

Valutazione dell'efficacia del vaccino *Brucella abortus* ceppo RB51 rispetto al vaccino di referenza

Brucella abortus ceppo 19 nel bufalo

Vincenzo Caporale, Barbara Bonfini, Elisabetta Di Giannatale, Andrea Di Provvido, Simona Forcella, Armando Giovannini, Manuela Tittarelli & Massimo Scacchia

Riassunto

Il patrimonio zootecnico della specie bufalina (*Bubalus bubalis*) della regione Campania, è di 250 000 capi, di questi 150 000 allevati in aziende zootecniche della provincia di Caserta. In queste aziende, nel 2007, l'infezione da *Brucella abortus* ha avuto la prevalenza media, per allevamento, del 20%. Complessivamente, i 2/3 degli allevamenti positivi hanno evidenziato una prevalenza superiore al 10% e, di questi, i 3/4 una prevalenza superiore al 20%. Prendendo il 20% come valore di riferimento, la metà degli allevamenti infetti (22% degli allevamenti casertani) ha evidenziato prevalenze inferiori o uguali al 20%, la restante metà (un altro 22% del totale) prevalenze comprese tra il 20 e il 56%. In questo contesto epidemiologico è stato adottato un piano di eradicazione della brucellosi che prevedeva l'abbattimento dei capi infetti e la vaccinazione del restante patrimonio bufalino delle zone con più alta incidenza. Per la profilassi vaccinale della brucellosi, il *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals* (OIE) prevede l'utilizzo del vaccino *B. abortus* S19 (S19). Purtroppo, l'utilizzo del vaccino negli animali adulti non è privo di possibili effetti indesiderati. Per superare questo aspetto negativo è stato ipotizzato l'impiego del vaccino di *B. abortus* RB51 (RB51) anche se in letteratura scientifica, sono risultati disponibili pochi dati relativi alla corretta dose vaccinale, all'efficacia e all'innocuità del vaccino nel

bufalo. A tale scopo è stato condotto uno studio comparativo tra i due vaccini. Sono state utilizzate 13 femmine di bufalo di 5 mesi di età provenienti da un allevamento ufficialmente indenne da brucellosi. Un gruppo di 5 animali è stato vaccinato due volte, a distanza di un mese, con una dose di RB51 tre volte superiore a quella prevista per i bovini; un secondo gruppo di 5 bufale con S19 rispettando il dosaggio raccomandato per i bovini e un terzo gruppo, di 3 animali di controllo, inoculato con tampone fosfato. Trenta giorni dopo la vaccinazione è stato effettuato un inoculo con ceppo virulento *B. abortus* 544. Gli anticorpi sviluppati nei 5 animali vaccinati con SRB51 non sono stati rilevati mediante sieroaagglutinazione rapida con antigene al Rosa Bengala (SAR) o fissazione del complemento (FdC). Gli stessi animali sono stati sottoposti a test FdC allestito con antigene specifico RB51 (FdC-RB51). Dopo l'abbattimento, sono stati prelevati milza e linfonodi retrofaringei e sopramammari per la diagnosi diretta di brucellosi. Per comparare l'immunogenicità ottenuta nei bufali dei tre gruppi sperimentali è stata effettuata la valutazione statistica.

Parole chiave

Brucella, *Brucella abortus*, Brucellosi, Bufalo, S19, Italia, RB51, Vaccino.

Introduzione

Brucella abortus è il principale agente della brucellosi nel bufalo. La maggior parte dei bufali mediterranei (*Bubalus bubalis*, Linnaeus, 1758) si alleva in Italia, nella regione Campania dove, nonostante i programmi di controllo e di eradicazione, la persistenza di infezione da *Brucella* (ceppi *Brucella abortus* 1 e 3) e l'alta prevalenza hanno indotto le autorità europee e italiane ad adottare una strategia di vaccinazione per tutelare la salute animale e umana.

