

Università degli Studi di Napoli
“Federico II”
Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzione Animali



Tesi di dottorato in
produzione e sanità degli alimenti di origine animale

XXV° CICLO

Messa a punto di un metodo di Real time PCR
per la diagnosi di Brucellosi in embrioni prodotti
da ovaie di bufali naturalmente infetti.

Tutor
Ch.mo Prof.
Luigi Ramunno

Coordinatore
Ch.ma Prof.ssa
Maria Luisa Cortesi

Candidato
Dr. Carlo Maria Del Pizzo

Anni Accademici 2010 - 2013

INDICE

Indice	pag.2
Introduzione	pag.3
Brucella spp.	pag.9
(caratterizzazione, differenziali, correlazioni antigeni tra Brucelle e microrganismi, resistenza).	
Brucella Abortus	pag. 22
(epidemiologia, patogenesi, caratteri della malattia, elementi diagnostici, tecniche di diagnostica molecolare, terapia, profilassi).	
Parte Sperimentale	pag. 52
Obiettivo della tesi	pag. 53
Real time PCR	pag. 53
Risultati	pag. 57
Conclusioni	pag.58
Bibliografia	pag. 59

INTRODUZIONE

L'allevamento della specie bufalina inizia ad avere una diffusione in molte nazioni, che non includono solo il Sud America, le Regioni Mediterranee ed Asiatiche, ma anche i paesi dell'Europa Centrale come Romania, Bulgaria ed altri ancora. Il crescente consumo di carne, latte e derivati di questa specie animale ha un forte impatto sull'economia di questi paesi. Pertanto, l'identificazione di bufali che possono avere infezioni sostenute da agenti microbiologici è una necessità utile a prevenire rischi per la salute umana e danni di natura economica. Inoltre, la bufala allevata in Italia è caratterizzata da una scarsa efficienza riproduttiva dovuta, essenzialmente, ad una elevata incidenza di calori silenti, ad un basso tasso di concepimento, ad una spiccata tendenza alla stagionalità riproduttiva e ad una scarsa precocità nella comparsa della pubertà. La lunghezza del ciclo estrale ed i segni clinici dell'estro presentano tra l'altro una notevole variabilità individuale **(1, 2, 3)**. Inoltre, i parti si concentrano per lo più (70-80%) tra luglio e dicembre, il che comporta una elevata produzione di latte tra agosto e metà febbraio quando le richieste del mercato sono più scarse con conseguenti danni economici di notevole entità **(4)**. Dal momento che la produzione di latte e derivati rappresenta il punto di forza economico dell'allevamento bufalino e dato che in questi ultimi anni si ha una crescente richiesta di mozzarelle e prodotti affini, potrebbe essere utile tentare di attuare programmi di inseminazione artificiale o embryo transfer in modo da garantire non solo un miglioramento alla sfera riproduttiva, garantendo la conservazione dei capi ad elevato valore genetico

riproduttivo, ma anche una salvaguardia economica degli stessi allevatori.

Dall'avvento, nel 1970, della crioconservazione e dell'embryo transfer non chirurgico è stata data grande attenzione alla possibile trasmissione di malattie infettive da parte degli embrioni. Infatti, prima dell'ovulazione, un cumulo di oociti complessi (COCs) potrebbe essere infetto con agenti infettivi eventualmente presenti in ciascuna delle cellule ovariche o dei liquidi follicolari (5). Dopo la fecondazione, questi patogeni possono essere presenti nelle cellule embrionali o associati alla zona pellucida. In entrambi i casi, l'embryo transfer rappresenta un serio rischio a livello sanitario. Diversi studi sono stati fatti su patogeni virali come l'herpes virus bovino, il virus della diarrea bovina, la rinotracheite infettiva bovina e la blue tongue, mentre solo poche ricerche sono state condotte sulle patologie batteriche che possono essere trasmesse attraverso gli embrioni. In Italia, la macellazione degli animali infetti è obbligatoria per diverse malattie batteriche (specialmente zoonosi), in particolare la Brucellosi. In questo caso, oltre ad una perdita di animali, il danno maggiore è rappresentato dalla perdita del valore genetico dei capi infetti.

La Brucellosi è una malattia infettiva e contagiosa provocata da batteri gram negativi, appartenenti al genere brucella.

La Brucellosi è diffusa nelle stalle bovine e bufaline dell'area mediterranea, dove esiste un tentativo di controllo attraverso uno screening sierologico e di macellazione degli animali sieropositivi.

La Brucellosi, malattia causata da sei gruppi di specie geneticamente ed altamente relazionati, appartenenti al genere *Brucella spp.*, è una malattia sistemica seria che colpisce un'ampia varietà di ospiti mammiferi, compresi gli esseri umani (6).

Negli animali causa mastite, aborto, ritenzione placentare ed ipofertilità. Può colpire accidentalmente l'uomo, causando una forma morbosa che può assumere caratteristiche cliniche variabili, simulando il quadro di molte altre malattie febbrili. La Brucellosi ha molti sinonimi, derivati dalle regioni geografiche in cui la malattia è più diffusa (febbre maltese, febbre mediterranea, febbre di Cipro, febbre di Gibilterra), o dal carattere discontinuo della febbre (febbre ondulante, tifo intermittente).

Il germe prende il nome da David Bruce, medico scozzese che per primo lo isolò.

La storia della Brucellosi è strettamente legata all'occupazione dell'isola di Malta da parte delle truppe britanniche, anche se già riferita da Ippocrate negli anni prima di Cristo.

- Nel 1861, a Malta, per primo Marston differenziò la "febbre maltese" dalle altre sindromi febbrili.
- Nel 1887, David Bruce, medico scozzese incaricato dalla Royal Society di Londra di studiare la "febbre maltese", isolò per primo, nel tessuto splenico di 4 soldati morti durante un' epidemia scoppiata sull'isola di Malta, l'agente eziologico della malattia: un batterio che chiamò *Micrococcus melitensis* (abitante di Malta). Miss Evans, successivamente, riunì i batteri simili sotto la denominazione di *Brucella*, in memoria di Bruce.

- Nel 1895, in Danimarca, Bernhard Lauritz Frederik Bang identificò il bacillo responsabile di aborto contagioso nel bestiame bovino; il germe fu chiamato "bacillo di Bang", che poi verrà rinominato *Brucella abortus*.
- Nel 1897, in Inghilterra, Almroth Edward Wright dimostrò la presenza di anticorpi agglutinanti le brucelle nel siero dei malati di febbre di Malta; nel 1905, il medico maltese Themistocles Zammit scoprì gli stessi anticorpi nelle capre infettate da brucelle.
- Fu istituita dalle autorità britanniche una "Commissione per la Febbre Mediterranea" che, tra il 1904 e il 1907, concluse che, a Malta, le capre indigene erano il serbatoio dell'infezione e il loro latte non pastorizzato era il veicolo di trasmissione della malattia dall'animale all'uomo.
- Nel 1914, negli USA, Traum isolò *Brucella suis* da aborti suini.
- Negli anni successivi furono scoperte altre brucelle animali: *Brucella ovis* dalle pecore, *Brucella neotomae* da roditori del deserto dello Utah, *Brucella canis* da cani e per ultima, nel 1994, *Brucella maris* da cetacei spiaggiati.
- Nel 1918, negli USA, Evans dimostrò la somiglianza tra il "bacillo di Bang" e *Micrococcus melitensis*.
- Nel 1920 Meyer e Shaw proposero di raggruppare i due germi sotto lo stesso genere *Brucella*, chiamato così in onore del primo scopritore David Bruce. Le due specie furono chiamate *B. abortus* e *B. melitensis*.

C'è un'area endemica nel Mediterraneo, dove c'è un tentativo di controllo della diffusione della malattia, attraverso dei programmi vaccinali, screenings sierologici e macellazione degli animali

sieropositivi (7). Le infezioni latenti e le inadeguate protezioni fornite dai vaccini intralciano il successo di questo tipo di approccio. Per questo, l'eradicazione di questa malattia resta ancora un obiettivo lontano da raggiungere.

Attualmente, la diagnosi di Brucellosi nei ruminanti è solitamente basata sull'isolamento degli agenti eziologici e su test sierologici indiretti. L'isolamento e la coltura dei patogeni rappresenta il miglior metodo diagnostico ma porta via molto tempo e non è compatibile con una diagnosi veloce, necessita di laboratori e personale specializzato.

Nella specie bufalina, le prove sierologiche, come la fissazione del complemento (CFT), la sieroagglutinazione (SAT) e altri test sono usati di routine per la ricerca degli anticorpi specifici (8). Questi test permettono di identificare gli animali infetti solo quando iniziano già ad eliminare l'agente eziologico e inizia la diffusione dell'infezione. In più, i test sierologici, basati sull'uso di preparazioni di antigeni interi, non permettono la distinzione tra bufali infetti dagli animali vaccinati.

Diversi studi, dimostrano che le tecniche basate sul DNA rappresentano rapidi e realizzabili strumenti come alternativa ai test sierologici e ai metodi di isolamento e di coltura dei batteri (9, 10, 11, 12).

Tra queste la PCR è stata utilizzata per la sua accuratezza e sensibilità.

La versione più evoluta della PCR qualitativa o convenzionale è la PCR real time o QPCR. Quando applicata alla diagnosi di Brucellosi la QPCR ha il vantaggio di essere più sensibile riducendo le manipolazioni e il rischio per le contaminazioni.

Recenti studi hanno provveduto a sviluppare un progresso tecnologico per l'identificazione molecolare e la quantificazione di brucella in diverse specie animali e negli esseri umani (**13, 14, 15, 16, 12**).

La Brucella, oltre che nei bovini e negli uomini, è stata riscontrata anche in: bisonti americani, bufali, cammelli, lama, renne, lepri, visoni, volpi, alci, daini, volatili, in artropodi come le zecche, nelle quali ha una lunga permanenza e la possibilità di trasmissione transovarica.

BRUCELLA spp.

Nel genere *Brucella* sono comprese sei specie: *melitensis*, *abortus*, *suis*, *neotomae*, *ovis* e *canis*.

Le prime quattro si ritrovano normalmente in fase liscia, le ultime due costantemente in fase dissociata.

Ad eccezione di *B. neotomae*, tutte sono patogene per gli animali domestici, nei quali provocano un' infezione a decorso ordinariamente cronico con sintomatologia clinica a volte manifesta e per lo più a carico degli organi della sfera genitale (aborto, metrite, orchite, epididimite, ipofecondità e sterilità maschile e femminile) e spesso uno stato infettivo inapparente (brucellosi asintomatica o latente).

B. melitensis, *B. abortus*, *B. suis* e *B. canis* sono in grado di determinare malattia nell'uomo.

Sotto l'aspetto morfologico, tintoriale e colturale le brucelle non sono differenziabili tra loro; esse manifestano però anche alcune peculiari attività, in buona parte di tipo biochimico-metabolico, che ne consentono una esatta caratterizzazione.

Caratteri comuni

Si tratta in ogni caso di microrganismi di forma bacillare o cocco bacillare, molto piccoli (0,6-2,0 x 0,3-0,5 μm) immobili, asporigeni, privi di capsula, Gram negativi. Sono aerobi, con limiti di sviluppo compresi tra 20 e 40° C e *optimum* a 37° C e pH variabile da 6,6 a 7,4. E' da ricordare tuttavia che numerosi stipiti di *B. abortus* (generalmente in primo isolamento) e tutti gli stipiti di *B. ovis* (sempre) richiedono, per la crescita, una certa tensione di CO₂ (5-10%).

Nei terreni di coltura ordinari le brucelle si moltiplicano stentatamente. Il loro sviluppo è decisamente favorito dall'aggiunta di alcune sostanze come glucosio, siero (bovino, equino), glicerina. Fra i terreni solidi indicati come elettivi si raccomandano in particolare l'agar-glicerina-destrosio, l'agar-patata-glicerinato, l'agar-siero-destrosio nonché l'agar tryptose e l'agar trypticase soy. Per l'isolamento in purezza da materiale patologico è necessario il ricorso a terreni selettivi, dei quali si dirà nel paragrafo dedicato alla diagnosi. In terreni solidi la crescita è lenta: comincia a rendersi evidente dopo 24.36 h ed è completa dopo 2-3 giorni. Le colonie appaiono piccole (3-4 mm), traslucide, lisce, a margini netti. In terreni liquidi (brodo tryptose) la crescita è svelata da intorbidamento uniforme e, ove si prolunghi il tempo di incubazione, da scarso deposito vischioso sul fondo.

