

IZS

T E R A M O

/

CENTRO DI REFERENZA
NAZIONALE PER LE
BRUCELLOSI

I RISULTATI DELLA RICERCA CORRENTE
CONDOTTA DALL'ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'ABRUZZO E DEL MOLISE
ANNO 2025

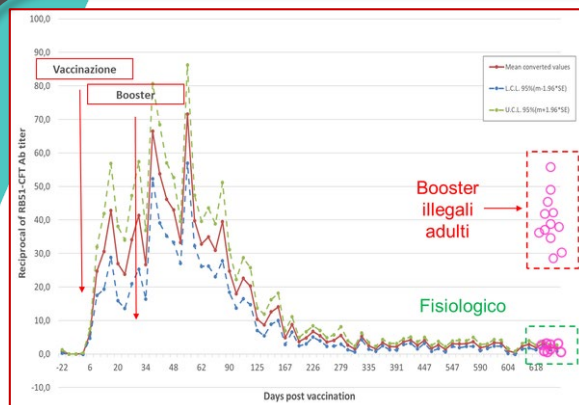
ANALISI DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA DI BUFALI VACCINATI CON RB51 PRE- E POST-CHALLENGE

Chiara Di Pancrazio

Reparto di Immunologia e Sierologia

c.dipancrazio@izs.it

Valutazione della SICUREZZA e RISPOSTA IMMUNITARIA del protocollo vaccinale



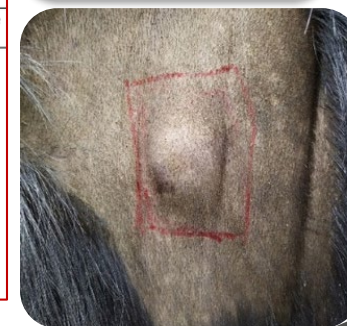
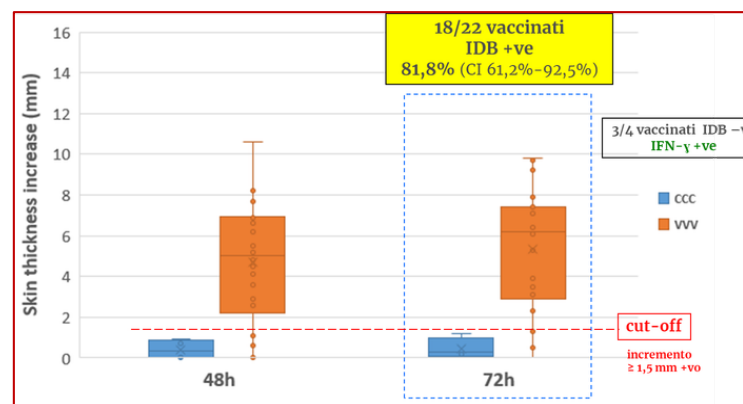
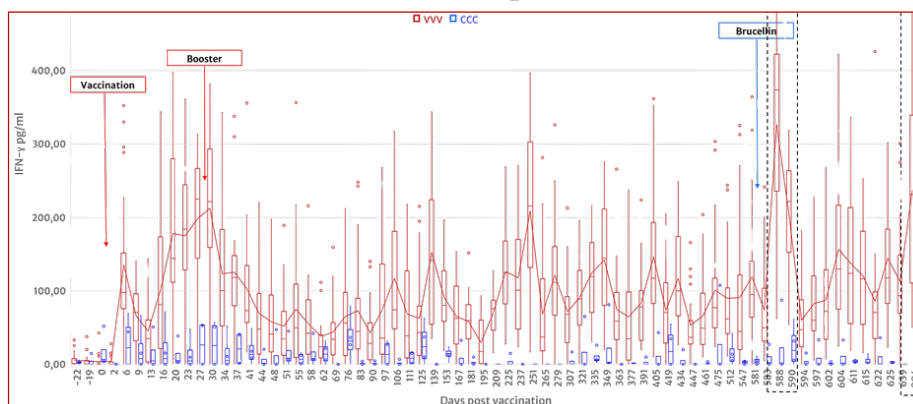
Caratterizzazione della risposta IMMUNITARIA UMORALE specifica (FdC-RB51)

