

## Uso della fissazione del complemento e del test d'intradermoreazione alla brucellina per identificare bovini vaccinati con *Brucella abortus* ceppo RB51

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

### Riassunto

Nell'Unione Europea l'uso del vaccino RB51 per l'immunizzazione di bovini a rischio d'infezione con *Brucella abortus* è consentito solo in condizioni strettamente controllate. Di conseguenza, è necessario un sistema diagnostico in grado di distinguere gli animali vaccinati dai non vaccinati. Gli autori, al fine di avvalersi di uno strumento diagnostico rapido e accurato, hanno prodotto, controllato e valutato una brucellina sperimentale, ottenuta dal ceppo RB51 (brucellina RB51). L'efficacia di tale brucellina è stata valutata in cavie sensibilizzate con *B. abortus* RB51 e comparata con una brucellina disponibile in commercio. Gli allergeni hanno dimostrato sulle cavie un'attività biologica analoga. L'inoculazione intradermica della brucellina RB51 è stata eseguita a 414 giorni dalla vaccinazione su 10 bovini vaccinati in età prepubere, quando risultavano negativi alla FdC-RB51. Il Test cutaneo ha mostrato una sensibilità del 60% (con intervallo di confidenza al 95% [IC] 30,8%-83,3%) e una specificità del 100% (IC 60,7%-100%), relegando l'utilità della prova a screening di massa al fine di individuare gli allevamenti in cui il vaccino è stato utilizzato, non i singoli capi. Tuttavia, a seguito dell'inoculazione intradermica della brucellina RB51, è stato osservato un transitorio rialzo anticorpale alla FdC-RB51 dal giorno 9 al giorno 20 post-inoculazione. Tale rialzo anticorpale, analizzato in parallelo con i

risultati del test d'ipersensibilità ritardata, consente di individuare singolarmente i capi vaccinati (sensibilità 100%; IC 76,2%-100%).

### Parole chiave

*Brucella*, Brucellina, Brucellosi, Bovine, Diagnosi, Fissazione del Complemento, Ipersensibilità, RB51.

### Introduzione

L'Unione Europea ha autorizzato per la prima volta nel 2002 l'utilizzo del vaccino *Brucella abortus* ceppo RB51 (RB51) per l'immunizzazione di bovine a rischio di infezione con *B. abortus* (Decisione della Commissione Europea 2002/598/CE del 15 luglio 2002) (12). L'Autorità Competente dello Stato membro deve presentare, alla Commissione e agli altri Stati membri, informazioni dettagliate sul programma di vaccinazione, in particolare per quanto concerne l'area in cui la vaccinazione sarà applicata, l'età degli animali da vaccinare e il sistema diagnostico utilizzato per identificare gli animali vaccinati. Inoltre, l'Autorità Competente deve assicurare che gli animali vaccinati non siano soggetti a scambi intracomunitari, in particolare mediante l'applicazione di metodi addizionali d'identificazione e registrazione.

Il vaccino RB51, mutante in fase rugosa del ceppo virulento *B. abortus* 2308, non induce in bovini sani la formazione d'anticorpi rilevabili con le tecniche sierologiche previste dalla normativa europea (22, 23). Tali anticorpi, comunque, possono

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo & del Molise «G. Caporale» (IZSA&M), Campo Boario, 64100 Teramo, Italia

essere rilevati con prove specifiche, quali il test dot-blot (17), e la fissazione del complemento con antigene specifico RB51 (FdC-RB51) (1, 2). Tuttavia, i bovini infetti da *B. abortus*, anche se vaccinati con RB51, reagiscono alle prove sierologiche classiche previste dalla normativa europea (8). L'infezione brucellare nei bovini può essere evidenziata anche mediante l'intradermoreazione alla brucellina, un test d'ipersensibilità ritardata. In bovine infette da *B. abortus* Il test ha una specificità compresa tra 95% e 100% e una sensibilità tra 70% e 75% (15).

Precedenti ricerche sull'intradermoreazione in bovini vaccinati con RB51 hanno dato risultati controversi, sia con la brucellina preparata con estratti proteici di *B. abortus*, sia con la brucellina omologa RB51 (7, 8, 9). Successive ricerche hanno però indicato che l'attività biologica (potenza), essendo influenzata dalle procedure di produzione, dovrebbe essere stimata, e la brucellina utilizzata, in accordo alle norme della Farmacopea Europea per la tubercolina (accettabile se maggiore del 66% e inferiore o uguale al 150% dell'antigene di riferimento), al fine di garantire la capacità dell'intradermoreazione a rilevare l'infezione (6). Scopo del presente lavoro è quello di valutare la capacità di una brucellina omologa RB51 di individuare bovini vaccinati con RB51 a più di un anno dalla vaccinazione e di valutare la possibilità che quest'allergene possa indurre una risposta umorale anamnestic.