Caratteri differenziali

Com'è noto, non esiste possibilità di differenziare tra loro le brucelle su base sierologica, possedendo le quattro specie in fase S e le due specie in fase dissociata antigeni di superficie in comune anche se in proporzioni spesso (ma non sempre) diverse. Su tale base non si potrebbe mai, ad esempio, distinguere *B. abortus* e *B. suis* da *B. melitensis* oppure *B. ovis* da *B. canis*.

Per ottenere un'esatta caratterizzazione si dispone oggi di una serie di test, che consentono non solo una identificazione di specie ma anche il riconoscimento, all'interno di alcune specie, di diverse biovarianti (3 per *B. melitensis*, 8 per *B. abortus* e 5 per *B. suis*). I più importanti di questi test hanno lo scopo di verificare, nello stiptote in esame, le seguenti proprietà:

- Esigenza di CO₂;
- Produzione di H₂S,
- Crescita in presenza di coloranti;
- Agglutinazione con sieri monospecifici;
- Sensibilità a fagi;
- Attività ossidativo-metabolica;
- Comportamento su terreno di Petraghani.

Esigenza di CO₂ – E' prerogativa, come si è visto, della maggioranza dei ceppi di *B. abortus* e della totalità dei ceppi di *B. ovis*.

Produzione di H₂S. – Si controlla molto semplicemente introducendo per 3-4 giorni consecutivi delle cartine all'acetato di piombo nelle colture in agar fissandone un'estremità fra il tappo e il vetro della provetta. In presenza di idrogeno solforato le cartine anneriscono più o meno intensamente per la formazione di solfuro di piombo. Produce H₂S la maggior parte degli stipti di *B. abortus*, alcuni stipti di *B. suis* e *B. neotomae*.

Crescita in presenza di coloranti. – Alcuni coloranti di anilina, tra cui la fucsina basica e la tionina, aggiunti a terreni solidi di coltura in basse concentrazioni (di solito da 1:25000 a 1:100000), hanno la capacità di inibire lo sviluppo di talune brucelle e non di altre. In genere *B. melitensis* cresce in presenza di entrambi i coloranti, *B. abortus* sempre in presenza di fucsina e talora di tionina, *B. suis* soltanto in presenza di tionina. Esistono tuttavia differenze fra le diverse biovarianti.

Agglutinazione con sieri monospecifici. – Si sa che *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* in fase S posseggono due antigeni (epitopi) denominati A ed M e che esistono differenze quantitative fra questi antigeni in *B. abortus* e *B. suis* da un lato e *B. melitensis* dall'altro. Infatti in *B. abortus* e *B. suis* il rapporto tra antigene A e antigene M è di 20:1 e in *B. melitensis* di 1:20; viceversa in *B. melitensis* il rapporto tra antigene M e antigene A è di 20:1 e in *B. abortus* e *B. suis* di 1:20. Stando così le cose, appare ovvio come non sia possibile differenziare *B. melitensis* dalle altre due specie mediante test di agglutinazione con i normali antisieri di specie.

Trattandosi di differenze antigeni semplicemente quantitative, è invece possibile assorbire gli anticorpi A da un siero anti-*melitensis* mettendo quest'ultimo a contatto con *B. abortus* e, analogamente, assorbire gli anticorpi M da un siero anti-*abortus* mediante contatto con *B. melitensis* fino ad ottenere nei due casi “sieri monospecifici” A ed M, in grado di agglutinare soltanto quei ceppi che possiedono l'antigene predominante corrispondente.

Sensibilità ai fagi. – La determinazione della recettività ai fagi riveste fondamentale importanza per il riconoscimento delle varie specie di brucelle.

Tra i batteriofagi oggi disponibili, si utilizzano di preferenza i seguenti: Tb (Tblisi), Wb (Weybridge), BK2 (Berkeley), IZ1 (Izatnagar), R/C e R/O. In pratica ciascuno di essi viene adoperato a RTD (*Routine Test Dilution*), che è la più alta diluizione del fago ancora in grado di provocare lisi del 100% delle cellule batteriche ed a RTD x 10⁴, cioè in concentrazione pari a 10.000 volte RTD.

Attività ossidativo - metabolica. – L'effettuazione dei test fin qui considerati è, nella grande maggioranza dei casi, sufficiente per una corretta identificazione degli stipiti. Per una esatta caratterizzazione di alcuni di essi può tuttavia rendersi necessario saggiare anche l'attività ossidativo-metabolica.

Premesso che ogni specie del genere *Brucella* ha un suo modo caratteristico di utilizzare l'ossigeno su determinati substrati (aminoacidi e idrati di carbonio), per definire il tipo di metabolismo ossidativo occorre valutare, con l'apparecchio di Warburg, la capacità dei microrganismi di utilizzare l'ossigeno in presenza di ciascun substrato, di calcolare cioè il numero di microlitri di ossigeno utilizzati per mg di azoto e per ora, dopo avere detratto la quota relativa alla respirazione endogena.

Si tratta, com'è intuitivo, di indagini costose, complesse, pericolose per l'operatore, che possono essere fatte solo in laboratori altamente specializzati.

Per maggior chiarezza si riportano nelle successive tabelle le caratteristiche differenziali delle specie del genere *Brucella* e delle loro biovarianti, sulla base dei comportamenti che emergono dall'esecuzione dei test presi in esame (ad esclusione dell'attività ossidativo-metabolica).

La suddivisione in sei specie e, ancor più, il riconoscimento di diverse biovarianti nell'ambito delle tre specie classiche (*melitensis*, *abortus e suis*), sono stati e sono spesso oggetto di critiche. Recenti ricerche sul DNA batterico hanno dimostrato una notevole omologia genomica del genere *Brucella*, dando ulteriore credito alla proposta dei tassonomi che chiedono da tempo una nuova classificazione basata su criteri genetici.

Comportamento su terreno di Petraggiani:

Brucella abortus: non cresce su terreno di Petraggiani perché non riesce ad acidificare il terreno che è alcalino;

Brucella melitensis: cresce rigogliosamente, facendo virare il colore da verde chiaro a verde scuro;

Brucella suis: cresce solo in assenza di verde di malachite.

Specie	Biovariante	Esigenza di CO ₂	Produzione H ₂ S	Crescita in presenza di					Agglutinazione con sieri monospecifici		
				Tionina			Fucsina		A	M	R
				a	b	c	b	c			
<i>Melitensis</i>	1	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
	2	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
	3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>Abortus</i>	1	±	+	-	-	-	+	+	+	-	-
	2	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
	3	±	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	4	±	+	-	-	-	+	+	-	+	-
	5	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
	6	+	±	-	+	+	+	+	+	-	-
	7	-	±	-	+	+	+	+	+	+	-
	9	±	+		+	+	+	+	-	+	-
	<i>Suis</i>	1	-	+	+	+	+	-	-	+	-
2		-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
3		-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
4		-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
5		-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
<i>Neotomae</i>		-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>Ovis</i>		+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>Canis</i>		-	-	+	+	+	-	±	-	-	+

Legenda: a= diluizione 1/25000; b= diluizione 1/50000; c= diluizione 1/100000

Tabella 1. Caratteristiche differenziali delle specie del genere *Brucella* e delle loro biovarianti.

Specie e biovarianti	Fagi a RTD					R/C
	Tb (*) R/O	Wb	BK2	Iz1(**)		
<i>Melitensis</i> 1,2 e 3	-	-	+	-	-	-
<i>Abortus</i> 1,2,3,4,5,6,7 e 9	+	+	+	+	-	-
<i>Suis</i> 1,2,3,4 e 5	-	+	+	+	-	-
<i>Neotomae</i>	-	+	+	+	-	-
<i>Ovis</i>	-	-	-	-	+	+
<i>Canis</i>	-	-	-	-	+	-

(*) A RTD x 10⁴ lisa anche *B. suis*. (**) A RTD lisa anche *B. melitensis* e *B. suis* in fase R; A RTD x 10⁴ lisa anche *B. melitensis*.

Tabella 2. Caratterizzazione delle specie del genere *Brucella* in base alla sensibilità ai fagi

La classificazione attuale continua peraltro a fornire preziose indicazioni in campo epidemiologico. Ne consegue la opportunità che la diagnostica di routine non rimanga solo e sempre limitata all'accertamento sierologico, ma preveda il più frequentemente possibile l'isolamento e la precisa caratterizzazione dell'agente causale responsabile dei vari focolai. Tutto ciò allo scopo di:

- a) Disporre di elementi utili a capire l'origine del contagio;
- b) Costruire mappe epidemiologiche che consentano di rendersi rapidamente conto della comparsa di specie e di biovarianti non ancora segnalate;
- c) Vigilare sulla possibilità di isolamento di stipiti vaccinali utilizzati impropriamente nelle campagne di profilassi;
- d) Verificare – nelle zone dove l'incidenza della brucellosi è modesta o la malattia in fase avanzata di eradicazione – che le positività sierologiche siano effettivamente dovute a infezioni da *Brucella* e non a reazioni crociate con microrganismi di altri generi.

Correlazioni antigeni tra brucelle e altri microrganismi.

Relazioni antigeni tra brucelle in fase S e altri microrganismi sono note da tempo; tuttavia in epoca più recente nuove importanti informazioni sono state acquisite in questo campo.

Il fenomeno riveste, com'è facile arguire, un interesse tutt'altro che trascurabile sul piano pratico poiché può, in certe situazioni, essere causa di confusione e di errore nella interpretazione dei test sierologici, sui quali si basano tutti i programmi di eradicazione della brucellosi dagli allevamenti.

I microrganismi di maggior significato epidemiologico con i quali tali relazioni hanno potuto essere dimostrate sono: *Francisella tularensis*, salmonelle del gruppo N, *E. coli* e *Yersinia enterocolitica* 0:9, *Ochrobactrum spp.*,

Francisella tularensis. – Mentre l'infezione naturale da *Francisella tularensis* o la vaccinazione contro la tularemia possono evocare la comparsa di anticorpi che reagiscono a titoli significativi nei riguardi di *B. abortus*, nel caso opposto gli anticorpi che reagiscono nei riguardi di *F. tularensis* sono presenti a titoli molto più bassi.

Reazioni crociate di questo tipo interessano più la patologia umana che quella veterinaria, visto che la tularemia colpisce raramente gli animali di maggior interesse zootecnico e vengono svelate soprattutto dal test di sieroaagglutinazione. Altri test, tra cui la fissazione del complemento, possono rivelarsi utili ai fini di una corretta interpretazione dei risultati.

Salmonelle del gruppo N. – In genere i sierotipi del gruppo N, portatori dell'antigene 0:30, determinano negli animali la comparsa di anticorpi che reagiscono nei confronti di antigeni brucellari S a titoli più elevati di quanto si osservi nella situazione inversa. In ogni caso la risposta verso l'antigene eterologo si esprime con titoli chiaramente inferiori a quelli della risposta verso l'antigene omologo e ha, rispetto a quest'ultimo, una minore durata.

Gli anticorpi eterologhi vengono svelati, oltreché dalla agglutinazione lenta e rapida con antigene al Rosa bengala, anche da fissazione del complemento, immunodiffusione in agar ad ELISA. Valore

discriminante sembrano possedere il test di Coombs e quello al 2-mercap-toetanolo.

Escherichia coli. – L'inoculazione sperimentale di *E. coli* 0:116 e 0:157 stimola nel bovino la formazione di titoli elevati di anticorpi agglutinanti, precipitanti e fissanti il complemento svelabili con antigene *B. abortus*. Tali anticorpi eterologhi decadono piuttosto rapidamente (1-2 mesi) e non raggiungono mai i livelli degli omologhi. Buone possibilità di discriminazione sembra offrire, in questo caso, il test ELISAQ.

Yersinia enterocolitica 0:9. – E' l'agente microbico che presenta le maggiori affinità antigeni con le brucelle fra quelli finora considerati; potenzialmente esso rappresenta pertanto la principale causa di reazioni crociate capaci di ingenerare confusione nella diagnosi sierologica di brucellosi nelle varie specie animali.

Sia l'infezione naturale che quella sperimentale da *Y. enterocolitica* 0:9 danno luogo alla formazione di anticorpi anti-*Brucella* a titoli di pari intensità e durata di quelli evidenziabili nei confronti dell'antigene omologo. Il fenomeno è reciproco.

