



ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO



CRN Brucellosi

Centro di Referenza Nazionale

Protocollo per la gestione di un allevamento in cui si sospetti la vaccinazione non autorizzata con vaccino RB51

Fabrizio De Massis

Seminario "La Brucellosi tra diagnostica e ricerca"

Teramo, 11 - 12 ottobre 2012



Introduzione

- **Decisione della Commissione Europea 2002/598/CE**
 - L'autorità competente presenta alla Commissione e agli altri Stati membri informazioni dettagliate relative al programma di vaccinazione, in particolare la zona di vaccinazione, l'età degli animali da vaccinare e **il sistema di test utilizzato per identificare gli animali vaccinati.**
- In caso di vaccinazione in età prepubere gli anticorpi anti-RB51 scompaiono dopo circa cinque mesi e mezzo
- La prova di intradermoreazione alla brucellina è in grado di identificare gli animali infetti da *B. abortus* ma negativi a SAR e FDC
 - (Sensibilità=70%-75% - Specificità=95%-100%)
- Produzione, standardizzazione e valutazione di una brucellina RB51 omologa e studio di un sistema di test per identificare bovini vaccinati con RB51



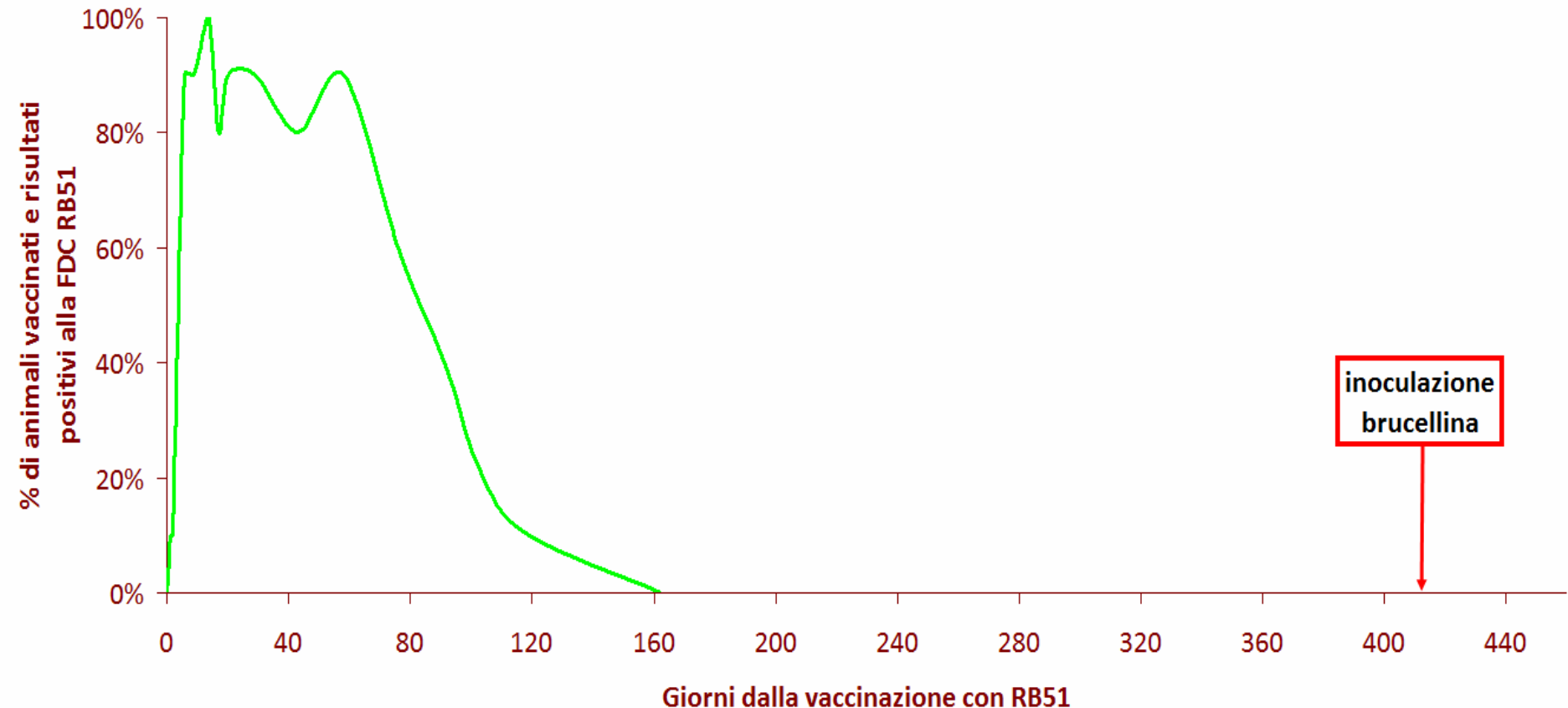
Materiali e metodi

- **15 bovine di razza frisona, di età compresa tra 4 e 6 mesi**
 - 10 vaccinate con 2 ml di vaccino RB51 (10×10^9 CFU)
 - 5 mantenute come controlli (2 ml di soluzione salina sterile)
- **Brucellina RB51 prodotta dall'ICT**
 - Manuale OIE per sterilità e innocuità
 - Bercovich et al., 1998 (EU Ph. For TB) per la potenza,
- **Brucellina Commerciale**
 - Brucellergene OCB[®] (Synbiotics corporation, France)
- **SAR e FDC classiche (Manuale dell'OIE, 2004)**
- **FDC-RB51 secondo Adone *et al.* (1999; 2001)**



Materiali e metodi

- Inoculazione intradermica: 414 gg dalla vaccinazione
 - 0,1 ml di Brucellina RB51 e 0,1 ml di Brucellergene OCB[®]



Materiali e metodi

- SAR e FDC classiche, FDC e FDC-RB51:
 - Giorni 6, 9, 13, 16, 20, 28 e 34 dalla inoculazione delle brucelline
- Ossia:
 - Giorni 420, 423, 427, 430, 434, 442, e 448 dalla inoculazione delle brucelline