Il vaccino universalmente utilizzato nella lotta alla brucellosi nel bufalo è il ceppo 19 (9), il cui impiego ha come inconveniente la produzione di anticorpi che interferiscono con i test ufficiali utilizzati per la diagnosi di brucellosi. Per ovviare all'inconveniente è stato sviluppato un vaccino alternativo RB51, un mutante rugoso di *Brucella abortus* rifampicina-resistente, che si è dimostrato sicuro ed efficace nella lotta contro la brucellosi bovina mostrando interferenze trascurabili con la diagnosi sierologica (8). La dose di vaccino RB51 prevista per i bovini, quando utilizzata nel bufalo, è risultata inefficace nel proteggere l'animale se infettato con ceppo selvaggio (5), anche se ha mostrato di non interferire con la diagnosi sierologica (4).

Alcuni autori hanno proposto di immunizzare il bufalo con vaccino RB51 utilizzando un protocollo di vaccinazione differente da quello usato nei bovini (7), consistente nella vaccinazione di bufale impuberi con dose tripla rispetto a quella dei bovini e richiamo dopo un mese.

In questo lavoro è stato utilizzato il protocollo vaccinale proposto da Iovane *et al.* (7) ed è stata comparata l'efficacia del vaccino RB51 con quella del vaccino S19 somministrato a dose standard (9). L'efficacia della vaccinazione è stata valutata in relazione alla colonizzazione, da parte di un ceppo selvaggio di *Brucella abortus* (ceppo 544), di milza e linfonodi di bufali e topi vaccinati con RB51 e con S19. La sperimentazione su topi sarà oggetto di ulteriore comunicazione.

Materiali e metodi

Animali

Tredici bufale mediterranee impuberi di 5-6 mesi, prelevate da allevamenti ufficialmente indenni da brucellosi della provincia di Salerno (Campania), sono state selezionate in maniera casuale e divise in tre gruppi (Tabella I):

- Gruppo R: 5 animali vaccinati con RB51
- Gruppo S: 5 animali vaccinati con S19
- Gruppo C: 3 animali di controllo.

Gli animali sono stati mantenuti nelle stalle di massima sicurezza dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", dopo 7 giorni di adattamento al nuovo ambiente, sono stati esaminati clinicamente e sottoposti ad esami parassitologici, ematologici, biochimici, clinici e ai test sierologici ufficiali per brucellosi.

Tabella I
Gruppi di animali utilizzati nell'esperimento

Identificativo animale	Gruppo	Descrizione
1	R	Animali vaccinati con tripla dose di RB51 e richiamo al tempo t_1 , 30 giorni dopo la prima vaccinazione
2		
3		
4		
5		
6	C	Animali di controllo, inoculati con PBS sterile al tempo t_1
7		
8		
9	S	Animali vaccinati con S19 al tempo t_1
10		
11		
12		
13		

Vaccini e vaccinazione

Gruppo R

Cinque animali sono stati vaccinati per via sottocutanea (tempo t_0) ed è stata usata una tripla dose (6 ml, contenenti $3-10,2 \times 10^{10}$ Unità Formanti Colonie – UFC) di vaccino RB51 (CZ-Veterinaria, Porriño – Spagna) (singola dose $1-3 \times 10^{10}$ UFC). Gli animali sono stati nuovamente vaccinati al tempo t_1 , 30 giorni

dopo la prima vaccinazione, usando la stessa tripla dose.

Gruppo S

Cinque animali sono stati vaccinati per via sottocutanea al tempo t_1 (concomitante con la seconda inoculazione di RB51 nel gruppo R) usando la dose standard (5 ml, contenenti $6 \cdot 12 \cdot 10^{10}$ UFC) di vaccino S19 (CZ-Veterinaria).

Gruppo C

Altri tre animali sono stati tenuti come controlli non vaccinati e sono stati inoculati per via sottocutanea con 2 ml di PBS sterile al tempo t_1 , in concomitanza con la seconda somministrazione di RB51 nel primo gruppo di animali.

I titoli dei vaccini sono stati controllati con il metodo della conta in piastra.

Infezione sperimentale

Trentatré giorni (tempo t_2) dall'ultima vaccinazione, 69 giorni dopo t_0 , tutti gli animali in sperimentazione sono stati inoculati per via congiuntivale con 100 μ l (50 μ l in ciascun occhio) di una sospensione contenente 10^7 UFC di *B. abortus* ceppo 544 (concentrazione di $3,1 \times 10^8$ UFC/ml) fornita da Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) (Agenzia Francese per la Sicurezza Alimentare) (Maisons-Alfort – Francia). A partire da un ceppo liofilizzato di *Brucella abortus* ceppo 544 è stata preparata una sospensione in PBS, di densità ottica $0,400 \pm 0,005$ (DO 600 nm), rilevata con biofotometro (Eppendorf, Milano – Italia) e corrispondente a circa 10^8 UFC/ml. La carica batterica dell'inoculo così preparato è stata confermata mediante titolazione su Trypticase Soy Agar (Biolife, Milano – Italia).