Nonostante i tentativi effettuati da più parti, non esiste al momento attuale alcun metodo in grado di differenziare gli anticorpi omologhi da quelli eterologhi.

Ochrobactrum – *Ochrobactrum anthropi*, precedentemente conosciuto come *Achromobacter species* (CDC group Vd), colonizza un ampio spettro di organismi e viene sempre più riconosciuto come un potenziale e problematico patogeno umano, opportunistica e

nosocomiale. È caratterizzato da un ampio spettro di resistenza agli antibiotici. Il genoma 4.8 Mb di *Ochrobactrum anthropi* si compone di due cromosomi circolari non identici. Il genoma ha un contenuto medio di C+G del 56.22 % e insieme comprendono 4.424 geni codificanti proteine, insieme con 31 pseudogeni e 73 RNA's strutturali. (rRNA, tRNA e small RNA). Il genoma di *O. anthropi* contiene anche quattro plasmidi, pOAN01, pOAN02, pOAN03 e pOAN04. I primi tre che possiedono le caratteristiche previste dei plasmidi degli alfa-proteobatteri., mentre per l'ultimo non è nota la replicazione, la partizione e i sistemi di coniugazione.

È versatile ed ha la capacità di colonizzare una gamma ampia di habitat, da ambienti ostili come il suolo inquinato all'acqua, le piante, i nematodi, gli insetti, gli animali e gli uomini.

Presenta una forma bastoncellare, gram negativo ed è mobile grazie alla presenza di flagelli peritrichi. Cresce su agar e le colonie presentano un diametro di circa 1 micron, non pigmentate, circolari, lisci e lucenti. La temperatura ottimale per la crescita è tra 20 e 37° C.

Resistenza

Alle brucelle vengono riconosciute ampie possibilità di sopravvivenza anche in condizioni poco favorevoli. E' tuttavia estremamente difficile stabilire con precisione i tempi di tale sopravvivenza, per le condizioni infinitamente variabili cui esse possono essere sottoposte in natura. Tra queste condizioni rivestono particolare importanza: il numero dei germi presenti nell'ambiente e il materiale in cui sono contenuti; i vari fattori fisico-chimici che agiscono su di essi (essiccamento, putrefazione, pH, raggi solari, etc.); i fattori ambientali e climatici (temperatura e umidità). In tal modo l'inattivazione avviene entro

tempi brevi (da pochi minuti a qualche ora) quando i germi nell'ambiente sono pochi e si trovano esposti, soprattutto in primavera-estate, all'azione diretta dei raggi solari. Di converso, le possibilità di sopravvivenza aumentano- anche sensibilmente- nel caso in cui forti quantità di m microrganismi sono emesse all'esterno (come capita in occasione di aborto) e vengono a trovarsi esposte ad un clima freddo-umido, al riparo dalla luce.

All'essiccamento e alla putrefazione le brucelle sono in grado di resistere per 30 giorni e oltre. La luce solare diretta le inattiva in pochi minuti mentre il calore umido le uccide in 3h a 55°C, in 1,5h a 60°C e in 15 min a 65°C. Non resistono alla pasteurizzazione. Conservano la loro piena vitalità per mesi e anni alle basse temperature.

Notevole interesse riveste la conoscenza dei tempi di sopravvivenza nei latticini, nelle carni, nei visceri e negli insaccati per le evidenti ripercussioni di ordine igienico-sociale.

Per quanto riguarda il formaggio pecorino, è stato posto in evidenza che mentre è possibile isolare i germi fino al 60° giorno, ciò non lo è più al 90° giorno. Discordanti sono invece i dati concernenti i burrini la cui infettività, conseguente a contaminazione artificiale, oscilla entro limiti oltremodo ampi: da 30h a 142 giorni.

Numerose indagini sono state intraprese per determinare la persistenza dei microrganismi nelle masse muscolari e nei visceri, la contaminazione dei quali è relativamente facile e frequente, specie durante la fase di batteriemia. Si è potuto in tal modo rilevare che *B. abortus* nelle carni bovine, conservate tra 3 e 5°C, si mantiene infettante per oltre due settimane e che tale infettività raggiunge 18 mesi a temperatura di -27°C; che *B. suis* presente nei linfonodi, nella milza e nel fegato dei suini naturalmente infetti, sopravvive sin oltre

40 giorni a temperature comprese tra -10 e -40°C; che in carni salate e affumicate *B. abortus* può mantenersi vitale e infettante per un periodo oscillante da 4 a 11 settimane. Infine, in insaccati da consumarsi crudi e preparati con sola carne suina la stessa *B. abortus* è stata trovata pienamente virulenta dopo 58 giorni.

Le brucelle vengono rapidamente inattivate dai comuni disinfettanti.

BRUCELLA ABORTUS

E' l'agente primario della brucellosi bovina e bufalina. Se ne conoscono oggi 8 biovarianti, di cui la 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 sono state identificate in Italia. Nei paesi mediterranei, compreso il nostro, l'infezione è però non di rado sostenuta da *B. melitensis*.

La brucellosi dei bovini e dei bufali è ancora presente in tutti i continenti e costituisce da sempre uno dei più gravi problemi zoo economici per gli ingenti danni che essa provoca negli allevamenti di animali da riproduzione, a causa della perdita dei prodotti del concepimento, delle infezioni genitali, spesso susseguenti all'aborto e/o alla ritenzione di placenta e quindi dei fenomeni di ipofecondità o di sterilità temporanea o permanente, della diminuzione della secrezione latte, dell'aumentata incidenza delle malattie neonatali e del notevole deprezzamento commerciale dei soggetti colpiti.

Grazie all'attuazione di programmi di lotta pianificata, l'infezione è attualmente in chiaro regresso in alcune nazioni (Australia, USA, Nuova Zelanda, Francia, Portogallo, Giappone) ed è stata del tutto eradicata in altre (Canada, Austria, Svizzera, Regno unito, Irlanda, Finlandia, Repubblica Ceca, Germania, Svezia, Norvegia, Polonia e Romania).

Epidemiologia

Il moderno orientamento verso allevamenti di tipo industriale o semindustriale anche per bovine e bufale da riproduzione (in particolare da latte) ha accresciuto non solo le probabilità di infezione, ma anche le occasioni di contagio e le difficoltà di eradicazione della malattia. La costituzione di grossi contingenti di animali comporta

infatti spesso il loro ammassamento in recinti all'aperto per lunghi periodi, con ampie possibilità di contatti reciproci. Le medesime considerazioni valgono per gli allevamenti di bovine e bufale adibite alla produzione di vitelli da carne, le quali vivono abitualmente in libertà, allo stato semibrado, e quindi in continua promiscuità.

In queste condizioni, oltre al rischio di trasmissione venerea del contagio derivante dalla monta naturale, diventa difficile se non impossibile isolare di volta in volta le femmine prossime al parto o riconoscere con tempestività una minaccia di aborto.

Di solito la brucellosi penetra in un allevamento indenne in seguito all'introduzione di una o più bovine infette (talora sieronegative) e quindi diffonde all'interno dell'allevamento stesso per contaminazione ambientale da parte di brucelle emesse con il feto, i liquidi e gli involucri fetali e la secrezione uterovaginale.

Il fenomeno "aborto" riveste importanza epidemiologica fondamentale. Si pensi che nel momento in cui esso si manifesta si ha la dispersione all'esterno di un numero di microrganismi valutato in 1000-10 000 miliardi. Considerato che 15 milioni di questi microrganismi sono in grado di provocare, per via congiuntivale, aborto nel 95% di manze gravide, si deduce che la quantità di brucelle eliminate è sufficiente a infettare da 60 000 a 600 000 manze gestanti.

Anche se in termini più modesti, la stessa situazione si ripete nel caso di parti prematuri o di "parti a termine infettanti", che sono la regola in bovine che acquisiscono l'infezione nell'ultima fase della gravidanza.

Nella secrezione uterovaginale successiva ad un aborto, ad un parto prematuro o ad un parto infettante, le brucelle si ritrovano costantemente durante le prime 2 – 3 settimane, il loro numero

decrese in seguito e la loro reperibilità in utero e vagina diventa saltuaria; nel 10 – 15% dei casi esse sono tuttavia ancora presenti al momento del parto successivo.

Un ruolo non trascurabile nella propagazione del contagio possono svolgere i cosiddetti “portatori latenti” di brucelle. Si tratta di animali esposti all’infezione *in utero* durante l’ultimissimo periodo di gestazione. Poiché questi animali non presentano alla nascita né dopo alcuna fenomenologia morbosa e, soprattutto, poiché risultano costantemente negativi a tutti gli esami sierologici di uso comune, si è sempre ritenuto che l’infezione fosse destinata ad esaurirsi in breve tempo e che gli animali stessi riacquisissero poi la loro piena recettività all’epoca della maturità sessuale. È stato invece dimostrato che ciò non è sempre vero, ma che esiste la possibilità che nelle vitelle l’infezione rimanga allo stato di latenza nel primo periodo della vita per trasformarsi in infezione attiva al momento della prima gravidanza, con tutte le conseguenze relative (aborto, ritenzione placentare, reazioni sierologiche positive ad altro titolo, ecc.).

Questa infezione verticale, anche se non frequente in condizioni naturali (dal 2,5 al 3,7% degli animali), riveste non poca importanza sul piano pratico della profilassi, in quanto possibile origine di “ritorni ciclici” di brucellosi in allevamenti ritenuti risanati, per la comune tendenza ad allevare per la rimonta vitelle nate in detti allevamenti e considerate sane perché sieronegative.

La mammella rappresenta notoriamente una delle sedi di localizzazione preferenziale per le brucelle. L’incidenza di tale localizzazione si aggira attorno all’80% delle bovine infette. L’infezione può così trasmettersi con il colostro e il latte; in quest’ultimo i microrganismi si riscontrano in quantità estremamente

variabili e, spesso, con discontinuità, per i periodi che in genere non vanno oltre una lattazione.

La brucellosi viene a buon motivo considerata una infezione venerea, trovando modo di diffondere – anche se non frequentemente nei bovini – attraverso l'accoppiamento. A questo riguardo il toro può comportarsi, al pari dei maschi riproduttori di altre specie, come “trasmettitore attivo” allorchè presenta infezione localizzata agli organi genitali (testicolo, epididimo) e/o alle strutture annesse (vescicole seminali, prostata, ghiandole bulbo uretrali), oppure come “trasmettitore passivo” quando, pur non essendo portatore di lesioni genitali, propaga il contagio a femmine sane dopo la copula con femmine infette.

Sulla infettività delle urine non si hanno conoscenze certe per la pressoché totale mancanza di indagini sperimentali al riguardo. Si ammette che le brucelle possano venir eliminate per via urinaria in concomitanza con la fase di batteriemia, mentre sembra doversi escludere una loro localizzazione in sede renale e quindi una escrezione in forti quantità e per lunghi periodi.

Le feci sono contagianti per breve tempo solo nel caso di vitelli che assumano colostro e latte da madri con infezione mammaria.

Diversi animali selvatici, specialmente roditori, sono stati riconosciuti portatori di brucelle, ma nessuno di essi riveste importanza nella diffusione di *B. abortus*. Esiste invece la possibilità che quest'ultima venga trasmessa meccanicamente a bovini attraverso la puntura di insetti (stomossidi, tabanidi, mosche domestiche, zanzare) alimentatisi su soggetti batteriemici o su materiale patologico (feti, placenta, secrezioni).

B. abortus (e *B. melitensis*) è stata inoltre isolata a più riprese da diversi generi di zecche, che ne diverrebbero serbatoi anche per lunghi periodi, con possibilità di trasmissione verticale. Tuttavia anche in aree endemiche il numero delle zecche che si trovano infette è sempre molto modesto e, ciò che più conta, quello dei microrganismi per zecca è minimo.

Patogenesi

In condizioni naturali l'infezione si realizza per via digerente (mucosa orale e tonsille, mucosa gastrointestinale) in seguito all'assunzione di foraggio o di acqua contaminati. La penetrazione delle brucelle può inoltre aver luogo attraverso la mucosa oculocongiuntivale o vaginale o, più raramente, respiratoria oppure attraverso soluzioni di continuo cutanee.