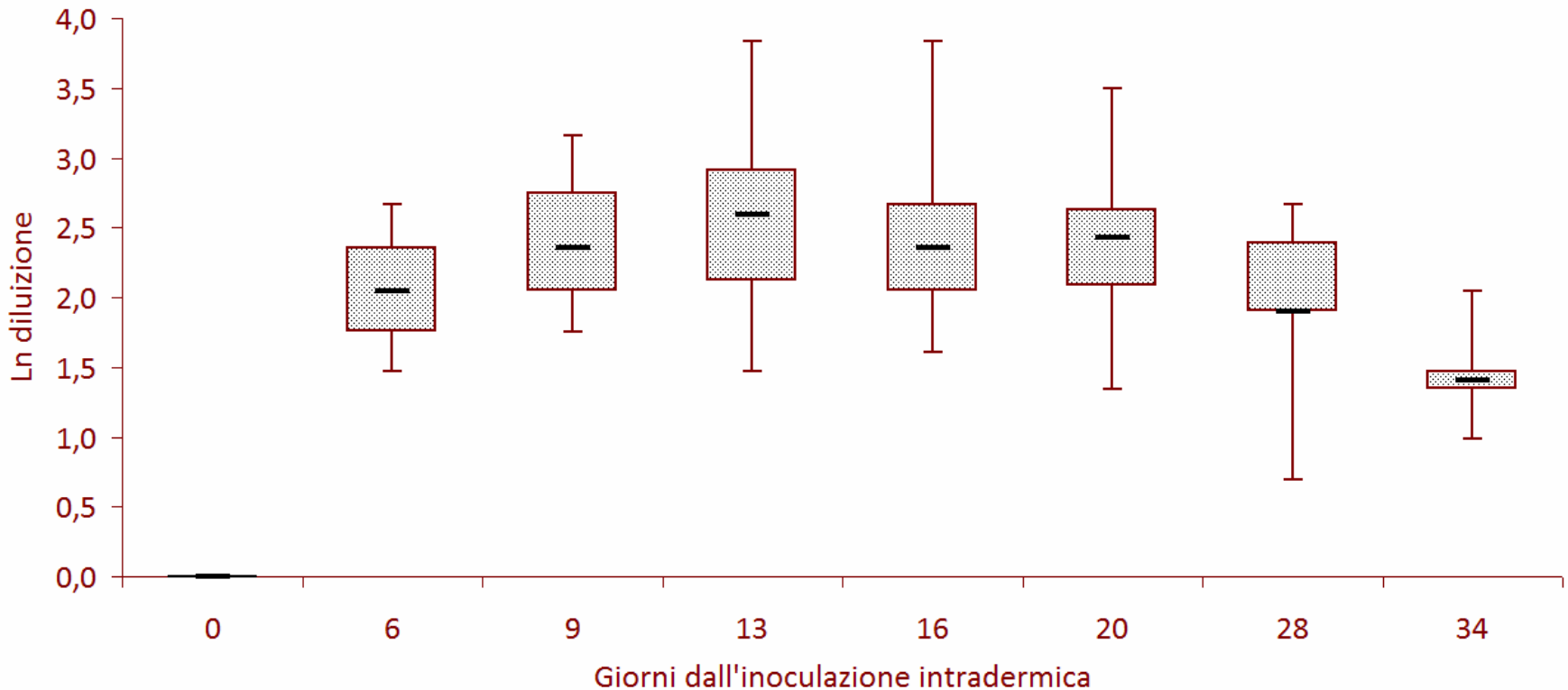
Risultati: inoculazione Brucelline

Sensibilità, specificità delle brucelline, e intervalli di credibilità al 95% in relazione all'aumento di spessore della cute al sito d'inoculo (72h)

Soglia di positività	Allergene	Sensibilità	Specificità
>0 mm	Brucellina RB51	70% (39-89,1%)	80% (35,9-95,7%)
	Brucellergene OCB [®]	50% (23,4-76,6%)	100% (41,8-100%)
≥0,5 mm	Brucellina RB51	70% (39-89,1%)	80% (35,9-95,7%)
	Brucellergene OCB [®]	50% (23,4-76,6%)	100% (41,8-100%)
≥1 mm	Brucellina RB51	60% (30,8-83,3%)	100% (41,8-100%)
	Brucellergene OCB [®]	40% (16,7-69,2%)	100% (41,8-100%)
≥1,5 mm	Brucellina RB51	40% (16,7-69,2%)	100% (41,8-100%)
	Brucellergene OCB [®]	30% (10,9-61%)	100% (41,8-100%)
≥2 mm	Brucellina RB51	40% (16,7-69,2%)	100% (41,8-100%)
	Brucellergene OCB [®]	10% (2,3-41,3%)	100% (41,8-100%)