Esami

Tutti gli animali dei tre gruppi sono stati sottoposti settimanalmente a esami sierologici per brucellosi fino a 9 settimane successive la prima vaccinazione con RB51 (33 giorni dopo la vaccinazione con S19) e due volte alla settimana dopo il challenge, fino al termine della sperimentazione (t_3 , 31 giorni dopo l'infezione e 100 giorni dopo t_0). I test sierologici ufficiali per brucellosi, sieroagglutinazione rapida con antigene acido al

Rosa Bengala (SAR) e fissazione del complemento (FdC), sono stati effettuati con antigeni preparati con ceppo liscio di *Brucella abortus* (ceppo S99 di Weybridge), mentre la FdC specifica per RB51 è stata effettuata con antigene rugoso preparato con ceppo vaccinale(1, 2).

Dopo il challenge è stata registrata giornalmente la temperatura corporea degli animali.

Al tempo t_3 (100 giorni dopo t_0 e 31 giorni dopo l'inoculazione) tutti gli animali sono stati abbattuti. Sono stati prelevati milza, fegato, rene, polmone, mammella, vescica urinaria e linfonodi sopramammari, retrofaringei, mandibolari, mesenterici, iliaci e polmonari. I campioni sono stati messi in coltura e incubati sia in condizioni aerobiche che con aria addizionata del 5%-10% (v/v) di CO_2 , come previsto dal Manuale del *World Organisation for Animal Health (Office International des Épizooties – OIE)* (9). La carica infettante di milza e linfonodi sopramammari e retrofaringei è stata effettuata mediante numerazione in piastra di diluizioni a raddoppio in base 10, fino a 1:1 000.

Da ciascun campione positivo sono state isolate colonie certe utilizzando le seguenti procedure di identificazione: AMOS-PCR (*Abortus Melitensis Ovis Suis – polymerase chain reaction*), FRLP (restriction fragment length polymorphism), crescita in presenza di fuxina basica e tionina alla concentrazione finale di 20 μ g/ml, produzione di H_2S e agglutinazione con sieri A e M (9).

Analisi statistica

Ogni bufalo dei tre gruppi sperimentali è stato valutato sulla base del numero degli organi diversi risultati positivi, comparati mediante analisi non-parametrica della varianza di Kruskal-Wallis. Le differenze tra i gruppi sono state valutate utilizzando il test U di Mann-Whitney, con la correzione di Bonferroni. Dal confronto tra i gruppi il valore p di Bonferroni (corrispondente al valore complessivo alfa di 0,05) è risultato di 0,0167. Questo valore è quello soglia al di sotto del quale la differenza tra i due gruppi diventa significativa.

Risultati

All'inizio della sperimentazione i parametri clinici degli animali sono rientrati nel normale intervallo e i test ufficiali sierologici e parasitologici per brucellosi sono risultati tutti negativi.

I risultati dei test sierologici effettuati dopo la vaccinazione degli animali sono presentati in Tabella II.

Quattro animali del Gruppo R hanno sviluppato anticorpi specifici contro il ceppo vaccinale RB51 a quattro giorni dalla seconda somministrazione del vaccino. Gli anticorpi sono scomparsi dopo sei settimane (42 g/pv) dall'inizio della vaccinazione.

Gli animali del Gruppo S hanno sviluppato, in meno di due settimane dalla vaccinazione, anticorpi specifici per il ceppo liscio di *Brucella* rilevabili mediante SAR e FdC. La positività sierologica è durata fino alla data dell'infezione sperimentale, 33 giorni dopo la vaccinazione.

Gli animali di controllo del Gruppo C sono risultati negativi fino a due settimane dopo

l'infezione sperimentale, in seguito, in nessun gruppo è stata rilevata febbre.

I risultati dei test sierologici effettuati dopo l'infezione sperimentale sono mostrati in Tabella III.