Pervenuta in un animale recettivo, *B. abortus* si moltiplica nella sede di ingresso, dove si ha peraltro un rapido inglobamento da parte di leucociti polimorfonucleati nel tentativo di bloccare l'infezione. Le brucelle sono parassiti endocellulari facoltativi e quindi capaci di moltiplicarsi in numerose cellule (oltre a neutrofili e macrofagi, cellule del corion, di Kupffer, alveolari polmonari, ecc.). per effetto di tale moltiplicazione i leucociti vanno incontro a necrosi; sia i germi che i residui cellulari vengono quindi fagocitati da cellule mononucleate le quali, per via linfatica, giungono ai linfonodi regionali trasferendo l'infezione in questa sede. Come reazione si stabilisce una iperplasia delle cellule del SRE a livello linfonodale, con produzione di granulomi.

Se i microrganismi riescono a superare questa barriera, guadagnano il torrente circolatorio; dopo il loro inglobamento da parte di

polimorfonucleati, monociti e cellule del SRE, l'ulteriore diffusione avviene attraverso il circolo ematico (*batteriemia primaria*), con localizzazione nella milza, nel fegato, nel midollo osseo e nei linfonodi. Anche questi organi reagiscono con iperplasia cellulare, di solito in combinazione con la formazione di lesioni granulomatose.

A questo momento l'ulteriore destino dell'infezione varia a seconda che l'animale sia pubere o impubere, gravido o non. Negli animali impuberi, maschi e femmine, di norma i germi vengono inattivati dalla vivace reazione immunitaria dell'organismo e il processo infettivo si estingue completamente. Questa "guarigione eziologica" lascia tuttavia gli animali stessi del tutto ricettivi nei confronti di una eventuale successiva reinfezione.

Quando la prima infezione colpisce femmine gravide di non oltre 4-5 mesi, le brucelle rimangono quiescenti nelle sedi in cui sono pervenute con la batteriemia primaria. A partire dal 5° mese di gestazione esse però si mobilitano, si riversano nuovamente in circolo e, attraverso una *batteriemia secondaria*, raggiungono gli organi bersaglio di elezione (placenta e feto), dove si moltiplicano con straordinaria intensità.

Nel caso in cui l'infezione coincida con uno stadio di gestazione avanzato (oltre il 5° mese), si ha solo una batteriemia primaria con immediata e diretta disseminazione delle brucelle nell'utero gravido e nelle altre sedi preferenziali.

Nelle femmine puberi non gravide e in lattazione i germi spesso pervengono, con la batteriemia primaria, anche alla mammella ove si insediano dando luogo a focolai di "micromastite".

Diverse ipotesi sono state formulate per spiegare la spiccata predilezione che le brucelle manifestano per l'utero gravido. Sembra

oggi definitivamente acquisito che il fenomeno è dovuto alla presenza, nella placenta e nel feto, di un alcool tetravalente, il d-eritritolo, un carboidrato capace di stimolare fortemente *in vitro* e *in vivo* l'attività metabolica e quindi riproduttiva dei microrganismi, che lo preferiscono allo stesso glucosio come fonte di energia.

La più elevata quantità di eritritolo si ritrova nel feto oltre il 4° mese di gravidanza (dopo la prima metà della gestazione nelle altre specie animali), in percentuali assai minori nelle vescicole seminali e nei testicoli di toro (oltreché di ariete, becco, verro e cane). È assente negli animali imuberi.

Pervenute nell'utero gravido, le brucelle si localizzano e si riproducono intensamente nel corion placentare o placenta fetale, dando luogo ad un processo infiammatorio di tipo fibrinoso-necrotico-purulento. Questa flogosi placentare (cotiledonite) finisce col provocare interruzione degli scambi nutritivi materno-fetali; determinando, inoltre, tenaci aderenze fra corion e matrice, essa è poi causa della ritenzione degli invogli, che molto spesso consegue all'aborto.

Per via ematica o attraverso il liquido amniotico le brucelle finiscono tuttavia sempre per invadere il prodotto del concepimento, nel quale inducono un'infezione acuta generalizzata, che è da ritenere la vera responsabile della morte del feto stesso per gli effetti della brutale azione esercitata dalle endotossine brucellari.

Caratteri della malattia

Sintomi. – La brucellosi bovina e bufalina è infezione a decorso cronico, spesso in apparente, caratterizzata essenzialmente da aborto

nelle femmine e da processi infiammatori a carico degli organi genitali nei maschi.

L'aborto si manifesta in genere tra il 4° e l' 8° mese di gestazione, con prevalenza tra il 6° e il 7°; è eccezionale prima del 4°, raro dopo l' 8°. Il tempo che intercorre tra infezione e morte del feto varia entro limiti piuttosto ampi e la sua durata è inversamente proporzionale alla fase della gestazione. In vacche e bufale gravide di oltre 5 mesi tra i due eventi trascorrono da 20 a 30 giorni, in vacche in fase iniziale di gravidanza 180 giorni e più.

I segni clinici sono di solito poco appariscenti e l'espulsione del feto avviene senza palese interessamento dello stato generale dell'animale. Due o tre giorni prima si può osservare tumefazione vulvare, scolo vaginale, lieve rilasciamento dei legamenti sacro-ischiatici e ingrossamento mammario. All'aborto segue frequentemente ritenzione di placenta, cui residua talvolta metrite acuta o cronica. È raro che l'aborto si ripeta nella gravidanza successiva. Coincidendo l'infezione con la fase terminale della gestazione sono possibili, come si è già detto, parti prematuri, casi di mortinatalità e anche parti a termine infettanti.

Nel maschio i processi a carico di testicolo ed epididimo assumono andamento per lo più cronico. I sintomi sono variabili; talora è evidente un ingrossamento simmetrico dello scroto, con progressivo aumento di volume del testicolo, che appare duro e indolore con ispessimento capsulare; tal'altra si ha raccolta, anche notevole, di essudato nella vaginale; altre volte infine l'infezione evolve sotto forma di orchite ed epididimite purulente.

La mastite brucellare non si esprime con sintomi apprezzabili; essa provoca solo una modica diminuzione della secrezione latte (circa il

10%) ed alterazioni fisico-chimiche della stessa (diminuzione del lattosio, aumento dei cloruri).

Al di fuori dell'apparato genitale, l'infezione può rivelarsi in rari casi con lesioni articolari sotto forma di igromi precarpici, bursiti, sinoviti e artrosinoviti, soprattutto in animali adulti.

Lesioni. – Le più significative si riscontrano a carico della placenta. Le membrane placentari sono più o meno infiltrate, ispessite e ricoperte da essudato necrotico-purulento, specie in corrispondenza dei cotiledoni che si presentano ingrossati, emorragici, in preda a fatti degenerativi, giallo-grigiastri, molli e perfino poltacei oppure rossi al centro e gialli alla periferia.

A carico degli invogli è pressoché costante un edema gelatinoso tra corion e allantoide. Il feto presenta fenomeni asfittici o è putrefatto o mummificato. Le alterazioni più evidenti consistono in edema sieroso emorragico del connettivo sottocutaneo, edema con ingrossamento del cordone ombelicale, raccolta di liquido sieroso emorragico nelle cavità splanchniche, gastroenterite catarrale con focolai emorragici nel IV stomaco, rammollimento del parenchima renale.

Le lesioni testicolari sono caratterizzate da sclerosi parenchimale con disseminazione di focolai necrotici oppure, nelle forme colliquative, da ascessi superficiali o profondi a contenuto caseoso-purulento. L'organo appare ingrossato, con tuniche ispessite e aderenti, e materiale purulento nella vaginale. Il processo può essere esteso ai dotti, alle vescicole seminali, alla prostata, alle ghiandole bulbouretrali.

Elementi diagnostici

Gli aborti, i parti prematuri, i casi di mortinatalità, le ritenzioni di placenta, i fenomeni di sterilità, la presenza di alterazioni a carico del feto e degli invogli rappresentano preziosi elementi su cui basare una diagnosi presuntiva. Solo il laboratorio è però in grado di stabilire l'esatta natura dei processi morbosi, non essendo in alcun modo possibile, sulla semplice scorta dei dati epidemiologici, clinici e anatomopatologici, discriminare la brucellosi da altre infezioni a esclusiva o prevalente localizzazione genitale.

Esami di laboratorio. – Consentono di evidenziare e/o isolare l'agente causale nonché di riconoscere indirettamente l'infezione attraverso la ricerca e la titolazione degli anticorpi specifici. L'accertamento diretto prevede l'impiego di esami microscopici, colturali e biologici; quello indiretto l'esecuzione di diversi test sierologici.

Microscopico . – Viene scarsamente utilizzato. Il materiale che meglio si presta a questo tipo di indagine è costituito dal raschiato di cotiledoni placentari. Per una buona visualizzazione delle brucelle occorre sottoporre i preparati a particolari metodi di colorazione, fra i quali risponde bene quello di Koster, che consiste nel colorare con una soluzione di acido acetico (allo 0,5%) e nel ricolorare con una soluzione di bleu di metilene all'1%. In tal modo le brucelle, spesso all'interno delle grosse cellule epiteliali del corion, appaiono colorate in rosso e risaltano nettamente sullo sfondo del preparato, che assume una tinta blu.

Ugualmente poco impiegata in pratica è l'immunofluorescenza diretta per la ricerca dei microrganismi in organi e tessuti vari, a causa dei non infrequenti errori di interpretazione che il metodo comporta.

Colturale. – Tra gli esami diretti è il più importante e affidabile. Il materiale da inviare al laboratorio può essere diverso: invogli fetali, feto, latte, tamponi vaginali, sperma, ecc. Per quanto riguarda il feto val la pena di ricordare che gli organi più ricchi in brucelle sono il polmone, l'encefalo, il IV stomaco e la milza.

Trattandosi in ogni caso di materiale patologico spesso non fresco o abitualmente contaminato, è sempre consigliabile l'uso di terreni selettivi, che sono poi i terreni-base addizionati di antibiotici antibatterici e antifungini (cicloeximide, bacitracina, polimixina B, vancomicina, acido nalidixico, nistatina).

Si ricorda che lo sviluppo di *B. abortus* è subordinato al rispetto di ben definite condizioni di microaerofilia durante l'incubazione delle colture e che l'isolamento della biovariante 2 della stessa *B. abortus* richiede rigorosamente la presenza di siero nel terreno.

Prova biologica. – Vi si fa ricorso solo in particolari circostanze. Può essere utile per svelare la presenza di modeste quantità di brucelle nei tessuti, nelle secrezioni ed escrezioni.

Richiede la disponibilità di materiale fresco, non eccessivamente contaminato, per ovvi motivi. La cavia è l'animale di scelta; inocolata per via sottocutanea o intramuscolare essa mostra, in caso positivo, i segni di un'infezione cronica che si esprime anatomopatologicamente con lesioni necrotiche a carico del fegato, con splenomegalia e aspetto

nodulare della milza. Da questi organi l'isolamento in purezza delle brucelle è estremamente agevole.

Convieni sacrificare gli animali (almeno due per prova) dopo 30-40 giorni dalla inoculazione, previo accertamento sierologico in 15°-20° giorno.

Test sierologici. – Costituiscono la base della diagnosi e quindi il caposaldo di ogni programma di controllo e di eradicazione dell'infezione.

Importanti progressi sono stati conseguiti nel corso degli ultimi vent'anni nella lotta contro la brucellosi bovina in molti Paesi, in seguito alla standardizzazione dei metodi tradizionali e all'applicazione di nuove tecniche. Nonostante questi progressi, si è ancora lontani dal disporre di un test ideale che associ alla facilità e rapidità di esecuzione il pregio di non dar luogo a reazioni falsamente negative (di essere quindi "sensibile") e falsamente positive (di essere, cioè, "specifico").

Ognuno degli esami di *routine* oggi in uso nella pratica ha vantaggi e inconvenienti e nessuno di essi è in grado, da solo o anche in combinazione con altri, di svelare con certezza l'infezione o di escluderla nei singoli animali.

I numerosi studi dedicati di recente alle varie classi di immunoglobuline, che si producono in conseguenza dell'infezione e della vaccinazione, hanno permesso di acquisire preziosi elementi di giudizio sull'effettivo valore dei test sierologici nel riconoscimento di tali immunoglobuline anticorpali.

È ormai dimostrato che le prime a comparire in circolo in seguito a infezione naturale o sperimentale sono le IgM. Ben presto divengono

però predominanti le IgG, che caratterizzano poi in assoluto la fase di cronicità dell'infezione. In questa fase esse sono rappresentate in grandissima parte da IgG1 e in piccola parte da IgG2 mentre il tasso di IgM si abbassa.