## Materiali e metodi

### *Animali e vaccinazione*

Quindici bovine di razza frisone, d'età compresa fra quattro e sei mesi, provenienti da allevamenti Ufficialmente Indenni da Brucellosi bovina, sono state selezionate in maniera casuale e divise in due gruppi di cinque e dieci animali.

Dieci animali sono stati vaccinati, per via

sottocutanea, con RB51 secondo le indicazioni della ditta produttrice (2 ml di sospensione vaccinale ricostituita, pari a  $10 \times 10^9$  Unità Formanti Colonia [UFC]).

Cinque animali di controllo sono stati inoculati, per via sottocutanea, con 2 ml di soluzione fisiologica sterile.

### *Vaccino*

Il vaccino RB51 è stato gentilmente fornito dalla ditta CZ Veterinaria di Pontevedra (Spagna), che lo produce e lo distribuisce in Europa su licenza della Colorado Serum Company di Denver (USA). Il vaccino ricostituito conteneva  $5 \times 10^9$  UFC per ml di *B. abortus* ceppo RB51.

### *Brucelline*

#### **Brucellina commerciale**

Brucellergene OCB, equivalente commerciale della brucellina dell'*Institut national de la recherche agronomique* (INRA) (16), è stato usato come standard di riferimento.

#### **Brucellina RB51**

La brucellina RB51 è stata prodotta secondo il metodo descritto di seguito. Il vaccino liofilizzato, ricostituito secondo le indicazioni della Ditta fornitrice è stato seminato su piastre contenenti glycerol dextrose agar. Dopo 48 ore d'incubazione in aerobiosi a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ , singole colonie sono state raccolte e inoculate in provette a becco di clarino contenenti glycerol dextrose agar. Dopo incubazione a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  per 48 ore, la pasta batterica di ciascuna provetta è stata raccolta con 5 ml di soluzione fisiologica sterile, esaminata per purezza (colorazione di Gram) e utilizzata per seminare 60 fiasche Roux contenenti glycerol dextrose agar. La pasta batterica è stata raccolta con soluzione fisiologica sterile (10 ml per Roux), dopo incubazione a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  per 96 ore. Dopo il controllo di purezza (colorazione di Gram) e di fase (3), la sospensione batterica è stata inattivata a bagnomaria a  $70 \pm 2^\circ\text{C}$  per 90 minuti, quindi sottoposta a centrifugazione a  $10.000 \times g$

per 30 minuti a  $+4^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Il surnatante quindi è stato eliminato e le cellule sospese in acqua ultrapura sterile (1:40 p/v). La sospensione è stata posta in agitazione per un'ora ed il pH portato a 9,6 con una soluzione di NaOH 0,5 N e quindi autoclavata per 120 minuti a vapore fluente, raffreddata a temperatura ambiente e nuovamente centrifugata a  $10.000 \times g$  per 30 minuti a  $+4^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Il surnatante è stato addizionato con acido Tricloracetico (ATC) al 40% (1:10 v/v) e posto a temperatura ambiente per 24 ore. Il precipitato ottenuto è stato sospeso in ATC all'1% (1:10 v/v) e nuovamente tenuto a temperatura ambiente per 24 ore. Il precipitato è stato sottoposto a due lavaggi con soluzione di cloruro di sodio al 5% in acqua addizionata con lo 0,5% di fenolo all'85%, fino ad ottenere un pH pari a  $2,6 \pm 0,1$ . Dopo avere eliminato il surnatante, il precipitato è stato centrifugato a  $6.000 \times g$  per 20 minuti a  $+4^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e risospeso in tampone fosfato a pH 11 al 40% (p/v) della pasta batterica iniziale. Dopo agitazione per un'ora e diluizione 1:10 (v/v) con tampone fosfato pH 7,2 è stato misurato il titolo proteico con metodo Kjeldhal. La sospensione è stata quindi diluita in tampone fosfato pH 7,2 con sodio mertiolato allo 0,01% alla concentrazione proteica di 1 mg/ml (14).