Gli animali del Gruppo R hanno mostrato una reazione al richiamo vaccinale con anticorpi specifici rilevabili dopo 9 giorni. La reazione è stata transitoria, scomparendo 3 settimane dopo l'infezione. La reazione sierologica al ceppo infettante, rilevabile mediante SAR, è comparsa 2 settimane dopo l'infezione in tutti e 5 gli animali del gruppo, in tre bufali, è durata fino al termine della sperimentazione. Utilizzando l'antigene per FdC di tipo liscio non è stata rilevata alcuna risposta anticorpale (Tabella II).

Gli animali del Gruppo S sono rimasti sierologicamente positivi dopo l'infezione e per tutta la durata della sperimentazione. Due capi hanno sviluppato anticorpi rilevabili con antigene per FdC di tipo rugoso dal nono al diciassettesimo giorno dopo l'infezione.

Tabella II
Risultati sierologici dopo la vaccinazione

Date (giorni dopo la vaccinazione)	Gruppo R (vaccinati RB51)			Gruppo S (vaccinati S19)			Gruppo C (controlli)		
	SAR*	FdC*	FdC RB51*	SAR*	FdC*	FdC RB51*	SAR*	FdC*	FdC RB51*
02/04 (0) [t ₀]	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3
09/04 (7)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3
16/04 (14)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3
23/04 (21)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3
30/04 (28)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3
02/05 [t ₁]	-	-	-	-	-	-	-	-	-
06/05 (35)	0/5	0/5	4/5	0/5	0/5	0/5	0/3	0/3	0/3
13/05 (42)	0/5	0/5	4/5	5/5	5/5	0/5	0/3	0/3	0/3
20/05 (49)	0/5	0/5	0/5	5/5	5/5	0/5	0/3	0/3	0/3
27/05 (56)	0/5	0/5	0/5	5/5	5/5	0/5	0/3	0/3	0/3
03/06 (63)	0/5	0/5	0/5	5/5	5/5	0/5	0/3	0/3	0/3

Legenda:

SAR Rosa Bengala

FdC fissazione del complemento

* positivi/totali

[t₀] data della prima vaccinazione con RB51

[t₁] data del richiamo con RB51 e vaccinazione con S19

Tabella III
Risultati sierologici dopo l'infezione

Date (giorni dopo l'infezione)	Gruppo R (vaccinati RB51)			Gruppo S (vaccinati S19)			Gruppo C (controlli)		
	SAR*	FdC*	FdC RB51*	SAR*	FdC*	FdC RB51*	SAR*	FdC*	FdC RB51*
09/06 (0) [t ₂]	0/5	0/5	0/5	5/5	5/5	0/5	0/3	0/3	0/3
12/06 (3)	0/5	0/5	0/5	5/5	5/5	0/5	0/3	0/3	0/3
16/06 (7)	0/5	0/5	0/5	5/5	5/5	0/5	0/3	0/3	0/3
18/06 (9)	0/5	0/5	5/5	5/5	5/5	2/5	0/3	0/3	0/3
23/06 (14)	5/5	0/5	5/5	5/5	5/5	2/5	3/3	0/3	0/3
26/06 (17)	5/5	0/5	5/5	5/5	5/5	2/5	3/3	0/3	0/3
30/06 (21)	3/5	0/5	0/5	5/5	5/5	0/5	3/3	1/3	0/3
03/07 (24)	3/5	0/5	0/5	5/5	5/5	0/5	3/3	1/3	0/3
07/07 (28)	3/5	0/5	0/5	5/5	5/5	0/5	3/3	3/3	0/3
10/07 (31) [t ₃]	3/5	0/5	0/5	5/5	5/5	0/5	3/3	3/3	0/3

Legenda:

SAR Rosa Bengala

FdC fissazione del complemento

* positivi/total

[t₂] data del challenge

[t₃] fine della sperimentazione, sacrificio degli animali

Gli animali di controllo del Gruppo C hanno manifestato una risposta anticorpale rilevabile mediante SAR 14 giorni dopo l'infezione, mentre titoli per FdC sono stati evidenziati 21 giorni dopo l'infezione (post infezione = p.i.) in un capo e 28 giorni p.i. nei rimanenti due. Tutti gli animali sono rimasti positivi fino al termine della sperimentazione.