La vaccinazione con stipti attenuati in fase S del tipo B19 provoca invece la precoce comparsa di IgM, che persistono a lungo, mentre le IgG (soprattutto le IgG1), che compaiono più o meno nello stesso tempo, scompaiono alquanto prima delle IgM.

Le reazioni oggi correntemente impiegate in pratica sono: la sieroaagglutinazione lenta in tubi (SAL), la sieroaagglutinazione rapida con antigene al rosa bengala o *Rose Bengal test* (RBT), la fissazione del complemento (FC) e il *ring-test* (RT).

La *sieroaagglutinazione lenta* è il più tradizionale dei metodi sierologici. Prevede la diluizione dei sieri per raddoppio (a partire da 1:5) e l'impiego, come antigene, di una sospensione di brucelle previamente titolata in presenza di siero standard internazionale. I risultati vengono espressi in Unità Agglutinanti Internazionali (UAI/ml). Com'è noto, fra i paesi della CEE vige tuttora l'accordo di considerare infetti i bovini che presentano un titolo pari o superiore a 30 UAI/ml. Questo test riconosce le IgM e le IgG2 molto meglio delle IgG1. Per tale motivo pecca assai sia in sensibilità che in specificità: svela infatti male le infezioni croniche e non riesce a discriminare le reazioni da infezione da quelle da vaccinazione. Per migliorarne la specificità è stato di recente suggerito di aggiungere all'antigene piccole quantità di EDTA (etilendiammina tetra-acetato) per la capacità che possiede questa sostanza di inattivare alcune IgM non specifiche.

La SAL, nonostante alcuni limiti, può ancora rendere utili servizi nella prima fase dei programmi di eradicazione, ma esistono molte buone ragioni per escluderla come prova di controllo degli animali nella fase conclusiva delle operazioni di risanamento.

Il *Rose Bengal test* si è affermato ovunque come metodo di *screening* di massa. Utilizza un antigene fortemente acido (pH = 3,6) in cui le brucelle sono colorate con rosa bengala. Sarebbe l'acidità del mezzo a inibire le agglutinine non specifiche eventualmente presenti nei sieri in esame e a conferire pertanto al test un notevole grado di sensibilità.

Svela con maggiore efficacia le IgM rispetto alle IgG1 e IgG2; per tale motivo può dar luogo a false positività in soggetti vaccinati. Possiede tuttavia il pregio di svelare molto bene anche le IgG1 e quindi gli animali con infezione cronica.

Per la sua semplicità, rapidità di esecuzione, economicità e sensibilità il RBT possiede i requisiti per sostituire la SAL come prova di *routine*. Si effettua ponendo a contatto 0,03 ml di siero con una uguale quantità di antigene, mescolando bene con un bastoncino di vetro o di legno e poi con movimenti di rotazione e leggendo dopo 4 minuti. Le reazioni positive sono caratterizzate, a seconda della loro intensità, da fenomeni di agglutinazione appena percettibili oppure dalla formazione di fini o grossi agglutinati di color rosso-rosa.

La *fissazione del complemento* è da sempre considerato il test più sensibile e specifico tra quelli tradizionali. Nei paesi nei quali i programmi di risanamento si trovano in fase di realizzazione avanzata, ha definitivamente sostituito la SAL.

Mette in evidenza sia le IgM che le IgG1 e IgG2, ma soprattutto le IgG1 ; per questa ragione svela molto bene le infezioni croniche e,

entro certi limiti, riesce a differenziare gli animali infetti da quelli vaccinati.

Le varie titolazioni (antigene, emolisina, complemento) e le tecniche di esecuzione sono oggi standardizzate. Qualunque sia il metodo prescelto (a caldo o a freddo in tubi, su piastra, in microtiter), nell'ambito della Comunità Europea si è convenuto di ritenere infetti di brucellosi gli animali che risultano positivi per 20 o più Unità CEE di sensibilizzatrice per ml.

La FC non si può purtroppo considerare un test di *routine*, trattandosi di una reazione delicata, alquanto laboriosa e lunga, che richiede anche personale tecnico addestrato. Il suo impiego si dimostra particolarmente prezioso come verifica di risposte dubbie o non convincenti alla SAL e al RBT.

Il *ring test* è una prova di agglutinazione intesa a svelare la presenza di anticorpi specifici nel latte di vacche infette. Le immunoglobuline maggiormente coinvolte nella reazione sono le IgA di produzione locale e, in linea secondaria, le IgM e IgG di derivazione ematica.

Come test individuale difetta di specificità, risultando spesso positivo in soggetti vaccinati, in determinati periodi della lattazione e in caso di infezioni aspecifiche della mammella. Si è invece affermata come mezzo per l'identificazione rapida degli allevamenti infetti e per la verifica periodica di quelli già risanati; trova quindi particolare applicazione nel controllo del latte proveniente da più animali della stessa azienda (latte dei bidoni di raccolta).

Si esegue aggiungendo una goccia di antigene colorato con ematossilina (bleu) o con trifetil - tetrazolio (rosso) a 1 ml di latte posto in una piccola provetta da sierologia. Dopo aver agitato il tutto fino ad avere un uniforme mescolamento dei due componenti, si pone

in termostato a 37°C per un'ora e quindi si procede alla lettura. In caso di reazione positiva, il complesso antigene-anticorpo formatosi si adsorbe alla superficie dei globuli di grasso e da questi viene veicolato in superficie. Si avrà allora un anello di panna chiaramente colorato in bleu - violetto o in rosso intenso, mentre il latte sottostante riacquista il suo colore bianco. A reazione negativa invece, l'anello di panna è bianco e il latte sottostante conserva il colore bleu chiaro o rosso rosa conferitogli dall'antigene.

È ovvio che in caso di risposta positiva, si dovrà procedere in un secondo momento a esami sierologici individuali sulle bovine da cui il latte del bidone proviene.

Agli inizi della campagna di profilassi è facile, con i metodi sierologici tradizionali, pervenire all'identificazione degli allevamenti infetti. Quando l'eradicazione è in stadio avanzato o in fase conclusiva, può rendersi necessario l'impiego di altri test per ridurre al minimo le reazioni falsamente positive e falsamente negative. I più noti sono il test di Coombs, per annullare l'azione interferente di anticorpi bloccanti nei sieri in esame, e quelli al 2-mercaptoetanololo e al rivanolo per eliminare, dai sieri stessi, le IgM.

Altre tecniche utilizzate per la diagnosi di brucellosi sono:

- Test ELISA (allestito con Ag interni (NH e Poli-B))
- Western Blot: importante per svelare falsi positivi. Non può avere impiego su vasta scala.

Inoltre, negli ultimi anni grande importanza, per la diagnosi delle malattie infettive, sta assumendo la diagnostica molecolare (PCR e PCR real time), con cui si riescono ad ottenere risultati più attendibili e soprattutto in tempi molto più rapidi. Nel caso della diagnosi di brucellosi, con l' utilizzo della PCR real time è possibile anche

differenziare le reazioni specifiche da quelle eterologhe indotte da germi antigenicamente affini e riconoscere i soggetti portatori di infezioni latenti.

Tecniche di diagnostica molecolare

Tra le prove di diagnostica molecolare, la più promettente è senza dubbio la PCR (Polymerase Chain Reaction) per la sua elevatissima sensibilità e specificità.

La PCR è una tecnica molecolare che consente, mediante cicli ripetuti a differenti temperature, di replicare e amplificare, e quindi di evidenziare, una regione specifica di DNA del microrganismo in esame, attraverso l'uso di primers complementari alla sequenza delle estremità della regione bersaglio. La miscela di reazione, contenente il campione di DNA da amplificare, i primers specifici, i desossiribonucleotidi trifosfati (dNTP), una DNA polimerasi termostabile (*Taq* DNA polimerasi) e un tampone adatto all'enzima, è sottoposta al processo che avviene per mezzo di un termociclatore automatizzato.

La PCR si articola in tre fasi: denaturazione, appaiamento (annealing) ed estensione o sintesi (figura 1). Durante la prima fase, il DNA bersaglio a doppio filamento viene denaturato mediante riscaldamento a temperatura di circa 94-95°C, rendendo così accessibile la specifica regione da amplificare (target).

In seguito, la temperatura viene abbassata a valori compresi tra 50 e 60°C per consentire l'appaiamento degli oligonucleotidi specifici (primers) alla sequenza di DNA ad essi complementare (fase di "annealing"). In questo modo, gli estremi 5' degli oligonucleotidi

segnano su ciascun filamento gli estremi del frammento che viene amplificato e i loro estremi 3' offrono alla DNA polimerasi il gruppo idrossilico di innesco alla reazione. Questa progredisce contemporaneamente su entrambi i filamenti e in direzioni antiparallele per estensione dei primers con i nucleotidi trifosfati presenti nella miscela di reazione, ad una temperatura di 72°C

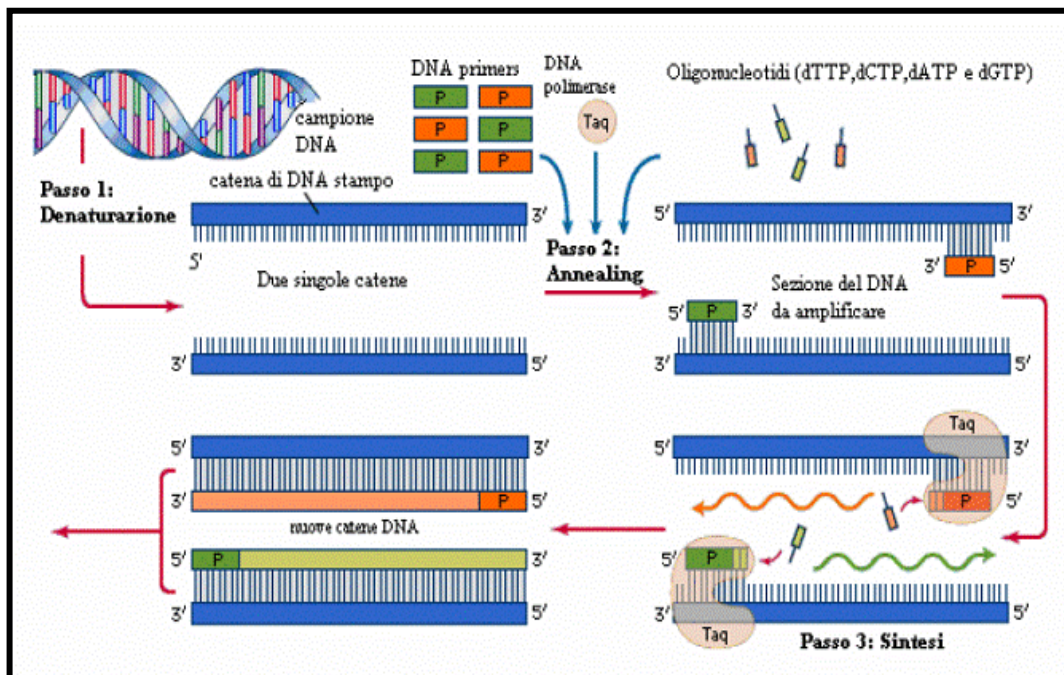


Figura 1. Ciclo completo di PCR.

Alla fine del primo ciclo, il frammento bersaglio è stato duplicato e durante i successivi cicli di denaturazione, appaiamento ed estensione, tutti i nuovi filamenti servono da stampo, cosicché la quantità di DNA prodotta aumenta in maniera esponenziale. Il risultato finale è un'amplificazione selettiva del DNA target, fiancheggiato dai primers.

Il ciclo descritto viene ripetuto generalmente per circa 20-30 volte. Poiché ogni ciclo della reazione dura solo pochi minuti, nel giro di qualche ora si possono produrre notevolissime quantità di DNA target,

anche a partire da campioni biologici contenenti un numero esiguo di molecole bersaglio.

Nella diagnosi della brucellosi la PCR può essere eseguita su: quarto stomaco, polmone, cotiledoni, liquido delle sinovie, latte, sperma, ascessi, tampone nasale, muco vaginale.

In genere, questa tecnica rileva, in maniera più attendibile e con maggiore precisione, gli stadi precoci della malattia. Essa risulta più sensibile dell'osservazione diretta (strisci e colture) e della sierologia ed inoltre, è utile anche per monitorare il decorso della malattia e per classificare le diverse specie di *Brucella* mediante l'impiego di primers specie-specifici.