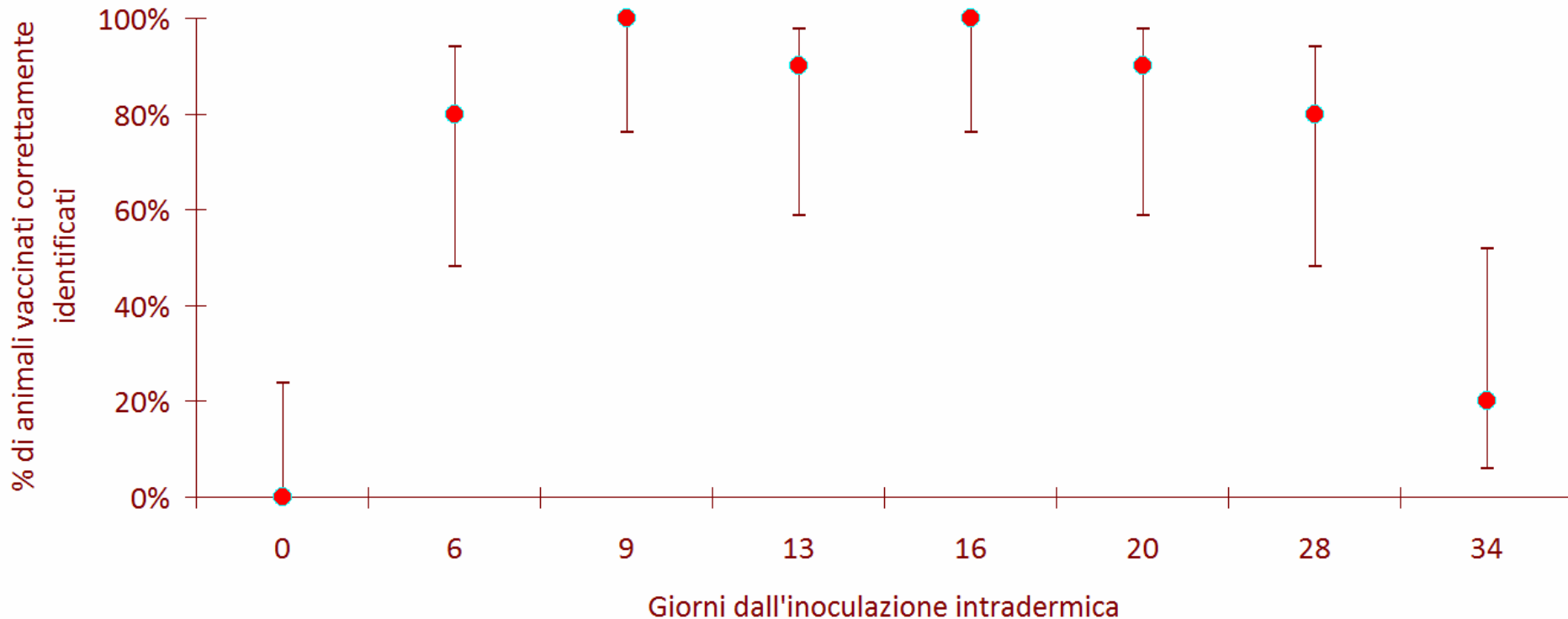
Risultati: sierologia

- SAR e FDC classiche: entrambe negative
- Titoli FDC-RB51 nelle bovine vaccinate:



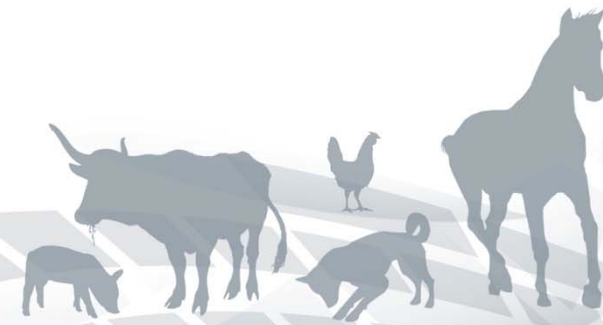
Risultati: FDC-RB51

Distribuzione percentuale degli animali saggiati e correttamente identificati come vaccinati con RB51



Discussione

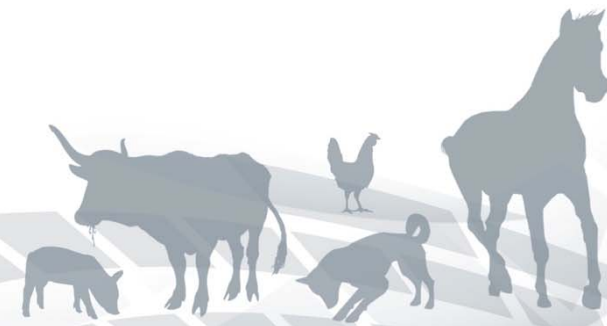
- Se si pone la soglia d'ispessimento = ≥ 1 mm
 - Se = 60% ; Sp = 100% per la brucellina RB51
 - Se = 40% ; Sp = 100% per Brucellergene OCB®
 - La differenza non è risultata significativa
- La prova di inoculazione intradermica ha una bassa sensibilità = il suo uso è limitato a test di screening





Discussione

Possibilità di compensare la bassa sensibilità della prova intradermica tramite l'associazione con la FDC-RB51

- Tutte le bovine di controllo hanno dato risultato negativo alla FDC-RB51
 - Tutte le bovine vaccinate hanno dato risultato positivo alla prova FDC-RB51 al giorno 9 e al giorno 16 dall'inoculazione della brucellina
 - Almeno 9 bovine su 10 ($Se=90\%$) hanno dato risultato positivo alla FDC-RB51 tra il giorno 9 e il giorno 20 dall'inoculazione della brucellina
 - Le due bovine vaccinate che sono risultate negative alla FDC-RB51 al giorno 13 e al giorno 20 rispettivamente, sono risultate positive alla intradermoreazione alla brucellina RB51
-
- L'uso della intradermoreazione alla brucellina RB51 e della FDC-RB51 in parallelo ha identificato tutti gli animali vaccinati sperimentalmente con vaccino RB-51