I risultati batteriologici ottenuti dopo aver abbattuto gli animali sono riassunti in Tabella IV.

Milze e linfonodi sopramammari e retrofaringei degli animali di controlli sono risultati positivi, mentre tutti gli organi degli animali del gruppo S sono risultati negativi. Nel gruppo R, un campione di linfonodo retrofaringeo ha dato esito positivo e il ceppo, tipizzato, è risultato essere *Brucella abortus* biovar 1 (544). La differenza complessiva è risultata statisticamente significativa (test bilaterale di Kruskal-Wallis $\chi^2 = 9,877$, $p = 0,014$).

La comparazione tra i gruppi ha mostrato che:

- la differenza tra i gruppi R e S non è statisticamente significativa (test bilaterale di Mann-Whitney U, $p = 0,317$)
- la differenza tra i gruppi C e S è statisticamente significativa (test bilaterale di Mann-Whitney U, $p = 0,01$ e il valore critico di Bonferroni in corrispondenza di $\alpha = 0,05$ è pari a 0,0167)
- la differenza tra i gruppi C e R è statisticamente significativa (test bilaterale di Mann-Whitney U, $p = 0,016$ e il valore critico di Bonferroni in corrispondenza di $\alpha = 0,05$ è pari a 0,0167).

La probabilità di infezione dopo la somministrazione della dose infettante di *Brucellae* dipende dal tipo di vaccino utilizzato (Figura 1).

Discussione

Il numero di animali da utilizzare nella sperimentazione del vaccino dipende dalla soglia predefinita alla quale si valuteranno le

Tabella IV
Risultati batteriologici espressi come unità formanti colonie/grammi

Identificativo animali	Gruppo	Milza	Linfonodi retrofaringei	Linfonodi sopramammari	Altri organi
1	R	N	N	N	N
2		N	N	N	N
3		N	250 UFC/g*	N	N
4		N	N	N	N
5		N	N	N	N
6	C	180 UFC/g	75 UFC/g	50 UFC/g	N
7		200 UFC/g	1 100 UFC/g	<10 UFC/g	N
8		50 UFC/g	300 UFC/g	2 200 UFC/g	N
9	S	N	N	N	N
10		N	N	N	N
11		N	N	N	N
12		N	N	N	N
13		N	N	N	N

Legenda:

N non sono state isolate *Brucellae*

* il biotipo isolato è stato *Brucella abortus* biovar 1 (544)

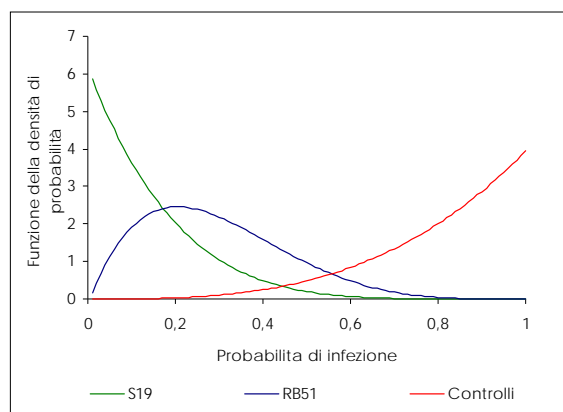


Figura 1
Probabilità di infezione dopo l'infezione sperimentale negli animali vaccinati

differenze tra i due vaccini, in termini di efficacia. La soglia, a sua volta, dipende dalle precedenti conoscenze sulle possibili differenze tra i vaccini in comparazione e anche da fattori economici.

Studi precedenti hanno dimostrato l'inefficacia della dose standard (5) e la possibilità che ci fosse una notevole differenza tra i due ceppi del vaccino.

Poiché statisticamente potrebbe esistere una grande differenza utilizzando un numero di animali relativamente basso, gli autori hanno deciso di far riferimento al numero di topi

indicato per la prova di efficacia nel Manuale degli standard dell'OIE (9), per la comparazione tra un nuovo ceppo vaccinale rispetto al ceppo standard (S19). Nel Manuale sono riportati la dose e i tempi, oltre al ceppo da utilizzare per il challenge, per valutare la protezione di un nuovo vaccino, o comunque non prodotto con il ceppo standard (S19).