#### Controlli

I controlli di sterilità e innocuità della brucellina RB51 sono stati eseguiti secondo le prescrizioni del *Manuale* dell'OIE (16). I controlli d'efficacia (attività biologica) sono stati condotti secondo una tecnica già descritta in letteratura (5), con le seguenti modifiche.

Sono state utilizzate 12 cavie albine di peso variabile da 350 a 400 g. Sei cavie sono state sensibilizzate tramite inoculazione per via sottocutanea di 1 ml di vaccino RB51 ( $5 \times 10^9$  UFC); le altre sei, utilizzate come controllo, sono state inoculate sempre per via sottocutanea con 1 ml di soluzione fisiologica sterile. A 30 giorni dall'inoculazione, previa

depilazione dei fianchi destro e sinistro, tutte le cavie hanno ricevuto, per via intradermica, 0,1 ml brucellina RB51 e 0,1 ml di Brucellergene OCB ciascuna alle diluizioni 1:20, 1:100 e 1:500. Per evitare errori legati alla sensibilità cutanea locale del sito d'inoculo, le dosi e i siti sono stati codificati e randomizzati. In totale, ciascuna cavia ha ricevuto 3 inoculazioni per ogni fianco. La lettura delle reazioni è stata eseguita misurando con calibro il diametro dell'eritema di reazione di ciascuna diluizione degli allergeni a 24 e a 48 ore dall'inoculazione intradermica.

L'attività biologica della brucellina RB51 è stata stimata come descritto nella Farmacopea Europea per la tubercolina (accettabile se maggiore del 66% e inferiore o uguale al 150% dell'attività biologica dell'antigene di riferimento), considerando l'attività biologica della Brucellina standard (Brucellergene OCB) pari al 100%.

#### Test di intradermoreazione

Quattrocentoquattordici giorni dopo la vaccinazione, in tutte le bovine (vaccinate e di controllo), sono stati tosati, mediante forbici, 10 cm<sup>2</sup> di cute sana su entrambi i lati del collo. Tramite siringa da tubercolina gli animali sono stati inoculati per via intradermica con 0,1 ml di brucellina RB51 (lato destro del collo) e 0,1 ml di Brucellergene OCB (lato sinistro del collo). La reazione è stata letta a 24 h, 48 h e 72 h dall'inoculazione per differenza di spessore della cute al punto di inoculo con lo spessore della stessa al giorno zero. Per la misurazione dello spessore della cute è stato utilizzato un cutimetro millimetrato a molla.

#### Test sierologici

Tutte le bovine sono state esaminate per la presenza di anticorpi anti-*B. abortus* e anti-RB51 prima della vaccinazione, immediatamente prima dell'inoculazione delle brucelline (a.b.i) e successivamente a 6, 9, 13, 16, 20, 28 e 34 giorni dopo l'inoculazione delle brucelline (p.b.i.). Gli anticorpi anti-*B. abortus* sono

stati ricercati mediante sieroaagglutinazione rapida con antigene Rosa Bengala (SAR) e fissazione del complemento (FdC) secondo le metodiche descritte nel *Manuale* dell'OIE (16). Gli anticorpi specifici anti-RB51 sono stati ricercati con FdC specifica eseguita con antigene RB51 (FdC-RB51) (1, 2).

#### Analisi statistica

Per ciascuna delle cavie inoculate, per ciascuna diluizione di brucellina, sono stati calcolati media, intervalli di confidenza (IC) della media e coefficiente di variazione dei diametri dell'eritema di reazione. Per evidenziare differenze statisticamente significative all'interno di ciascuna diluizione nella risposta ai due allergeni, è stato applicato il test di Wilcoxon (21), confrontando diluizioni analoghe dei due preparati.

L'attività biologica della brucellina RB51 è stata stimata secondo le raccomandazioni che la Farmacopea Europea (6, 10), fornisce per la tubercolina, usando Brucellergene OCB come standard di riferimento (considerato avente attività biologica pari a 100%).

Le distribuzioni dei valori di sensibilità e specificità d'entrambi gli allergeni sono state stimate ricorrendo ad un approccio Bayesiano (20). Le probabilità dei differenti possibili valori di sensibilità e specificità

sono state stimate usando una funzione di probabilità binomiale e una distribuzione a priori non informativa *Uniforme* (0,1). Una distribuzione a posteriori Beta e gli IC al 95% sono stati calcolati sia per la sensibilità che la specificità (24).

