

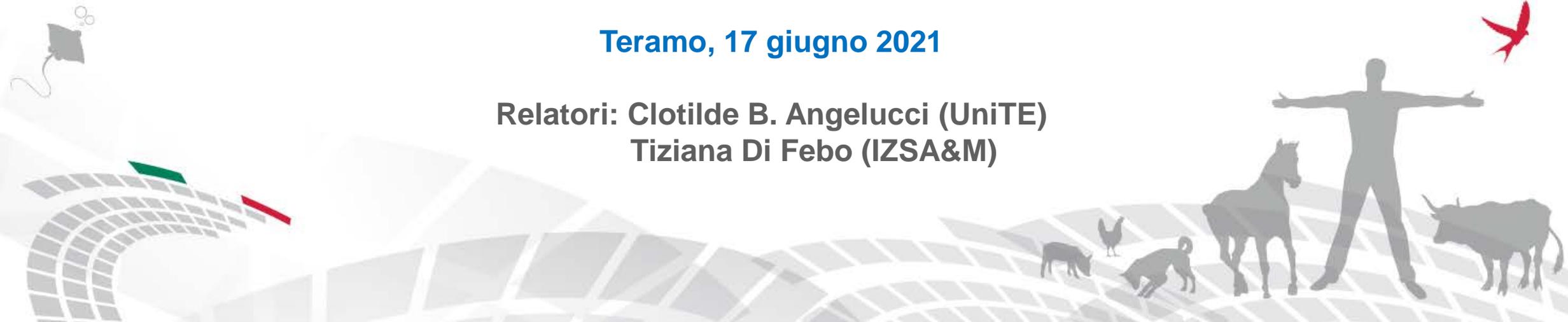


"Infezione da *Brucella ceti* nei Cetacei: Indagini sieroepidemiologiche e neuropatogenetiche, con particolare riferimento al sistema endocannabinoide di *Stenella coeruleoalba*"

" I risultati della ricerca corrente condotta dall'IZSA&M "

Teramo, 17 giugno 2021

**Relatori: Clotilde B. Angelucci (UniTE)
Tiziana Di Febo (IZSA&M)**



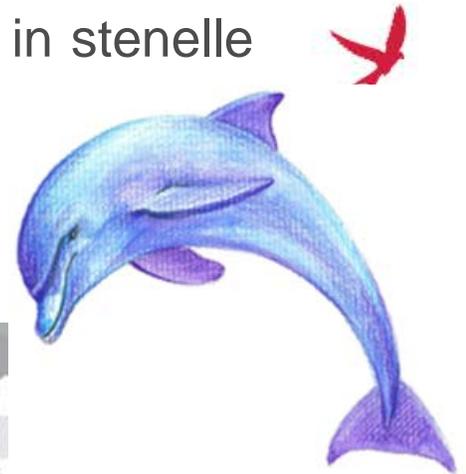
Brucella ceti

- **1994**: prime segnalazioni di infezioni da *Brucella* spp. nei mammiferi marini, in pinnipedi rinvenuti spiaggiati in Scozia ed in un feto di tursiope spiaggiatosi a San Diego, California.
- L'ingresso dell'infezione da *B. ceti* nella cetofauna del bacino del Mediterraneo è da considerarsi verosimilmente recente (nessun riscontro fino a tutto il 2014).
- Classificazione iniziale come *Brucella maris*, poi riclassificazione come *B. ceti* e *B. pinnipedialis*, a seguito di studi di tipizzazione (Foster G. *et al*, 2007).
- Proposta di divisione di *B. ceti* in 2 gruppi (*B. delphinii* per Delfinidi e *B. ceti* (?) per Focene) (OIE, 2018).
- Colonie lisce, come *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*.



Brucella ceti

- Rinvenuta in molte specie di cetacei, in tutti i mari.
- Modalità di trasmissione tra mammiferi marini ancora sconosciuta (via sessuale, placenta, feto, fluidi fetali, latte, infezione *in utero*, contatti diretti o indiretti, parassiti?).
- Nei mammiferi marini infezione in molti casi asintomatica.
- Casi clinici: aborto, meningoencefalite, orchite, artrite, discospondilite, ascessi sottocutanei e altre sindromi.
- Tropismo per gli organi riproduttivi e per il sistema nervoso (neurobrucellosi in stenelle striate).