- Risposta umorale specifica che decresce nel tempo (*coda vaccinale*: bassi titoli FdC-RB51)
- Possibilità di individuare richiami vaccinali illegali in animali adulti
- No cross-reattività con prove ufficiali (SAR e FdC classica)

(De Massis F. et al. Microorganisms. 2023 Aug 13;11(8):2078)

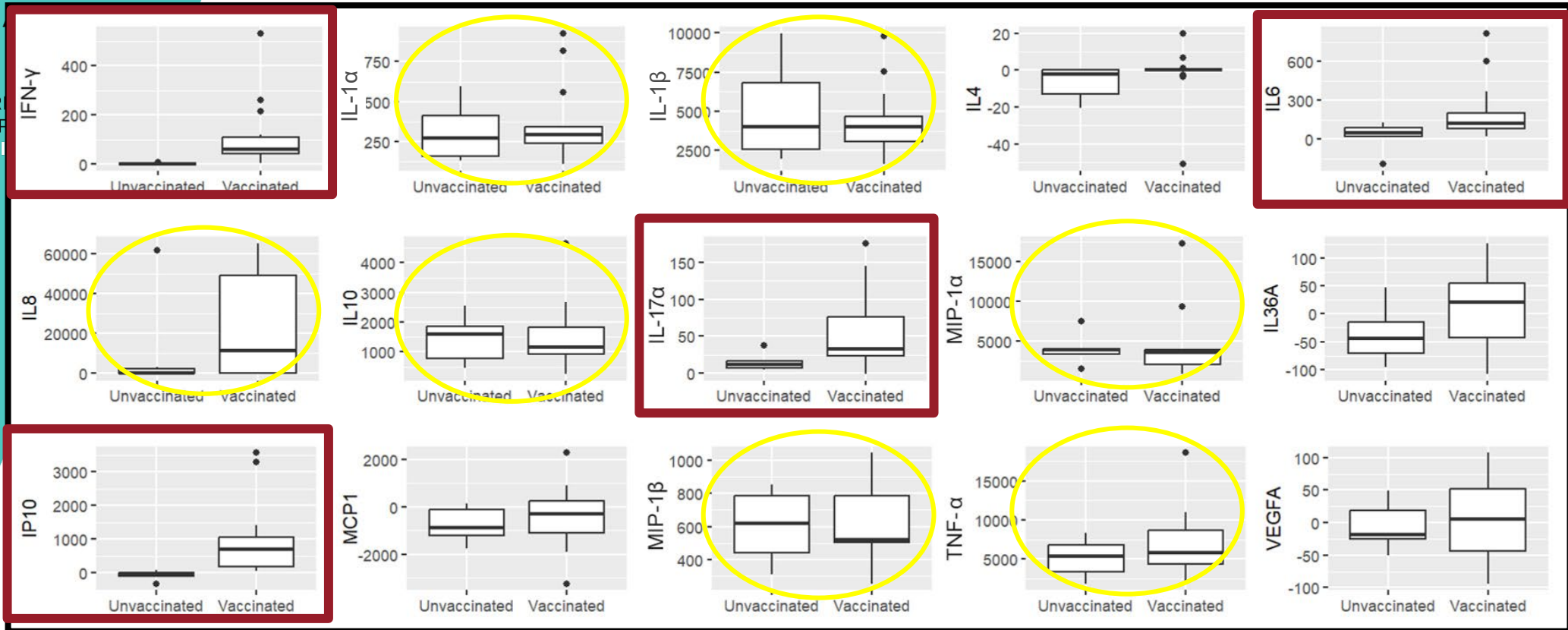
Caratterizzazione della RISPOSTA IMMUNITARIA cellulo-mediata *in vitro* (IFN- γ) e *in vivo* (IDB brucellina)

- Persistenza della risposta cellulo-mediata a distanza di anni dimostrata *in vitro* ed *in vivo*



Profilo CITOCHINICO e CHEMOCHINICO

stimolazione *in vitro* con *B. abortus* 2308 (inattivata con acetone 50%)
pre-challenge