I risultati ottenuti dagli animali trattati con il vaccino S19 e da quelli di controllo sono risultati concordi con quelli attesi, permettendo il confronto con i risultati ottenuti dagli animali trattati con il vaccino RB51.

Il vaccino RB51, quando somministrato in tripla dose rispetto a quella utilizzata per i bovini e seguito da un richiamo un mese dopo la prima inoculazione, sembra in grado di proteggere dall'infezione dal ceppo selvaggio di *Brucella*.

Pur considerando i limiti dovuti al basso numero di animali inoculati, i risultati sierologici ottenuti dopo il challenge negli animali del gruppo R sembrano confermare che l'inoculazione dell'agente non ha indotto infezione sia perché nessun animale ha sviluppato anticorpi rilevabili con la FdC con antigene liscio sia perché gli anticorpi rilevabili mediante FdC-RB51 hanno mostrato una reazione transitoria (due dei cinque animali

sono diventati negativi due settimane dopo la reazione positiva). In un solo bufalo vaccinato con RB51 (successo del challenge) l'isolamento è stato possibile solo da un organo bersaglio e non ci sono stati livelli rilevabili di anticorpi fissanti il complemento. Ciò sembra indicare lo sviluppo di una protezione almeno parziale.

Il campionamento utilizzato nella sperimentazione (5 animali per gruppo) concorda con altri studi condotti con analoghi obiettivi e con le indicazioni fornite dall'OIE per la valutazione dei vaccini nei topi. Le differenze osservate tra i gruppi, dopo la somministrazione della tripla dose di vaccino RB51, sono irrilevanti rispetto ai risultati ottenuti in precedenti lavori con la somministrazione della dose standard di vaccino RB51. Pertanto, dato il livello di confidenza minimo del 95%, il campionamento utilizzato conferisce ai test statistici impiegati la capacità di identificare le differenze osservate come statisticamente significative.

Per avere la probabilità del 90% di rilevare differenze statisticamente significative e un

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.D. & Verger J.M. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut national de la recherche agronomique, Paris, 190 pp.
4. Diptee M.D., Asgarali Z., Campbell M., Fosgate G. & Adesiyun A.A. 2007. Post-exposure serological and bacteriological responses of water buffalo (*Bubalus bubalis*) to *Brucella abortus* biovar 1 following vaccination with *Brucella abortus* strain RB51. *Rev Sci Tech*, **26** (3), 669-678.
5. Fosgate G.T., Adesiyun A.A., Hird D.W., Johnson W.O., Hietala S.K., Schurig G.G., Ryan J. & Diptee M.D. 2003. Evaluation of brucellosis RB51 vaccine for domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Trinidad. *Prev Vet Med*, **15**, 211-225.
6. Galiero G. 2009. Innocuità del vaccino *Brucella abortus* RB51 nella bufala mediterranea. *Large Anim Rev*, **15** (1), 19-22.
7. Iovane G., Martucciello A., Astarita S., Galiero G., Pasquali P., Adone R., Ciuchini F., Pagnini U., Guarino A. & Fusco G. 2007. Vaccino *Brucella abortus* RB51: primi risultati sull'innocuità ed attività immunogena nella bufala mediterranea. *Progr Vet*, **62** (1), 19-21.
8. Schurig G.G., Sriranganathan N. & Corbel M.J. 2002. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol*, **90**, 479-496.
9. World Organisation for Animal Health (Office International des Épizooties: OIE) 2009. Bovine brucellosis, Chapter 2.4.3. *In* Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. OIE, Paris, 1-35 (www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.03_bovine_brucell.pdf ultimo accesso 3 Marzo 2010).

livello di confidenza del 95%, considerando tutte le altre caratteristiche e i dati osservati in questa sperimentazione, la dimensione del campione dovrebbe prevedere almeno 44 animali per un test statistico a due code e 36 animali nel caso di test unilaterale.

L'innocuità del protocollo di vaccinazione è stata oggetto di un precedente lavoro (6).

Il protocollo ha dimostrato che il vaccino somministrato ad animali giovani è sicuro (7), somministrato ad animali adulti causa aborti in bufale gravide (6).

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano Giuseppe Iovane e Giorgio Galiero per la collaborazione nella scelta degli animali e dei vaccini e per i preziosi consigli sui metodi di allevamento.