## Risultati

### Controlli sulla Brucellina RB51

I controlli di sterilità e innocuità della brucellina RB51 hanno dato esito favorevole. In Tabella I sono riportati i risultati del controllo dell'attività della brucellina RB51 e della brucellina di riferimento (Brucellergene OCB) eseguiti sulle cavie sensibilizzate. L'attività è espressa come diametro in mm degli eritemi di reazione. Per entrambi gli allergeni, la reazione allergica ha raggiunto il massimo a 24 ore p.b.i., mentre a 48 ore è stata osservata una diminuzione dell'intensità della risposta. In nessuna cavia gli allergeni hanno dato luogo a reazioni avverse. Su nessuna cavia di controllo sono state osservate reazioni d'ipersensibilità ritardata.

Il test di Wilcoxon non ha evidenziato differenze significative dei diametri di reazione alla brucellina RB51 rispetto a Brucellergene OCB alle diluizioni 1:20 (Wilcoxon test  $z=0$ ;  $p>0,05$ ), 1:100 ( $z=-1,786$ ;

Tabella I  
Diametro (mm) degli eritemi di reazione in cavie sensibilizzate con RB51 e in seguito inoculate con brucellina RB51 e Brucellergene OCB

Cavia	Allergene inoculato e diluizione					
	Brucellina RB51			Brucellergene OCB		
	1:500	1:100	1:20	1:500	1:100	1:20
1	0	10	16	0	8	14
2	0	11	15	0	9	15
3	0	9	11	0	10	14
4	0	10	17	0	8	10
5	0	8	12	0	8	15
6	0	10	16	0	0	13
Media	0	9,67	14,50	0	7,17	13,50
Limite di confidenza superiore 95%	0	8,58	11,95	0	3,39	11,54
Limite di confidenza inferiore 95%	0	10,75	17,05	0	10,95	15,46
Coefficiente di variazione	0	0,11	0,17	0	0,50	0,14

Tabella II

Media e deviazione standard dell'ispessimento cutaneo in bovine (n=10) vaccinate in età prepubere con RB51 e inoculate con brucellina 414 giorni dopo la vaccinazione

Risultati della misurazione cutanea	Ore post inoculazione delle brucelline							
	(a) (b)		24h		48h		72h	
	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
Spessore cutaneo medio (mm)	7,65	7,85	8,6	7,85	8,7	7,95	8,9	8,5
Deviazione standard	0,74	0,78	0,97	0,78	1,55	0,96	1,71	0,97

(a) Brucellina RB51  
(b) Brucellergene OCB

$p > 0,05$ ), 1:500 ( $z = -0,412$ ;  $p > 0,05$ ). L'attività biologica della brucellina RB51 è risultata del 139% rispetto a quella della brucellina usata come standard (Brucellergene OCB). Tale valore rientra nei limiti indicati dalla Farmacopea Europea (10) per il calcolo dell'attività biologica dei lotti di tuberculina (accettabile se maggiore del 66% e inferiore o uguale al 150% dell'attività della brucellina di riferimento).

#### Intradermoreazione sui bovini

Nessuna bovina ha mostrato dolore, risentimento linfonodale o necrosi nel sito d'inoculo. In tutte le bovine vaccinate, l'incremento massimo dello spessore della cute al sito d'inoculo è stato osservato a 72 ore dall'inoculazione delle brucelline (Tabella II). A 72 ore p.b.i., le bovine di controllo non hanno manifestato ispessimento della cute ai siti di inoculo delle brucelline, ad eccezione di una bovina che al sito di inoculo della Brucellina RB51 ha mostrato un ispessimento pari a 0,5 mm.

Sette bovine sulle dieci vaccinate hanno reagito positivamente alla brucellina RB51; mentre cinque su dieci hanno reagito positivamente alla brucellina di riferimento (Brucellergene OCB) (Tabella III). I valori di sensibilità e di specificità dell'intradermoreazione con brucellina RB51 e con Brucellergene OCB, in funzione dell'ispessimento osservato al punto di inoculo (soglia di positività), sono riportati in Tabella IV.

#### Test sierologici sui bovini

Prima della vaccinazione e prima dell'intradermoreazione (eseguita a 414 giorni dalla vaccinazione) tutte le bovine hanno dato esito negativo alla SAR, alla FDC e alla FdC-RB51. Dopo la vaccinazione, infatti, le bovine vaccinate hanno sviluppato una risposta sierologica alla FDC-RB51 e sono risultate nuovamente negative all'atto dell'inoculazione intradermica.