INF-γ; IP-10; IL17A; IL-6



nei vaccinati

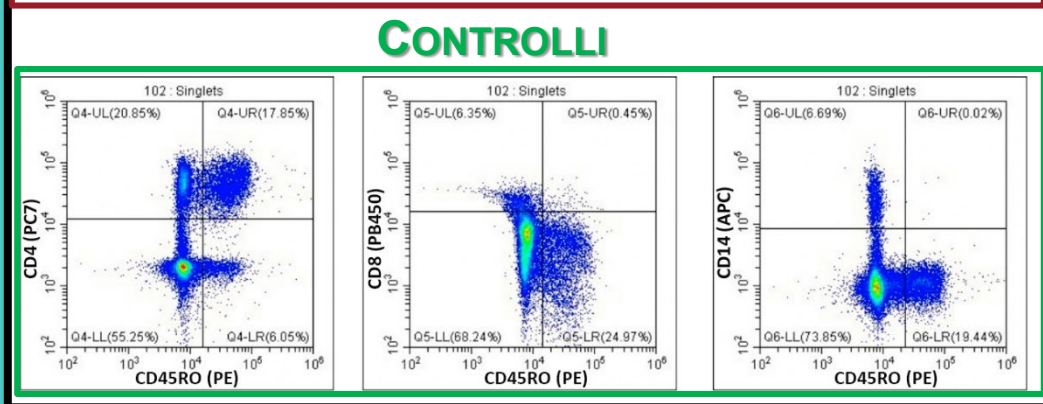
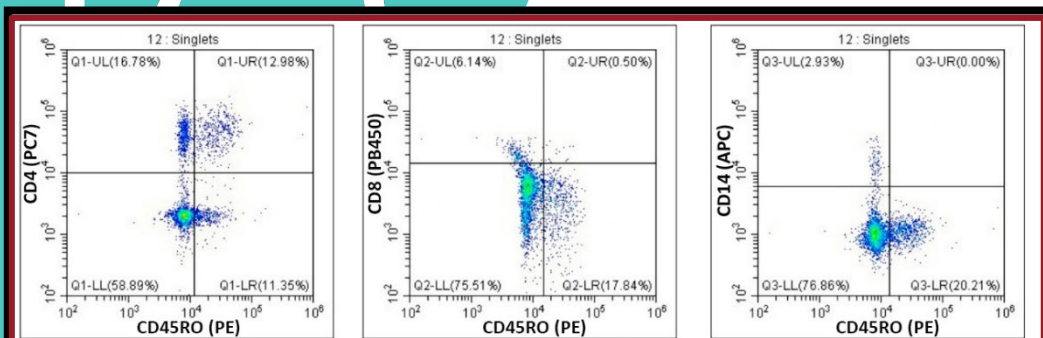