La tecnica della PCR, pur essendo molto sensibile, non consente la quantificazione del DNA bersaglio di partenza. Tale scopo è stato raggiunto con l'impiego della real-time PCR. La quantificazione degli acidi nucleici è estremamente importante per stabilire il grado di attività di un'infezione, per monitorare l'evoluzione della malattia, per differenziare un'infezione attiva da una persistente, per studiare le interazioni tra microrganismo-ospite, per monitorare l'efficacia o meno di una terapia.

Con la real-time PCR non sono richieste manipolazioni post amplificazione e questo comporta la diminuzione dei tempi di ottenimento dei risultati, ed introduce la possibilità di monitorare in tempo reale l'andamento della reazione.

La real-time PCR si basa su una quantificazione che avviene durante la fase esponenziale della reazione a differenza di tecniche di PCR convenzionale che utilizzano una quantificazione all'end point ovvero

alla fine della reazione di amplificazione mediante elettroforesi su gel di agarosio. La real-time PCR utilizza particolari combinazioni di coloranti fluorescenti la cui fluorescenza viene smascherata quando la catena di DNA viene sintetizzata oppure fluorocromi che si legano alla catena nascente durante la reazione di amplificazione. La fluorescenza emessa in seguito ad uno specifico irraggiamento da parte della sorgente luminosa del termociclatore viene quindi misurata in tempo reale da una camera CCD. Tutte le operazioni relative alle misurazioni avvengono sotto il controllo di un software gestito da un personal computer.

Sono state messe a punto differenti chimiche che consentono di rilevare in modo specifico gli ampliconi; una di esse, la chimica del SYBR Green, consiste nell'utilizzo di un colorante fluorescente che si lega al solco minore del DNA a doppia elica, quindi durante la fase di annealing della reazione. L'aumento di fluorescenza corrisponde all'aumento del numero di copie dell'amplicone. Il legame del SYBR Green non dipende da una particolare sequenza nucleotidica; infatti, la specificità della reazione è data solo dalla specificità della coppia di primers utilizzati per il gene target. L'uso di fluorocromi che legano il DNA a doppio filamento per la rilevazione "real-time" dei prodotti PCR possiede sia vantaggi che svantaggi. Il vantaggio maggiore è la versatilità, in quanto SYBR Green può essere utilizzato per monitorare l'amplificazione di qualsiasi sequenza di DNA a doppia elica e poi non è richiesta una sonda che aumenta i costi della reazione. Lo svantaggio è che può generare falsi positivi dato che non è specifico per una particolare sequenza nucleotidica; la specificità del SYBR

Green però può essere controllata mediante l'analisi delle curve di Melting.

Una seconda chimica, dotata di maggiore specificità è quella che utilizza sonde TaqMan; tale saggio si basa sulla presenza nella tradizionale miscela di reazione della PCR di un oligonucleotide, una sonda non estendibile fluorogenetica, che ibrida specificamente una regione del DNA bersaglio compresa tra i due primers.

Il metodo TaqMan si basa su due principi:

- Attività 5'- esonucleasica della Taq polimerasi che agisce sulla superficie dello stampo per rimuovere ostacoli a valle dell'amplificazione.
- Tecnologia FRET (*Fluorescent Resonant Energy Transfer*) il cui principio è che, se un colorante ad alta energia (reporter) è nelle vicinanze di un colorante a bassa energia (quencher), ci sarà un trasferimento di energia da quello alto a quello basso. Il reporter quindi non emetterà fluorescenza.

La sonda TaqMan, specifica per il gene target di interesse, è marcata con due molecole fluorescenti: il reporter, una fluoresceina modificata posta al 5' e il quencher, una rodamina modificata posta al 3'. Quando la sonda è intatta, la vicinanza del quencher con il reporter riduce la fluorescenza del reporter mediante FRET.

Durante la PCR, se la sequenza bersaglio è presente, la sonda si lega al target che si trova tra i due primers "forward" e "reverse". L'attività esonucleasica 5'- 3' della Taq DNA polimerasi degrada la sonda ibridizzata e separa i due fluorocromi, permettendo al reporter di emettere un segnale fluorescente che può essere rilevato con una

camera CCD. Poiché viene liberata una molecola di reporter per ogni copia di DNA duplicata durante la PCR, la fluorescenza che si accumula è proporzionale, in ogni momento, alla quantità del prodotto di PCR specifico (figura 2).

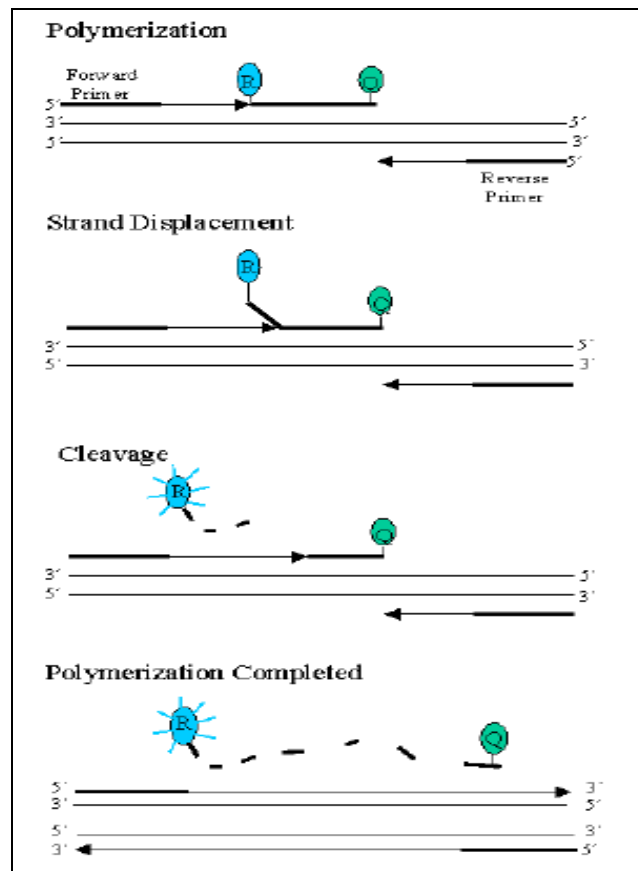


FIGURA 2. Rappresentazione della reazione TaqMan.

La fluorescenza viene seguita in tempo reale utilizzando un termociclatore dotato di un opportuno dispositivo fluorimetrico.

I vantaggi delle sonde TaqMan sono:

- Ibridazione specifica tra la sonda e il target per dare il segnale fluorescente.
- Le sonde possono essere marcate con fluorocromi differenti e quindi si possono amplificare due target differenti nella stessa reazione.
- Le rielaborazioni post-PCR vengono eliminate.

Lo svantaggio principale invece è che si devono sintetizzare sonde differenti per differenti target quindi con costi notevoli.

L'emissione della fluorescenza viene letta dall'apparecchio durante la reazione di PCR, in tempo reale da una camera CCD e un software costruisce un grafico utilizzando i dati di fluorescenza emessa durante l'amplificazione.

Il grafico di una reazione di real-time PCR è definito “amplification plot” e contiene varie informazioni che occorrono per la quantizzazione del DNA o RNA (figura 3).

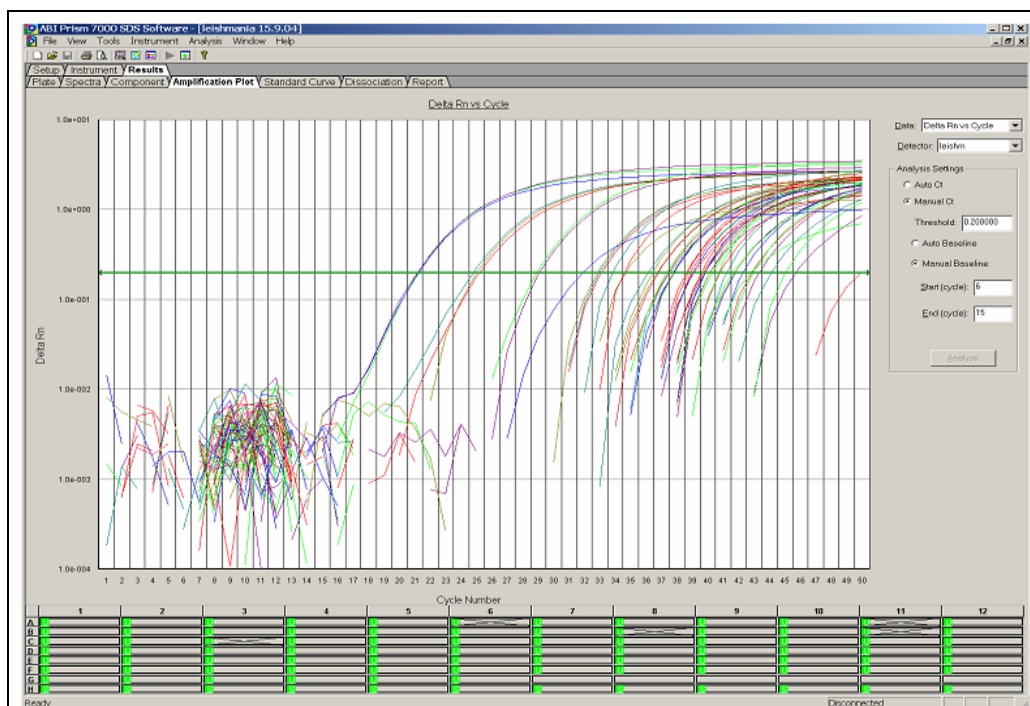


FIGURA 3. Plot di amplificazione della real-time PCR

La linea “**Threshold**” (soglia) è il livello di rivelazione o il punto in cui una reazione dà un segnale di fluorescenza superiore al segnale di fondo. Questa linea si riferisce alla fase esponenziale della reazione per dare una misura precisa ed accurata. La scelta della soglia è arbitraria e si basa sulla variabilità della linea di base.

Cycle Threshold, Ct (ciclo soglia) è il ciclo in corrispondenza del quale il software Sequenze Detection System (SDS) comincia a rilevare l’incremento del segnale associato con una crescita esponenziale del prodotto di PCR. Il Ct è inversamente proporzionale alla quantità iniziale di DNA o cDNA target cioè alla concentrazione del campione (figura 4).

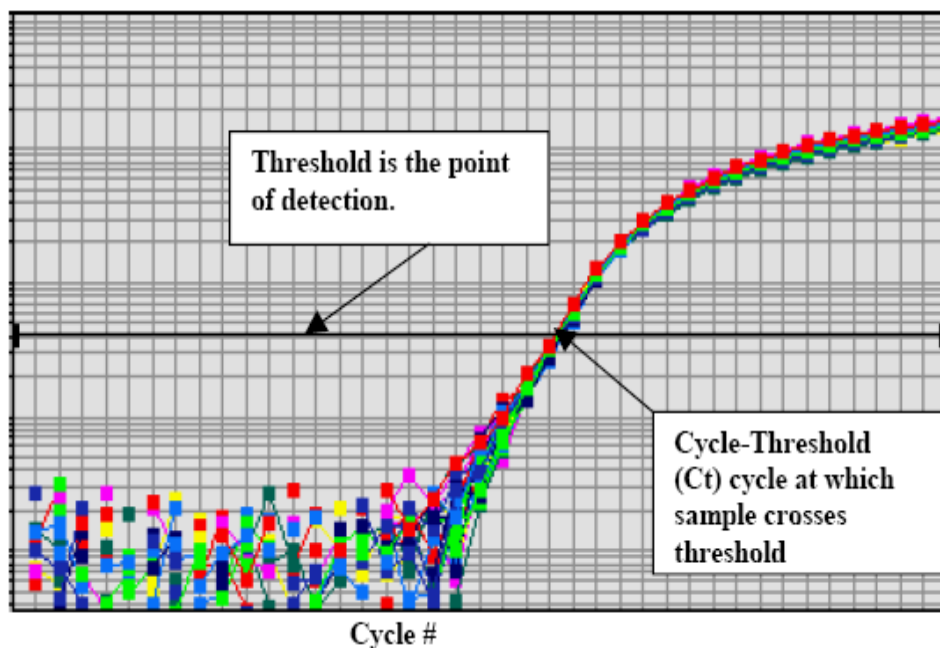


FIGURA 4. Rappresentazione del Cycle-Threshold.

I prodotti della PCR durante la reazione aumentano logarithmicamente solo nei primi cicli (tra il 20° e il 25°) per poi arrivare al plateau intorno al 40° ciclo.

La quantizzazione mediante real-time PCR può essere assoluta o relativa.