Conclusioni

- 
- La prova intradermica può essere usata per identificare gli allevamenti dove è stato fatto uso di vaccino RB51
- Entrambi gli antigeni (RB51 and Brucellergene) possono essere usati, purché si abbia in considerazione la loro differente sensibilità
 - La brucellina RB51 produce una risposta umorale anamnesticamente rilevabile con la FDC- RB51
 - I risultati dello studio suggeriscono che l'associazione tra Brucellina RB51 e FDC-RB51 possa rappresentare un sistema diagnostico affidabile ai fini dell'identificazione degli animali vaccinati con RB51
- 

Approfondimenti

• **F. De Massis, A. Giovannini, G.F. Ronchi, M. Tittarelli, M. Di Ventura, D. Nannini & V. Caporale**

- Uso della fissazione del complemento e del test d'intradermoreazione alla brucellina per identificare bovini vaccinati con *Brucella abortus* ceppo RB51
- Use of complement fixation and brucellin skin tests to identify cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51

- **Volume 41 (4) October-December 2005 281-299**



- http://www.izs.it/vet_italiana/2005/summ4/291.htm



Aspetti di Sanità Pubblica


RB51 è resistente alla rifampicina

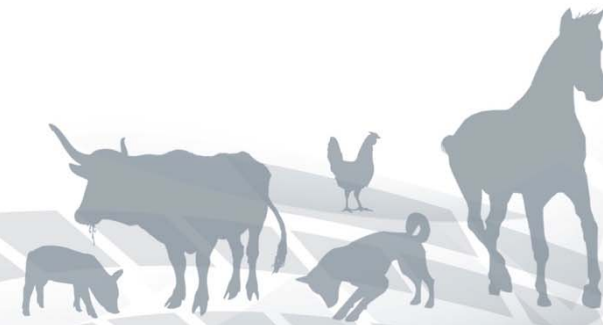
- il principale antibiotico utilizzato nella terapia dell'infezione umana da *Brucella* spp., in particolare nei pazienti che non possono essere trattati con streptomicina
 - donne in gravidanza
 - bambini
 - casi di endocardite brucellare
 - neurobrucellosi

• Sierologia negativa nell'uomo

- l'infezione nell'uomo non è rilevabile a meno di uno specifico sospetto,

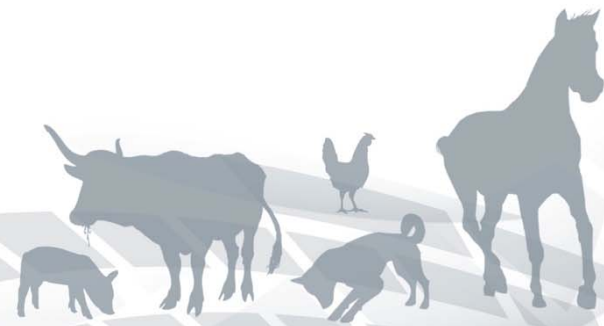


- 
- **Il ceppo vaccinale viene eliminato con il latte**
 - quando la vaccinazione è eseguita durante la lattazione
 - per periodi di tempo anche prolungati
 - in maniera intermittente e non continua nel tempo
 - **RB51 somministrato a bovine gravide può esitare in aborto**
 - Rischio di dispersione del ceppo vaccinale nell'ambiente attraverso gli invogli e liquidi fetali



Aspetti di Sanità Pubblica

- L'utilizzo del vaccino vivo RB51, pertanto, può essere autorizzato unicamente dal Ministero della Salute, nell'ambito di uno specifico protocollo sanitario che ne preveda l'utilizzo sotto lo stretto controllo dei servizi veterinari ufficiali, con l'applicazione di tutte le misure atte a ridurre i possibili rischi per la salute animale e pubblica.



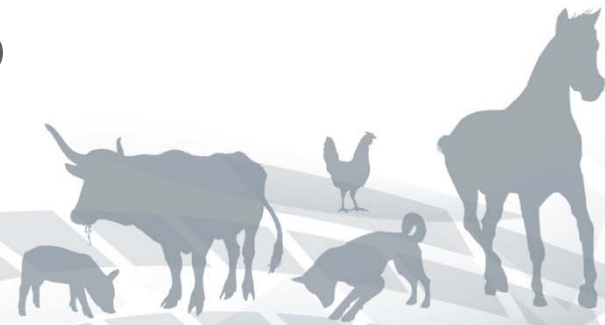
Per confermare il sospetto di utilizzo non autorizzato di vaccino vivo RB51 è possibile sottoporre gli animali al seguente protocollo diagnostico:

- prelievo di sangue da sottoporre FDC-RB51 (prelievo tempo zero),
- prova brucellinica RB51 su tutti i capi presenti in azienda, di età superiore all'anno,
- ulteriore prelievo di sangue a distanza di 9-16 giorni da sottoporre alla prova di FDC-RB51.