Dopo l'inoculazione delle brucelline tutte le bovine hanno dato esito negativo alla SAR ed alla FdC. Considerando come soglia di positività il 100% di fissazione alla diluizione 1:4, tutte le bovine

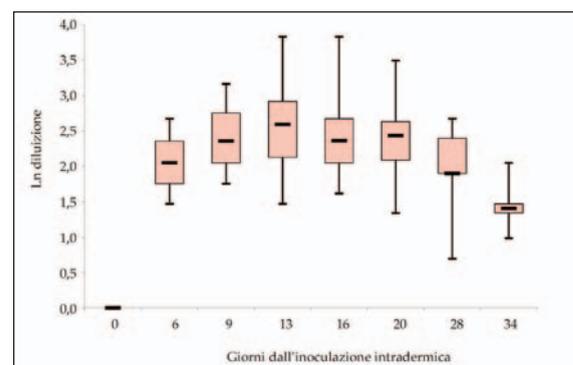


Figura 1  
Risposta anticorpale alla FdC-RB51 in bovine vaccinate con RB51 (n=10) a seguito di inoculazione intradermica di brucellina RB51 e Brucellergene OCB, 414 giorni dopo la vaccinazione con RB51

vaccinate hanno reagito positivamente alla FdC-RB51 ad almeno ad un prelievo (Fig. 1) e tutte le bovine di controllo hanno reagito negativamente alla FdC-RB51 (Fig. 2). La risposta anticorpale ha raggiunto la sua massima intensità al giorno 13 p.b.i., per poi decrescere progressivamente (Fig. 1). La distribuzione percentuale degli animali vaccinati correttamente identificati come positivi (Fig. 3) indica che la sensibilità della FdC-RB51 tra i giorni 9 e 20 p.b.i. è superiore o uguale al 90% (IC 58,7%-97,7%), con valori massimi del 100% (IC 76,2%-100%) ai giorni 9 e 16 p.b.i. Le due bovine risultate negative alla FdC-RB51 rispettivamente ai giorni 13 e 20 p.b.i., avevano reagito positivamente all'intradermoreazione con brucellina RB51.

## Discussione

In precedenti ricerche, il test d'intradermoreazione su bovini vaccinati con RB51 ha fornito risultati controversi, sia con la brucellina preparata con estratti proteici di *B. abortus*, sia con la brucellina omologa RB51 (7, 8, 9). A tal proposito, alcuni autori (6) hanno rilevato che l'attività biologica

(efficacia) di lotti differenti di brucellina è influenzata dalle procedure di produzione e hanno suggerito che essa fosse stimata in accordo alle norme della Farmacopea Europea (10) per la tubercolina (accettabile se superiore al 66% e inferiore o uguale al 150% dell'attività dell'antigene di riferimento), al fine di garantire la capacità dell'intradermoreazione

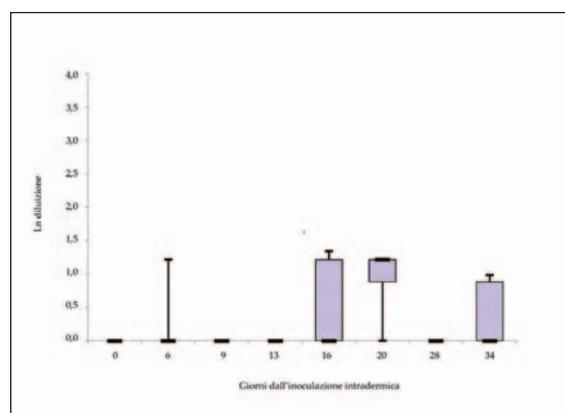


Figura 2  
Risposta anticorpale alla FdC-RB51 in bovine di controllo (n=5) a seguito di inoculazione intradermica di brucellina RB51 e Brucellergene OCB

Tabella III

Reazione d'ipersensibilità ritardata (in mm d'ispessimento cutaneo) in bovine inoculate con brucellina RB51 e Brucellergene OCB 72 h dopo l'inoculazione