Brucella ceti

- Possibile causa di spiaggiamento (disorientamento, mancanza di coordinazione nei movimenti, opistotono, tremori, convulsioni, incapacità a mantenere il galleggiamento).
- Preoccupazione per gli effetti della brucellosi nelle specie di cetacei in pericolo di estinzione (es. delfino di Maui).
- **Agente zoonotico**
- Sieropositività per *Brucella* in orsi polari che si nutrono di mammiferi marini.
- Fino al 2018, 4 casi umani infettati da brucelle marine: 1 infettato in laboratorio e 3 con causa di infezione incognita (nessun contatto con mammiferi marini; ingestione di pesce crudo o molluschi crudi contaminati?).
- **Importanza della diagnosi di brucellosi nei mammiferi marini.**





Progetto di Ricerca IZS AM 03/16 RC

“*Brucella ceti*: sviluppo di tecniche d’indagine sierologico-epidemiologica ed immunostochimica, con approfondimenti patogenetici dell’infezione”

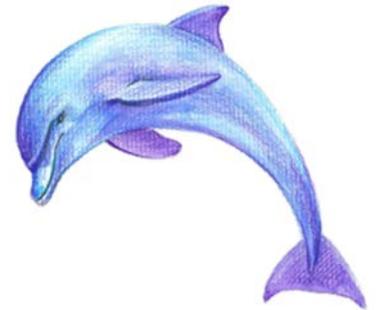
UO1: IZSA&M (Dott.ssa M. Tittarelli)

UO2: IZSA&M (Dott. O. Matteucci)

UO3: IZSA&M (Dott.ssa Gabriella Di Francesco)

UO4: UniTE (Prof. Giovanni Di Guardo)

UO5: IZSPLV – C.Re.Di.Ma. (Dott.ssa Carla Grattarola)

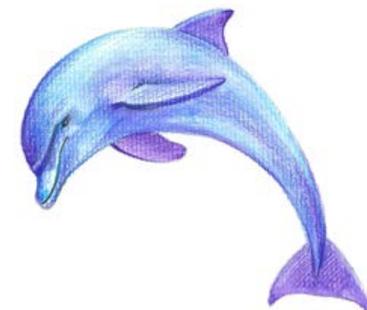


Progetto di Ricerca IZS AM 03/16 RC

Sviluppo di tecniche d'indagine siero-epidemiologica per *Brucella ceti*

Obiettivi del progetto:

- Sviluppo e standardizzazione di tecniche sierologiche (SAR e ELISA competitiva) nei confronti di *B. ceti*, utilizzabile in animali spiaggiati.
- Comparazione di antigeni "omologhi" (*B. ceti*) ed "eterologhi" (*B. abortus* S99) per diagnosi sierologiche.
- Messa a punto di tecniche d'indagine immunoistochimica nei confronti dell'infezione da *B. ceti*, basate sull'impiego di anticorpi monoclonali e di tessuti sia di recente acquisizione che d'archivio.
- Approfondimento neuropatogenetico dell'infezione da *B. ceti* nella stenella striata (*Stenella coeruleoalba*).



Progetto di Ricerca IZS AM 03/16 RC

Sviluppo di tecniche d'indagine sierologico-epidemiologica per *Brucella ceti*

Campioni analizzati:

Siero, sangue, liquido cefalorachidiano, umor acqueo, liquido pericardico prelevati dai seguenti animali rinvenuti spiaggiati sulle coste di Liguria, Abruzzo, Calabria e Sicilia nel periodo 2012-2021 e inviati a IZSPLV, IZSA&M, IZSMe e IZS Sicilia:

- 53 stenelle striate (5 positive per *B. ceti*, 37 negative e 11 non testate per *B. ceti*)
- 14 tursiopi (13 negativi per *B. ceti* e 1 non testato)
- 2 esemplari di zifio (negativi per *B. ceti*)
- 1 grampo (negativo per *B. ceti*)
- 1 globicefalo (negativo per *B. ceti*)



Progetto di Ricerca IZS AM 03/16 RC
Sviluppo di tecniche d'indagine siero-epidemiologica per *Brucella ceti*



Tursiope (*Tursiops truncatus*)



Stenella striata (*Stenella coeruleoalba*)



Grampo (*Grampus griseus*)



Zifio
(*Ziphius cavirostris*)



Globicefalo
(*Globicephala melas*)