Protocollo

- È altresì utile poter disporre di un **flacone** del vaccino sequestrato al fine
 - tipizzare il ceppo con cui è stato prodotto,
 - verificarne la purezza,
 - verificare la carica batterica in CFU/ml,
 - escludere la presenza di germi contaminanti.
- Se ritenuto opportuno, potranno essere prelevati **campioni biologici** per una **identificazione genetica** degli animali presenti in allevamento



Misure sanitarie

- **Misure sanitarie da applicare in caso di utilizzo non autorizzato di vaccino vivo RB51**
- la vaccinazione non esclude la possibilità che gli animali si infettino con il ceppo selvaggio di *Brucella abortus*,
- la presenza di animali positivi alle prove ufficiali per brucellosi **non può essere dovuta a reazione di origine vaccinale**, ma è evidenza della presenza dell'infezione brucellare all'interno dell'allevamento.
- Il risanamento dell'allevamento deve sicuramente iniziare utilizzando le prove ufficiali per individuare i capi infetti da *Brucella abortus*, abbattendo i capi risultati positivi.



Protocollo

ANIMALI ADULTI
Esami per *Brucella*
abortus ceppo selvaggio

positivo

negativo

Abbattimento

STOP

*Controllo
brucellosi
normale con
antigene
ufficiale*



Misure sanitarie

- In caso di somministrazione non autorizzata di RB51, non possono essere note:
 - le dosi e le modalità di somministrazione,
 - la durata dell'eliminazione del ceppo vaccinale con il latte,
 - il titolo batterico al quale questo viene eliminato.
- Non è possibile basarsi sui dati riportati nella letteratura scientifica, che si basano su somministrazioni in condizioni controllate
- Sono pertanto necessarie misure supplementari di tutela della salute pubblica




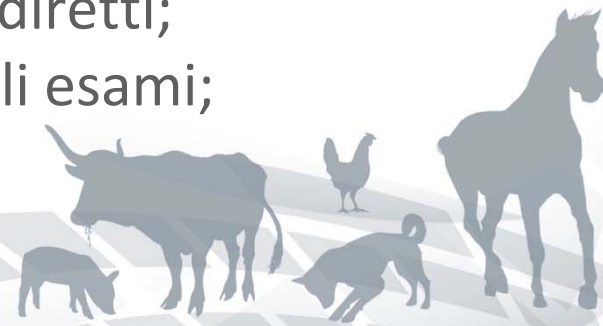
Misure sanitarie

- **isolamento di tutti gli animali** per i quali è possibile accertare l'avvenuta somministrazione del vaccino,
- **divieto di utilizzo per alimentazione umana del latte**
 - proveniente dagli animali infetti (ceppo selvaggio),
 - proveniente da tutti quegli animali per i quali non possa essere esclusa l'avvenuta vaccinazione.
- **parto in condizioni di isolamento,**
- **esami diretti per la ricerca di *Brucella abortus* ceppo RB51**
 - su liquidi vaginali e latte,
 - al momento del parto successivo degli animali per i quali non possa essere esclusa l'avvenuta vaccinazione,
- **controlli sugli animali che non hanno ancora raggiunto la pubertà**
 - allo scopo di escludere la persistenza dell'infezione da RB51.



Riacquisizione qualifica

- 
- macellare tutti i capi che hanno reagito positivamente
 - alla prova brucellinica o
 - alla FDC- RB51;
 - mandare possibilmente in asciutta i capi negativi rimanenti
 - effettuare regolarmente la fecondazione e portare avanti la gravidanza di questi animali
 - possibilmente sincronizzando le fecondazioni in maniera da facilitare l'isolamento individuale o almeno per piccoli gruppi di animali al momento del parto;
 - ripetere settimanalmente per almeno 3 volte il prelievo e gli esami sul latte dopo il parto
 - abbattere i capi risultati positivi agli esami diretti;
 - liberalizzare i capi risultati negativi a tutti gli esami;