Bovine vaccinate con RB51 e controlli	Bovina No.	Spessore cutaneo iniziale (mm)		Spessore cutaneo a 72h (mm)		Differenza di spessore cutaneo (mm)	
		Brucellina RB51	Brucellergene OCB	Brucellina RB51	Brucellergene OCB	Brucellina RB51	Brucellergene OCB
Vaccinate	1	7	7	7	7	0	0
	2	8	8	8	8	0	0
	3	7	8,5	8	8,5	1,0	0
	4	7	7	9	8,5	2,0	1,5
	5	9	9	13	10	4,0	1,0
	6	9	9	11	9	2,0	0
	7	7,5	8	8	8,5	0,5	0,5
	8	7	7	9	8,5	2,0	1,5
	9	7,5	8	8,5	10	1,0	2,0
	10	7,5	7	7,5	7	0	0
Non vaccinate	11	8,5	8,5	8,5	8,5	0	0
	12	8	8,5	8	8,5	0	0
	13	5,5	5,5	5,5	5,5	0	0
	14	9	9	9	9	0	0
	15	7,5	7	8	7	0,5	0

Tabella IV

Sensibilità, specificità e intervalli di confidenza al 95% delle brucelline in relazione all'ispessimento cutaneo del sito d'inoculo (soglia di positività)

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

a rilevare l'infezione.

La brucellina RB51 utilizzata nel presente studio rispetta i requisiti stabiliti dalla Farmacopea Europea (10) e presenta una attività biologica pari al 139% della brucellina presa come antigene di riferimento (Brucellergene OCB).

La sensibilità e la specificità dell'intradermoreazione risentono dei criteri scelti per l'interpretazione dei risultati. Non esiste tra i vari autori (4, 18, 19), infatti, un accordo sull'ispessimento minimo della cute al punto di inoculo da considerare come

soglia di positività. Altri autori indicano che, in allevamenti bovini infetti da *B. abortus* e in condizioni di campo, l'intradermoreazione alla brucellina dovrebbe essere considerata positiva in presenza di qualsiasi reazione visibile e/o palpabile (18). Altri autori (4) hanno proposto una soglia di positività all'intradermoreazione alla brucellina di 2 mm, analoga a quella prevista per la tubercolina. Altri autori (19), pur concordando che le reazioni positive e negative possono essere più rapidamente classificate mediante la semplice osservazione e palpazione del sito d'inoculo, tuttavia sostengono che, in caso di reazione dubbia e al fine di quantificare l'intensità di reazione, bisognerebbe sempre misurare lo spessore della cute. Tali autori, osservando che la reazione allergica alla brucellina era due o tre volte meno intensa della reazione allergica alla tubercolina PPD, suggerirono come soglia di positività per considerare un animale come infetto un ispessimento cutaneo di 1,1 mm a 72 h p.b.i. (19).

Nel presente studio, il rilievo d'ispessimento cutaneo in una bovina non vaccinata con RB51 (per la sola Brucellina RB51), suggerisce l'uso di una soglia di positività maggiore di 0,5 mm di

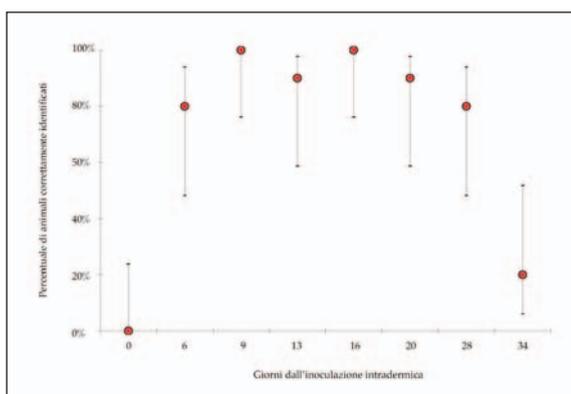


Figura 3

Distribuzione (%) di bovine correttamente identificate dalla FdC-RB51 come vaccinate a seguito di inoculazione intradermica di brucellina RB51 e Brucellergene OCB

