and OIE Reference Laboratory for Brucellosis
[2] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia 'A. Mirri', Palermo, Italy.

Grazie per l'attenzione