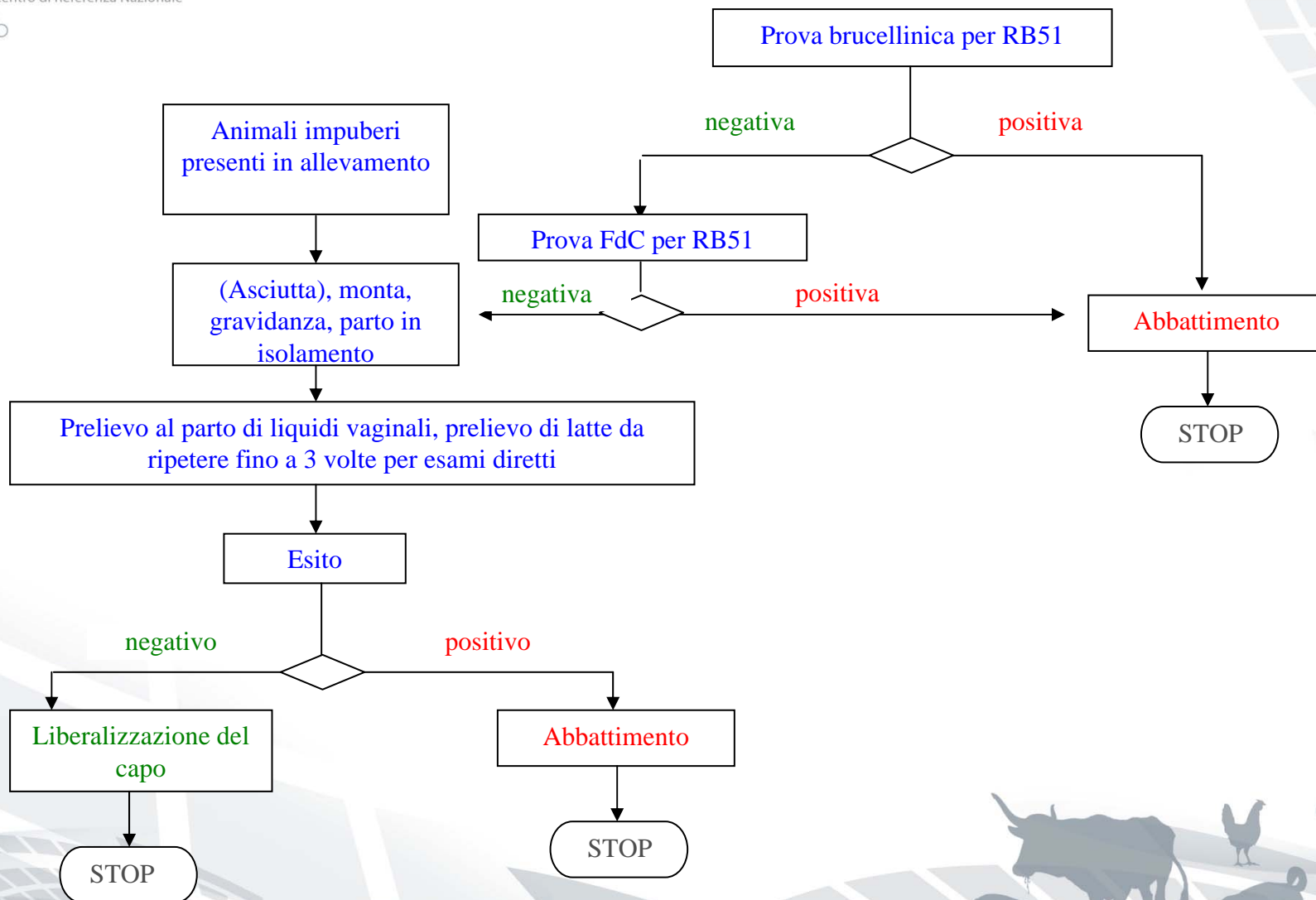
Riacquisizione qualifica

- l'allevamento rimarrà con qualifica sanitaria sospesa sino a che:
 - non siano eliminati tutti gli animali per i quali sarà stata accertata l'utilizzo non autorizzato del vaccino vivo RB51
 - non saranno state effettuate tutte le prove necessarie per riacquisire la qualifica di ufficialmente indenne da brucellosi previste dalla legislazione vigente





Protocollo



**Grazie per
l'attenzione**