incremento di spessore cutaneo al punto di inoculo. Tuttavia, assumendo prudenzialmente come soglia del test il valore di  $\geq 1$  mm di incremento, il test d'intradermoreazione con brucellina RB51 presenta una sensibilità del 60% (IC 30,8%-83,3%) ed una specificità del 100% (IC 60,7%-100%), se effettuato con brucellina omologa RB51, e una sensibilità del 40% (16,7%-69,2%), con una specificità del 100% (IC 60,7%-100%), se effettuato con brucellina OCB (Tabella IV). Il dato potrebbe suggerire una maggiore sensibilità del test d'intradermoreazione quando eseguito con brucellina RB51, tuttavia la differenza di reattività ai due allergeni non è statisticamente significativa considerata l'ampia sovrapposizione dei relativi intervalli di confidenza. In ogni caso, il dato di maggiore reattività rilevato sui bovini concorda con la maggiore attività biologica della brucellina RB51 rispetto alla brucellina OCB (139%), evidenziata sulle cavie. La brucellina RB51 evidenzia sugli animali vaccinati con RB51 un comportamento analogo a quello di Brucellergene OCB quando è utilizzato per l'individuazione di animali e/o allevamenti infetti da *B. abortus* (11, 13, 15).

La relativa bassa sensibilità della prova limita la possibilità di individuare i singoli animali vaccinati con RB51, ma consente di utilizzare l'intradermoreazione come screening di massa per individuare gli allevamenti dove il vaccino RB51 è stato somministrato. Considerando che la vaccinazione, in un allevamento di bovini che ricorre alla profilassi indiretta, si pratica generalmente su tutti (o quasi tutti) gli animali vaccinabili, l'esecuzione del test su tutti gli animali vaccinabili aumenterebbe notevolmente la sensibilità a livello di mandria. Infatti, considerata la sensibilità stimata nel presente studio, in presenza di almeno quattro animali vaccinati si avrebbe il 95% di probabilità che almeno uno reagisca positivamente praticando l'intradermoreazione con brucellina RB51 (Sensibilità

60%, IC 30,8%-83,3%). Con l'intradermoreazione con Brucellergene OCB, la stessa probabilità si otterrebbe con almeno sei animali vaccinati (Sensibilità 40%, IC 16,7%-69,2%).

Il presente studio indica la possibilità di compensare la scarsa sensibilità dell'intradermoreazione nella rilevazione individuale degli animali vaccinati con RB51 sottoponendo gli animali alla FdC-RB51, dopo aver eseguito l'intradermoreazione di brucellina RB51. Infatti, a 414 giorni dalla vaccinazione e prendendo come soglia di positività della FdC-RB51 il 100% di fissazione alla diluizione 1:4, ai giorni 9 e 16 dall'intradermoreazione sono risultate positive alla FdC-RB51 tutte le bovine vaccinate (Sensibilità 100% IC 76,2% - 100%) e tra i giorni 9 e 20 sono risultate positive almeno nove bovine sulle dieci vaccinate (Sensibilità 90% IC 58,7%-97,7%). Tutte le bovine di controllo sono invece risultate negative p.b.i. alla FdC-RB51 (Specificità 100%, IC 60,7%-100%).

Le due bovine vaccinate risultate negative alla FdC-RB51 rispettivamente al giorno 13 e al giorno 20 p.b.i. erano risultate positive alla prova allergica con brucellina RB51. Il dato suggerisce che l'utilizzo in parallelo dell'intradermoreazione e della FdC-RB51, tra i giorni 9 e 20 dall'intradermoreazione, consente di individuare correttamente tutte le bovine vaccinate con RB51.

In conclusione, l'intradermoreazione può essere utilizzata come screening a livello di mandria per identificare gli allevamenti vaccinati con RB51. In questo caso possono essere utilizzate sia la brucellina omologa che quella eterologa, avendo tuttavia cura di considerare le differenti sensibilità dei due allergeni. L'intradermoreazione con Brucellina omologa, a 414 giorni dalla vaccinazione in età prepubere con RB51, induce una risposta umorale anamnestic. Pertanto l'associazione tra l'intradermoreazione con brucellina omologa e il test FdC-RB51 può rappresentare un efficace

sistema diagnostico per individuare i singoli capi vaccinati con RB51.

## Ringraziamenti

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute della Repubblica Italiana. Gli autori desiderano ringraziare Doriana Tarquini per la sua preziosa assistenza nella produzione della brucellina RB51.