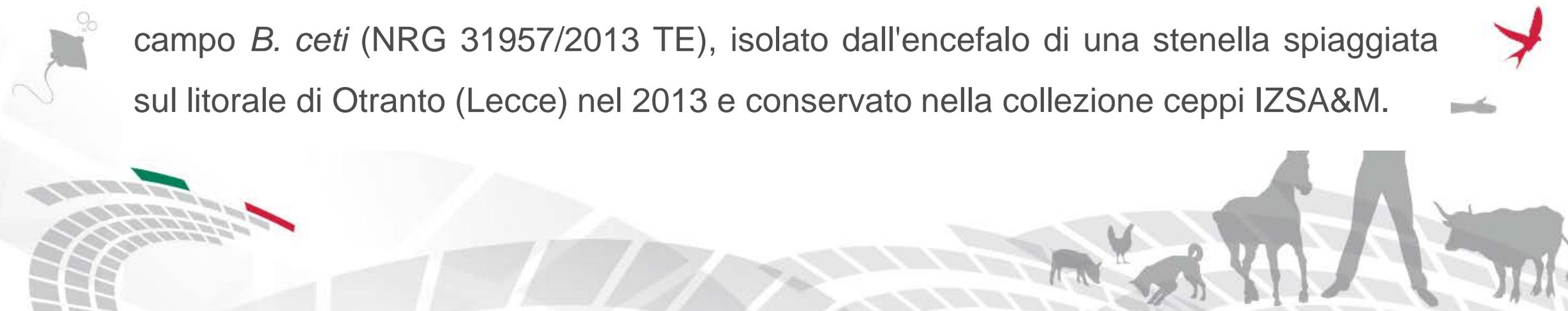
Progetto di Ricerca IZS AM 03/16 RC

Sviluppo di tecniche d'indagine siero-epidemiologica per *Brucella ceti*

Produzione antigeni "omologhi" per SAR e c-ELISA:

- Antigene acido al "Rosa Bengala" per SAR
- Lipopolisaccaride (s-LPS) purificato (3 lotti) per c-ELISA

Produzione secondo procedura Manuale OIE (cap. 3.1.4, 2019) utilizzando il ceppo di campo *B. ceti* (NRG 31957/2013 TE), isolato dall'encefalo di una stenella spiaggiata sul litorale di Otranto (Lecce) nel 2013 e conservato nella collezione ceppi IZSA&M.



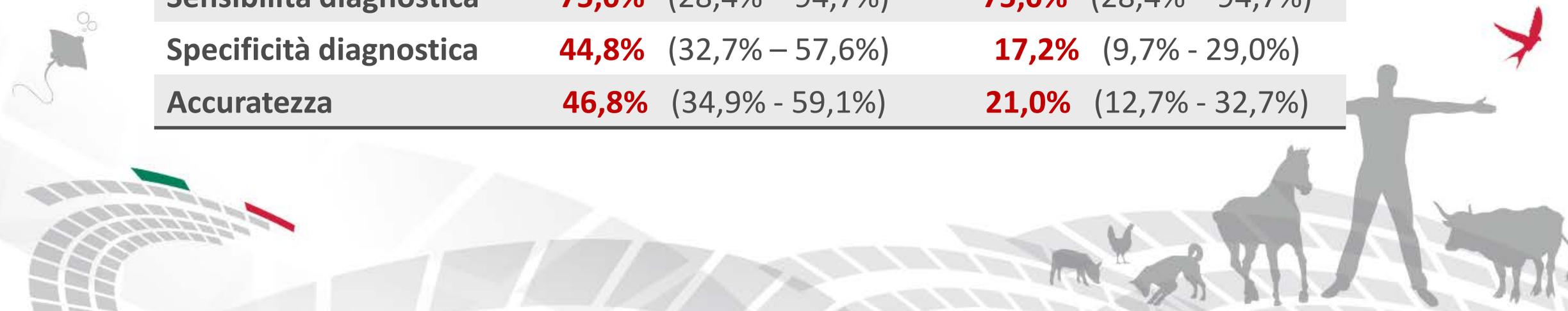


Progetto di Ricerca IZS AM 03/16 RC
Sviluppo di tecniche d'indagine siero-epidemiologica per *Brucella ceti*

Sieroagglutinazione rapida (SAR)

- Testati 89 campioni di siero, sangue ed altri fluidi biologici.
- 21 campioni hanno fornito risultati non interpretabili (fortemente emolitici)

	Antigene "omologo"	Antigene "eterologo"
Sensibilità diagnostica	75,0% (28,4% – 94,7%)	75,0% (28,4% – 94,7%)
Specificità diagnostica	44,8% (32,7% – 57,6%)	17,2% (9,7% - 29,0%)
Accuratezza	46,8% (34,9% - 59,1%)	21,0% (12,7% - 32,7%)