Nella **quantizzazione assoluta** il campione che si deve stimare viene confrontato con una curva standard, una soluzione del gene target con concentrazione nota espressa in numero di copie (lo standard). La concentrazione dello standard, RNA o DNA, può essere misurata con lo spettrofotometro e convertita in numero di copie utilizzando il peso molecolare del DNA e dell' RNA. Lo standard può essere DNA plasmidico a doppia elica, RNA trascritto *in vitro*, DNA a singola elica sintetizzato *in vitro*, cDNA che esprime il gene target. Per

costruire la curva standard si utilizzano diverse diluizioni del campione a concentrazione nota (almeno 5) e ogni punto della curva va testato in triplicato. Il risultato finale sarà quindi la concentrazione del campione da testare espressa in numero di copie del gene target.

Nella **quantizzazione relativa** non si utilizza una curva standard e i risultati si calcolano comparando i valori di Ct (metodo comparativo del Ct) del campione rispetto al gene di riferimento (housekeeping) e al calibratore. Nel metodo comparativo del Ct, i livelli di espressione genica sono relativi ad un gene di riferimento detto “housekeeping gene” e paragonati ad un calibratore. Il perfetto controllo endogeno riflette la quantità di cDNA per campione e ha un livello di espressione costante in tutti i campioni in esame. Esso è utile per normalizzare errori riguardanti le concentrazioni di RNA e le variazioni di efficienza della retrotrascrizione. I geni housekeeping più utilizzati sono: la β -actina, GAPDH (gliceraldeide-3-fosfato), rRNA (RNA ribosomiale), ATP sintetasi 6 mitocondriale.

La quantità di DNA target, normalizzata con il controllo endogeno e il calibratore, è data dalla formula $2^{Ct_{cal} - Ct_{camp}}$, dove Ct_{cal} è il Ct target sottratto del Ct_{cal} (calibratore) e Ct_{camp} (campione) - Ct_{end} del controllo endogeno.

Ossia :

1. $Ct_{campione} - Ct_{controllo\ Ct\ (campione)\ endogeno} =$
 $Ct_{calibratore} - Ct_{controllo\ endogeno} = (\text{calibratore})$
2. $Ct_{campione} - Ct_{calibratore} = Ct_{controllo\ endogeno} - Ct_{controllo\ endogeno}$

Questa formula è applicabile quando l'efficienza della PCR del campione è simile quella dell'housekeeping gene. Se le efficienze non sono simili allora si deve utilizzare un altro metodo ad esempio la curva standard o si può scegliere un altro housekeeping.

Terapia

Per le brucellosi animali e quindi anche per quella bovina non è ipotizzabile alcun efficace trattamento, per la frequente e persistente posizione intracellulare degli agenti causali.

Profilassi

Sanitaria. – Mira all'eradicazione attraverso il sistematico abbattimento degli animali riconosciuti infetti. Deve essere applicata con rigore e rapidità, in modo da ridurre al minimo i rischi di ricontaminazione.

È il sistema più radicale e certamente più economico da attuare in Paesi e regioni nei quali l'incidenza dell'infezione è modesta (non superiore al 5% degli animali) e dove esistono condizioni ambientali favorevoli alla sua realizzazione. In questi casi il risanamento è conseguito dopo che periodici controllo sierologici, effettuati a conveniente distanza di tempo gli uni dagli altri, hanno fornito esito negativo in tutti i capi dell'azienda o del territorio in cui la profilassi si attua.

Immunizzante. – Nelle zone o negli allevamenti in cui la brucellosi presenta diffusione elevata l'adozione delle sole misure di profilassi sanitaria diventa antieconomica per la tendenza dell'infezione a

diffondere e perpetuarsi fra gli animali. In tale situazione può essere allora conveniente fare ricorso anche ad una profilassi medica, basata sulla vaccinazione.

Il vaccino che si è imposto in tutto il mondo per le sue proprietà immunogene è quello universalmente noto come *Buck 19* o *B 19*. Si tratta di uno stivite di *B. abortus*, biovariante 1, CO₂-indipendente, attenuato mediante passaggi seriali, ripetuti per 10 anni, su patata a temperatura di laboratorio. Nonostante il processo di attenuazione subìto, il ceppo è ancora capace di provocare aborto in femmine gravide di oltre 5 mesi e di localizzare alla mammella se inoculato a bovine in lattazione. Esso suscita inoltre un vivace movimento anticorpale, l'intensità e la durata del quale dipendono dall'età in cui si effettua la vaccinazione.

Per tutti questi motivi il suo impiego dovrebbe essere limitato alle femmine di rimonta di 4-6 mesi di età. Una sola inoculazione sottocutanea di 6×10^{10} germi è sufficiente a proteggere efficacemente per 5-7 e anche 10 anni l'80-85% degli animali. Operando su vitelle si evitano persistenti movimenti anticorpali, che potrebbero ingenerare confusione nell'interpretazione dei risultati forniti dai test sierologici. Infatti le agglutine sieriche raggiungono il titolo più elevato verso la terza settimana, subiscono una netta flessione nello spazio di pochi mesi e si ritrovano al di sotto di 30 UAI/ml nel 90% degli animali quando questi iniziano la loro attività riproduttiva; gli anticorpi devianti il complemento (IgG1) mostrano invece un decremento assai più rapido, tanto da scendere al di sotto dei valori diagnostici entro 6-8 mesi.

In zone o allevamenti fortemente infetti, nei quali gli animali vivono in frequente o costante promiscuità, la vaccinazione, sia pure associata

all'applicazione di severe misure sanitarie, spesso non consente di raggiungere il traguardo del risanamento a causa delle continue infezioni cui vanno soggette le bovine adulte, prive di qualsiasi base immunitaria e viventi in ambiente contaminato.

A fronte di situazioni di questo tipo, in alcuni Paesi (USA, Francia) è stato autorizzato e attuato, solo nelle prime fasi delle operazioni di risanamento, il trattamento con B 19 anche delle femmine in produzione non già a dose piena, perché ciò comporterebbe – tra l'altro – il verificarsi di reazioni sierologiche intense e durature, tali da non permettere la discriminazione tra anticorpi da infezione e da vaccinazione (lunga persistenza in circolo sia di IgM che di IgG1), ma a dosi ridotte, secondo due metodi. Il primo prevede l'inoculazione sottocutanea in un unico intervento di $3 \times 10^8 - 5 - 10 \times 10^9$ germi, il secondo la somministrazione di 5×10^9 germi per via congiuntivale due volte, a distanza di sei mesi. Risulta dimostrato che in quest'ultimo caso la protezione conferita è buona e che nei vaccinati gli anticorpi scompaiono del tutto entro 4 mesi, indipendentemente dall'età. Dei due metodi, il secondo è preferibile al primo, che comporta soprattutto il rischio di aborto nelle femmine in gestazione.

L'estensione della vaccinazione agli animali adulti è stata realizzata (Inghilterra, Irlanda, Olanda) anche con lo stipite 45/20, una mutante rugosa del ceppo 45 di *B. abortus*. Tale stipite, non agglutinogeno, è inattivato col calore e incorporato in eccipiente oleoso. La sua attività immunogena è inferiore a quella del B 19 ma possiede, rispetto a quest'ultimo, il vantaggio di poter essere somministrato senza pericolo a tutti gli animali, anche gravidi. Il maggiore suo difetto è quello di indurre molto lentamente l'immunità: 10-14 giorni dopo la seconda

inoculazione (tempo intercorrente fra primo e secondo intervento: 6 settimane).

Prospettive molto migliori sembra offrire l'impiego della stipite RB51. Si tratta di una mutante rugosa rifampin-resistente, ottenuta in laboratorio a partire dal ceppo liscio 2308 di *B. abortus*. Tale stipite, CO₂ – indipendente: a) è stabile nella fase tanto *in vitro* che *in vivo*; b) non provoca formazioni di anticorpi svelabili con i test di agglutinazione e di fissazione del complemento, universalmente impiegati per la diagnosi di brucellosi bovina; c) è capace di indurre uno stato immunitario non inferiore a quello conseguente all'inoculazione di B 19.

Qualora le sue proprietà immunogene venissero confermate, soprattutto per quel che riguarda la durata della protezione, lo stipite RB51 potrebbe costituire un'efficace arma di difesa per tutti quei Paesi nei quali la situazione epidemiologica non consente ancora di affrontare il problema dell' eradicazione facendo ricorso alla politica del "test and slaughter".

Si ricorda comunque che in Italia l'uso della vaccinazione è attualmente vietato e che l'unico vaccino autorizzato rimane a tutt'oggi il B 19. Inoltre, in alcune regioni del Sud Italia è attivo un piano di eradicazione.

Parte sperimentale

Lo studio ha incluso 5 bufale primipare infette con *Brucella* spp., diagnosticata mediante SAT e CFT. Le bufale sieropositive sono state macellate in un mattatoio locale, dove sono state campionate le ovaie per poi essere processate. Sono stati prelevati anche altri substrati quali 5 ml di sangue, stoccato in provette contenente EDTA, 1 tampone nasale, 200 ml di latte e 1 campione di muco vaginale da ciascun animale. Da tutti i campioni è stato estratto il DNA ed è stata effettuata la real time PCR per la ricerca del DNA di *Brucella*.

2 bufali derivanti da allevamenti *brucella* free di aree storicamente (20 anni) non endemiche sono stati campionati alla stessa maniera ed utilizzati come controlli negativi.

Le ovaie (n:10) sono state portate al laboratorio della sezione di zootecnia del Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzione Animali dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II", dove sono state opportunamente lavorate, estraendo COCs con follicoli di piccola e media taglia (2-8 mm). Quindi i COCs sono stati fatti maturare in vitro seguendo le indicazioni di studi precedenti (17). Durante le varie fasi di maturazione sono stati raccolti COCs non maturi, COCs non segmentati, embrioni segmentati (da 2 a 16 cellule) ed embrioni trasferibili (morule e blastociti).

Obiettivo della tesi

L'obiettivo di questa tesi è quello di attuare un metodo di controllo molecolare (QPCR) della sanità delle ovaie provenienti da animali infetti per brucellosi, allo scopo di utilizzare, per l'inseminazione artificiale, gli oociti da essi derivanti.

Questo consentirebbe l'impiego e la salvaguardia di oociti di animali di alto valore genetico destinati alla macellazione in quanto brucellotici.

Real Time PCR

Il DNA è stato estratto da tutti i campioni mediante Qlamp blood kit (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA), secondo le istruzioni per l'uso. Prima dell'estrazione del DNA, i campioni di latte sono stati sottoposti al milk skimming.

La concentrazione e la qualità del DNA estratto sono state valutate mediante misurazione spettrofotometrica dell'assorbanza a 260 nm e 280 nm e mediante elettroforesi su gel, rispettivamente.

Il disegno dei primers TaqMan e delle sonde è stato effettuato utilizzando un software "Primers Express" (Applied Biosystems). Le sonde fluorogeniche sono state sintetizzate utilizzando una molecola reporter FAM attaccata all'estremità 5', e un quencer TAMRA legato all'estremità 3' (Applied Biosystems). (Tabella 3).

	Forward primer	Reverse primer	Probe
Brucella spp.	5'-GCGCGTAAGGATGCAAACAT-3'	5'-CTTGCCTTTCAGGTCTGC-3'	5'GGCTCATCCAGCGAAACG-3'
B- ACTIN	5'-CTGGCACCACCTTCTACAA-3'	5'-GCCTCGGTCAGCAGCA-3'	5'-CCACGCGCAGCTCG-3'

Tabella 3. Primers and probes for Brucella spp. DNA and housekeeping β -actin genes.

L'amplificazione è stata eseguita in 0.025 mL di "mixture reaction" contenente 1XTaq Man Universal Master Mix (Applied biosystems), 100 pmol/ μ L di un primer specifico, 10 pmol/ μ L della sonda fluorogena e 50ng di DNA.

Le reazioni sono state effettuate mediante un Abi Prism 7000 (Applied Biosystems), con un'incubazione iniziale di due minuti a 50°C, seguita da 10 minuti di denaturazione a 95°C e 50 cicli a 95°C per 15 secondi e a 60°C per un minuto. Per ciascuna corsa, lo standard, il campione e il controllo negativo sono stati analizzati in triplicato. Sono state utilizzate diluizioni scalari della soluzione madre di DNA purificato di Brucella per la preparazione della curva standard. Il programma deputato a gestire lo strumento, "Sequence Detection System" (SDS) ha acquisito lo spettro di emissione del campione per tutta la durata della reazione PCR e convertito la variazione di fluorescenza del reporter in una rappresentazione in tempo reale della cinetica di amplificazione.