## Bibliografia

1. Adone R. & Ciuchini F. 1999. Complement fixation test to assess humoral immunity in cattle and sheep vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Clin Diagn Lab Immunol*, **6**, 787-790.
2. Adone R. Ciuchini F. & Olsen S. 2001. Field validation of the use of RB51 as antigen in a complement fixation test to identify calves vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Clin Diagn Lab Immunol*, **8**, 385-387.
3. Alton G.G., Jones L.M., Angus R. & Verger J.M. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut national de la recherche agronomique, Paris, 191 pp.
4. Bercovich Z., Haagsma J., Van Lipzig J.H. & Taaijke R. (1993). Specificity of the skin delayed-type hypersensitivity test in brucellosis-free cattle tested with a *Brucella* allergen. *Zentralbl Veterinarmed B*, **40**, 582-588.
5. Bercovich Z., Eger A., Dekker T. & Haagsma J. 1995. Production of *Brucella* allergens and evaluation of their biological activity in a guinea-pig bio-assay. *J Vet Med B*, **42**, 19-27.
6. Bercovich Z., Tetenburg G.J. & Eger A. 1998. Estimation of the biological activity (potency) of batches of brucellin prepared from a mucoid strain of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol*, **62**, 313-320.
7. Cheville N.F., Jensen A.E., Halling S.M., Tatum F.M., Morfitt D.C., Hennager S.G., Frerichs W.M. & Shurig G. 1992. Bacterial survival, lymph node changes, and immunologic responses of cattle vaccinated with standard and mutant strains of *Brucella abortus*. *Am J Vet Res*, **53**, 1881-1888.
8. Cheville N.F., Stevens M.G., Jensen A.E., Tatum F.M. & Halling S.M. 1993. Immune response and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. *Am J Vet Res*, **54**, 1591-1597.
9. Cheville N.F., Jensen A.E., Morfitt D.C. & Stabel T.J. 1994. Cutaneous delayed-type hypersensitivity reactions of cattle vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*, using brucellins prepared from various brucellar strains. *Am J Vet Res*, **54**, 1261-1266.
10. Council of Europe 2004. European pharmacopoeia, 5th Ed. Council of Europe Strasbourg, 2856-2857.
11. Cunningham B., Miler J.J., Dolan L., McKeon F. & O'Meara M. 1980. Immunological characteristics in cattle of allergens derived from smooth *Brucella abortus* S99. *Vet Rec*, **107**, 369-375.
12. European Commission 2002. Commission Decision 2002/598/EC of 15 July 2002 approving vaccines against bovine brucellosis within the framework of Council Directive 64/432/EEC. *Off J*, **L 194**, 5.
13. Fensterbank R. 1977. Diagnostic allergique de la brucellose bovine. II : Utilisation du test allergique dans les troupeaux infectés. *Ann Rech Vet*, **8**, 195-201.
14. Klimanov A.I. 1971. I: Comparison of the activity of *Brucella* brucellins. II. Standard dried *Brucella* allergen. *Vet Bull*, **41**, 33.
15. MacDiarmid S.C. 1987. A theoretical basis for the use of a skin test for brucellosis surveillance in extensively-managed cattle herds. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, **6**, 1029-1035.
16. Office International des Epizooties (OIE) 2004. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 5th Ed. OIE, Paris. 598-601.
17. Olsen S.C., Stevens M.G., Cheville N.F. & Schurig G. 1997. Experimental use of a dot-blot assay to

- measure serologic responses of cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. *J Vet Diagn Invest*, **9**, 363-367.
18. Plommet M. 1984. Les dernières étapes de la prophylaxie de la brucellose bovine. *Bull Mens Soc Vet Prat Fr*, **68**, 507-520.
19. Saegerman C., Vo T.-K.O., De Waele L., Gilson D., Bastin A., Dubray G., Flanagan P., Limet J.N., Letesson J.J. & Godfroid J. 1999. Diagnosis of bovine brucellosis by skin test: conditions for the test and evaluation of its performance. *Vet Rec*, **145**, 214-218.
20. Sivia D.S. 1996. Data analysis. A Bayesian tutorial. Clarendon, Oxford, UK 189 pp.
21. Siegel S. & Castellan N.J. 1988. Non Parametric statistics for the behavioral sciences, 2nd Ed. McGraw-Hill Book Co., Statistics series, New York, 399 pp.
22. Stevens M.G., Hennager S.G., Olsen S.C. & Cheville N.F. 1994. Serologic responses in diagnostic tests for brucellosis in cattle vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51. *J Clin Microbiol*, **32**, 1065-1066.
23. Stevens M.G., Olsen S.C. & Cheville N.F. 1995. Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. *Vet Immunol Immunopathol*, **44**, 223-235.
24. Vose D. 2000. Risk analysis: a quantitative guide, 2nd Ed. John Wiley & Sons, Chichester, England 418 pp.