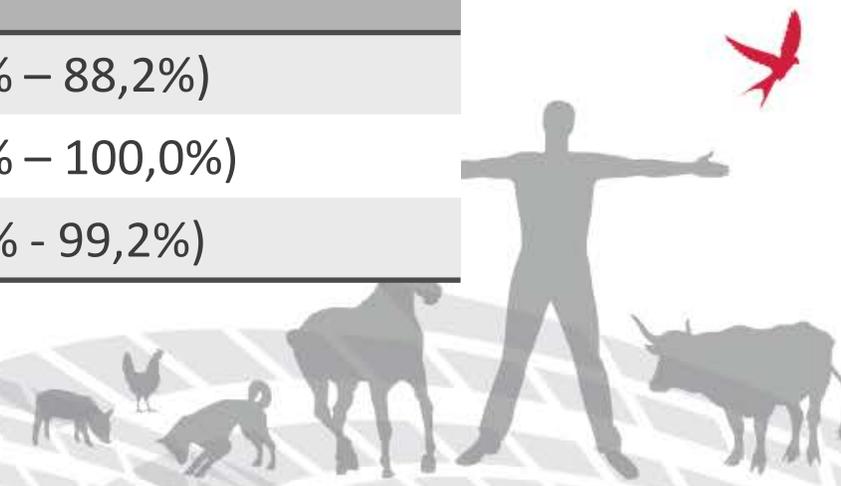


Progetto di Ricerca IZS AM 03/16 RC
Sviluppo di tecniche d'indagine siero-epidemiologica per *Brucella ceti*

ELISA competitiva

- Testati 89 campioni di siero, sangue ed altri fluidi biologici.
- Anticorpo monoclonale 4B5A anti-LPS *Brucella* spp (IZSA&M) (Portanti O. *et al*, 2006; Di Febo T. *et al*, 2012; Di Francesco G. *et al.*, 2020)

	Antigene "omologo" - Antigene "eterologo"	
Sensibilità diagnostica	60,0%	(22,3% – 88,2%)
Specificità diagnostica	100,0%	(96,1% – 100,0%)
Accuratezza	97,5%	(91,4% - 99,2%)





Progetto di Ricerca IZS AM 03/16 RC
Sviluppo di tecniche d'indagine siero-epidemiologica per *Brucella ceti*

Conclusioni:

Le metodiche sierologiche esaminate in questo progetto di ricerca sono applicabili ai cetacei spiaggiati, tuttavia:

- La tipologia di antigene ("omologo" o "eterologo") sembra avere influenza sui risultati (specificità) della SAR, ma non su quelli della c-ELISA → **FALSI POSITIVI**
- Il grado di conservazione/decomposizione degli animali spiaggiati potrebbe influenzare la qualità dei campioni da sottoporre ad analisi sierologiche → Possibile degradazione degli anticorpi / Reazioni aspecifiche → **FALSI NEGATIVI E FALSI POSITIVI**





Progetto di Ricerca IZS AM 03/16 RC

Sviluppo di tecniche d'indagine siero-epidemiologica per *Brucella ceti*

Criticità :

- Campioni prelevati da animali morti, spesso in condizioni non ottimali di conservazione.
- Necessità di stimare la «durata» degli anticorpi nei campioni da utilizzare per analisi sierologiche.
- Necessità di effettuare prove con sieri freschi (da animali di acquario?) per valutare l'influenza della «freschezza» dei campioni sulla specificità della SAR.
- Risultati non interpretabili in SAR con campioni eccessivamente emolitici.





Progetto di Ricerca IZS AM 03/16 RC
Sviluppo di tecniche d'indagine siero-epidemiologica per *Brucella ceti*

Ringraziamenti:

- *Dr. Gianluca Orsini, Dott.ssa Luigina Sonsini (UO 2, Dr. O. Matteucci)*
- *Dott.ssa Daniela Averaimo, Dott.ssa Ludovica Di Renzo (UO3, Dott.ssa G. Di Francesco)*
- *Dott.ssa Clotilde B. Angelucci, Dott.ssa Cristina E. Di Francesco, Dott.ssa Baffoni, Dott. Roberto Giacomini Stuffer (UO4, Prof. G. Di Guardo)*
- *Dott.ssa Barbara Iulini, Dott.ssa Katia Varello (UO5, Dott.ssa C. Grattarola)*





**Grazie a tutti per
l'attenzione !!!**