Il ciclo di PCR in cui è stato raggiunto il valore soglia di fluorescenza del reporter è definito ciclo soglia (Ct) della reazione (figura 5).

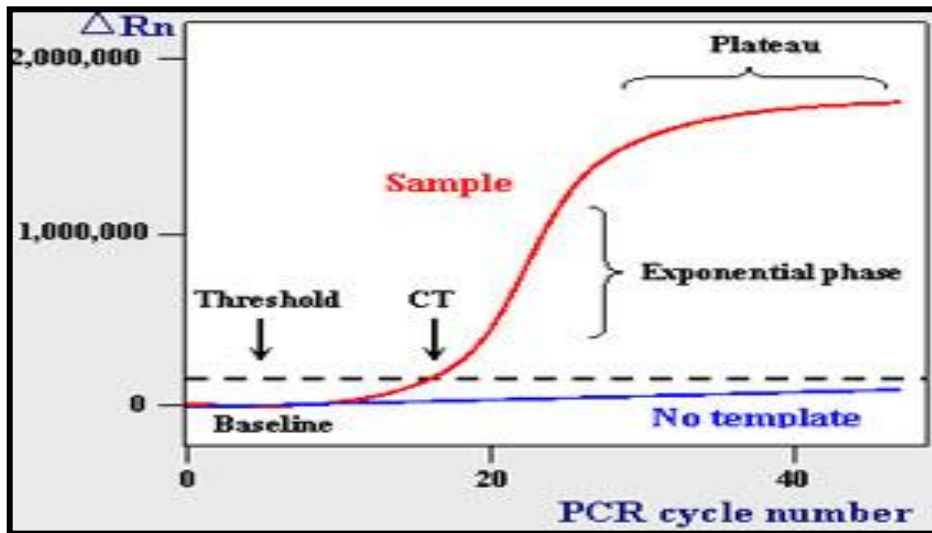


FIGURA 5. Rappresentazione del Ct.

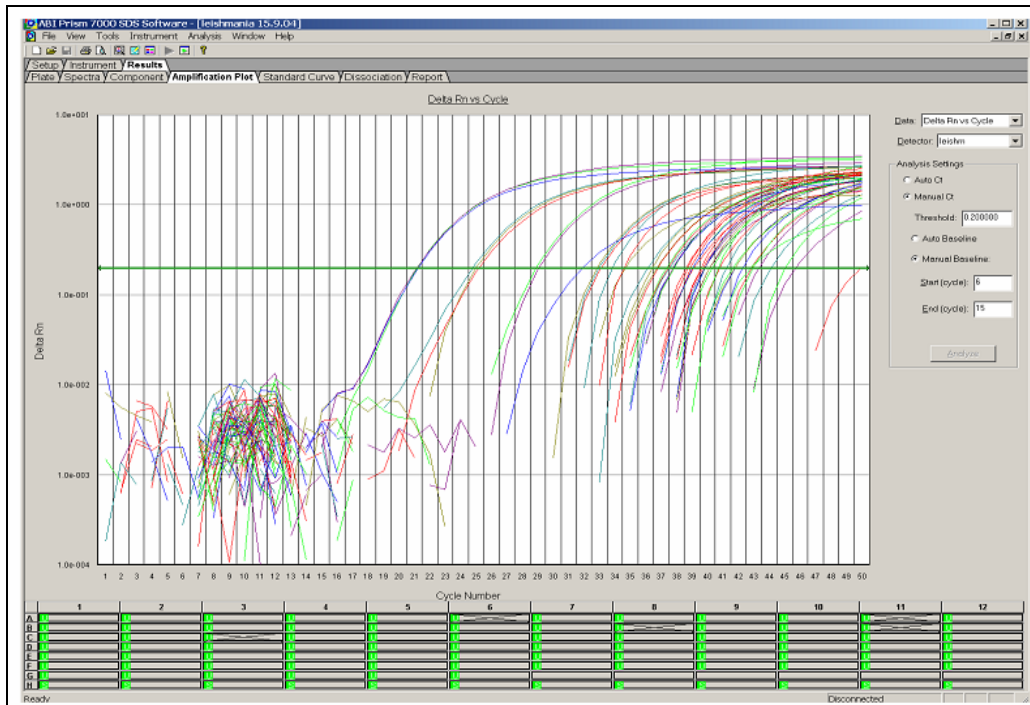


FIGURA 6. Plot di amplificazione della real-time PCR

Il saggio Taqman quantifica il DNA bersaglio al ciclo soglia, ovvero, quando la reazione di PCR è in fase esponenziale. In funzione del ciclo soglia è possibile quantificare la concentrazione iniziale del DNA bersaglio. La linea di base identifica il ciclo in corrispondenza del quale inizia l'aumento esponenziale della fluorescenza per ciascun campione. Riportando in grafico il valore di intersezione con la linea di base in funzione del Log della concentrazione iniziale di ciascun campione, si ottiene la curva standard da cui si può ottenere il valore della concentrazione dei campioni analizzati.

Il gene housekeeping β -actina è stato utilizzato per normalizzare le differenze dovute alla variabilità dell'efficienza delle estrazioni dei campioni. **(18, 19)**. Per ogni campione sperimentale, la quantità del gene target ed housekeeping è stata determinata da un' appropriata curva standard.

Risultati

Il DNA di *Brucella spp.* è stato trovato in tutti i substrati analizzati di tutti gli animali sieropositivi. È stato recuperato un totale di 68 COCs e non è stata trovata traccia di DNA di *Brucella spp.* in COCs non maturi, COCs non segmentati, embrioni segmentati bloccati ed embrioni trasferibili. (Tabella 4).

Animal	Blood (CFU/ml)	Nasal swabs (CFU/ ml)	Recovered COCs (n)	NM COCs (n)	Uncl COCs (n)	Cl embryos (n)	Tr embryos (TM+BI) (n)	Milk (CFU/ml)	Vaginal Mucus (CFU/ml)
1	300	3450	11	NEG (3)	NEG (5)	NEG (2)	NEG (0+1)	7800	8200.2
2	420	2780	18	NEG (3)	NEG (4)	NEG (6)	NEG (1+4)	9600	10157.3
3	110	3980	13	NEG (3)	NEG (1)	NEG (5)	NEG (0+4)	4640	5430.5
4	250	2145	18	NEG (3)	NEG (5)	NEG (7)	NEG (1+2)	5700	6250.2
5	270	4321	8	NEG (3)	NEG (3)	NEG (2)	N.P. 0	5100	5500.3
Total			68	15	18	22	13		

NM: non matured; Uncl: Uncleaved; Cl: Cleaved; Tr: Transferable; NEG: Negative; N.P: Not performed

Tabella 4. Results of real time PCR for *Brucella spp.* in blood, nasal swabs, oocytes (COCs), in vitro produced embryos, milk and vaginal mucus.

Conclusioni

I risultati di questo studio preliminare di messa a punto di un metodo di PCR quantitativa per la diagnosi e il controllo della Brucella hanno dimostrato che tale metodica è utile allo scopo prefissato.

Tuttavia tali incoraggianti risultati vanno confermati su un numero maggiore di animali.

La brucellosi rappresenta per l'allevamento bufalino una grave causa di perdite economiche, sia legate alle problematiche riproduttive, sia ai problemi sanitari che ne derivano.

È stata messa in evidenza l'importanza che ormai riveste la real time PCR nella diagnosi della brucellosi in quanto permette la quantificazione del DNA di Brucella spp. nell'arco di poche ore. Inoltre, la QPCR risulta essere un metodo che riduce le manipolazioni e le contaminazioni da parte dell'operatore, riducendone i rischi cui quest'ultimo potrebbe essere sottoposto utilizzando materiale biologico ad elevato potere infettante.

I risultati del nostro studio trovano conferma in quanto già dimostrati nel 1986 da Stringfellow et al. (20) nel bovino. Questi autori affermavano che gli embrioni esposti in vitro a Brucella abortus non mostrano batteri aderenti alla zona pellucida.

Alla luce di quanto dimostrato dal nostro lavoro, si potrebbe ipotizzare, in un futuro non troppo remoto, che dalla sinergia di un laboratorio IVEP, con un laboratorio di biologia molecolare, mediante l'utilizzo di COCs prelevati da bufali infetti, si potrebbe ovviare alla totale perdita di capi con elevato valore genetico.

Bibliografia

1. De Silva L.N.A., Perera B.M.O., Tilakaratne L., Edqvist L.E. production systems and reproductive performance of indigenous buffaloes in Sri Lanka. Faculty of Vet. Med., Upsala, Report. 3 1985; 79.
2. Popovici L., Plugaru O., Mulea.A., Pop A. the influence of the month of calving on some performances in buffalo cows production. Third World Buffalo Congress, Varna 1991; Abstracts p. 63.
3. Reddy B.R., Patel M.G., Tamhan S.S. studies in the reproductive behaviour of Surti buffaloes. I Oestrus cycle. Indian Vet. J. 1973; 50: 257-264.
4. Zicarelli L. recenti acquisizioni sull'attività riproduttiva nella bufala. 4° meeting Nazionale "Studio della efficienza riproduttiva degli animali di interesse zootecnico". Bergamo 10 aprile 1992; 9 – 39.
5. Bielanski, A.B. Potential for disease control of transmission by embryos produced in vitro: a review of current literature. In Manual of the embryo Transfer society. 1998; Third Edition: 45-53.
6. Carvalho Neta A.V., Mol J.P., Xavier M.N., Paixao T.A., Lage A.P., Santos R.L. (2010). Pathogenesis of brucellosis. VET j. 184, 146-155.
7. Menzies P.I. (2012). Vaccination programs for reproductive disorders of small ruminants. An Repr Sc 130, 162-172.

8. Minas A., Stournara A., Christodoulopoulos G., Katsoulos P.D. (2008). Validation of a competitive ELISA for diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet J.* 177,411-417.
9. Morata P., Queipo-Ortuno M.I., de Dios Colmenero J. (1998). Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol.* 36, 2443-2446.
10. Zerva L., Bourantas K., Mitka S., Kansouzidou A., Legakis N.J. (2001). Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. *J Clin Microbiol.* 39, 1661-1664.
11. Navarro E., Escribano J., Fernandez J.A., Solera J. (2002). Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp. in human blood samples. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 34,147-151.
12. Marianelli C., Martucciello A., Tarantino M., Vecchio R., Iovane G., Galiero G. (2008). Evaluation of molecular methods for the detection of *Brucella* species in water buffalo milk. *J Dairy Sci.* 91, 3779-3786.
13. Redkar R., Rose S., Bricker B., Del Vecchio V. (2001). Real time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Mol Cell Prob.* 15,43-52.
14. Newby D.T., Hadfield T.L., Roberto F.F. (2003). Real time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR Green, 5' exonuclease and hybridisation probe assay. *App Env Microbiol.* 69, 4753-4759.

15. Probert W.S., Shrader K.N., Khuong N.Y., Bystrom S.L., Graves M.H. (2004). Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus* and *B. melitensis*. *J Clin Microbiol.* 42, 1290-1293.
16. Kattar M.M., Zalloua P.A., Araj G.F., Samaha-Kfoury J., Shbaklo H., Kanj S.S., Khalife S., Deeb M. (2007). Development and evaluation of real time Polymerase chain reaction assays on whole blood and paraffin-embedded tissues for rapid diagnosis of human brucellosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 59,23-32.
17. Gasparrini B., Boccia L., Marchandise J., Di Palo R., George F., Donnay I., Zicarelli L., 2006. Enrichment of un vitro maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: effects of Cystine on glutathione synthesis and embryo development. *Theriogenology.* 65:275-287.
18. Manna L., Vitale F., Reale S., Caracappa S., Pavone L.M., Della Morte r., Cringoli G., Staiano N., Gravino A.E. (2004b). comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 125, 251-62.
19. Manna L., Reale S., Viola E., Vitale F., Foglia Manzillo V., Pavone L.M., Caracappa S., Gravino A.E. (2006). *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Vet Parasitol.* 142, 271-280.
20. Stringfellow D.A., Wolfe D. F., Lauerman L.H., Sparliiong P.H., 1986. Resistance of preimplantation bovine embryos to infection with *Brucella abortus*. *Am J Vet Res.* 47:1924-1927.