memoria immunitaria

IMMUNOFENOTIPIZZAZIONE

delle sottopopolazioni linfocitarie

pre-challenge



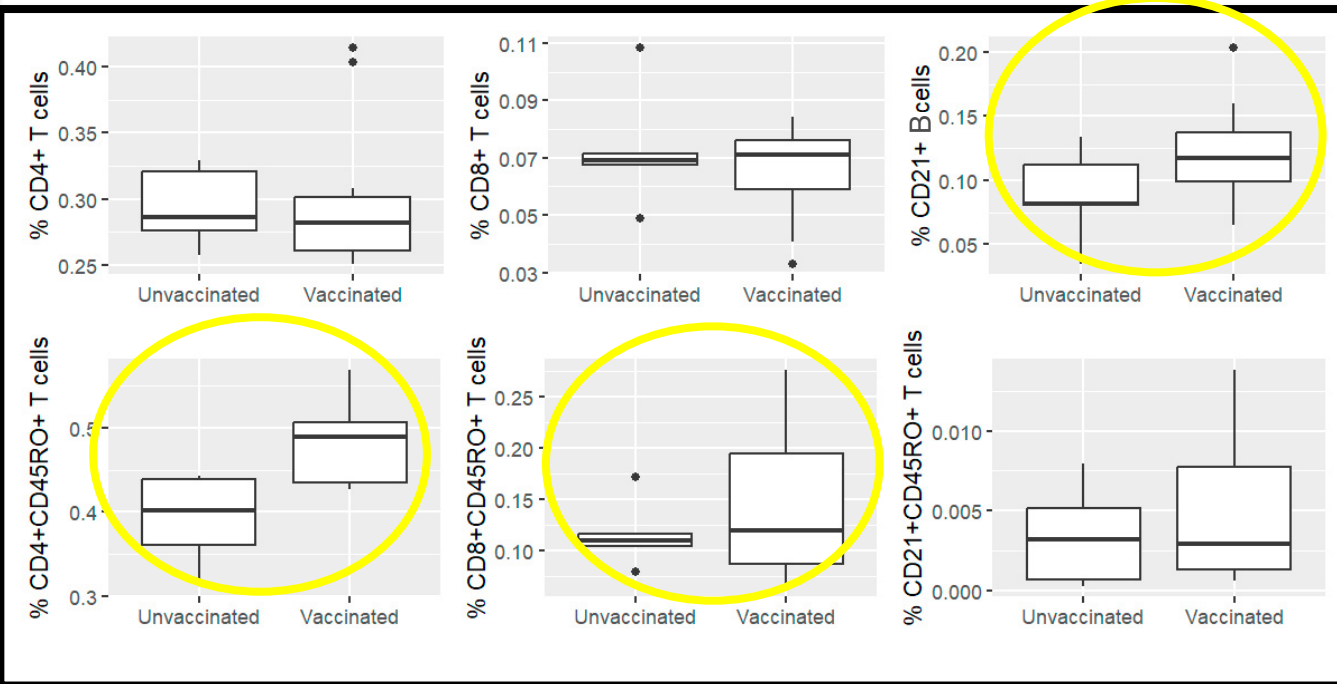
T memory cells (CD45RO⁺)
B cells activated (CD21⁺)



nei vaccinati



memoria immunitaria



Il protocollo vaccinale autorizzato protegge efficacemente gli animali adulti dall'infezione?



BUFALO
MEDITERRANEO

Challenge di animali gravidì vaccinati

Valutazione sul campo dell'efficacia
del protocollo vaccinale
ufficialmente autorizzato.



Brucella spp.
Agente eziologico
della brucellosi



Vaccinazione



Bufala gravida vaccinata



Parto



Vitello

OBIETTIVI DELLO STUDIO



Prevenire l'aborto
e la natimortalità



Ridurre la diffusione
del patogeno durante il parto



Limitare la diffusione
attraverso la lattazione

IZS

T E R A M O

/

CENTRO DI RIFERENZA
NAZIONALE PER LE
BRUCELLOSI

Mat&Met

Post-Challenge

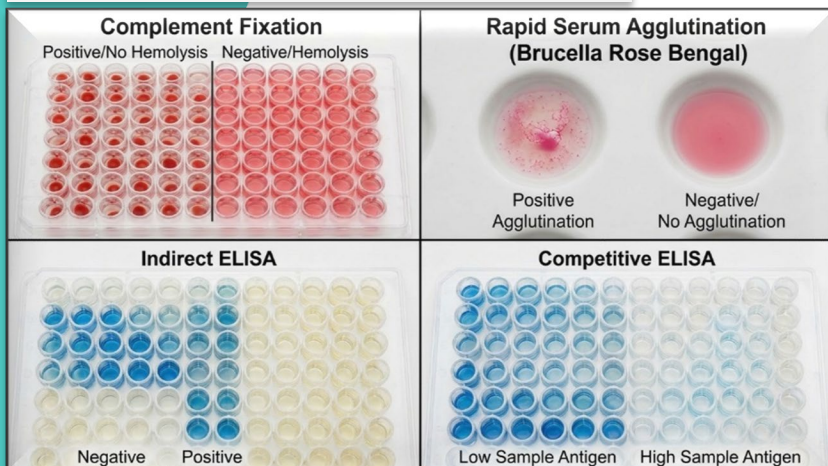
T0-T7-T14-T28-T49

Post-Parto (Madre-Vitello)

T0-T7-T14-T28->T35

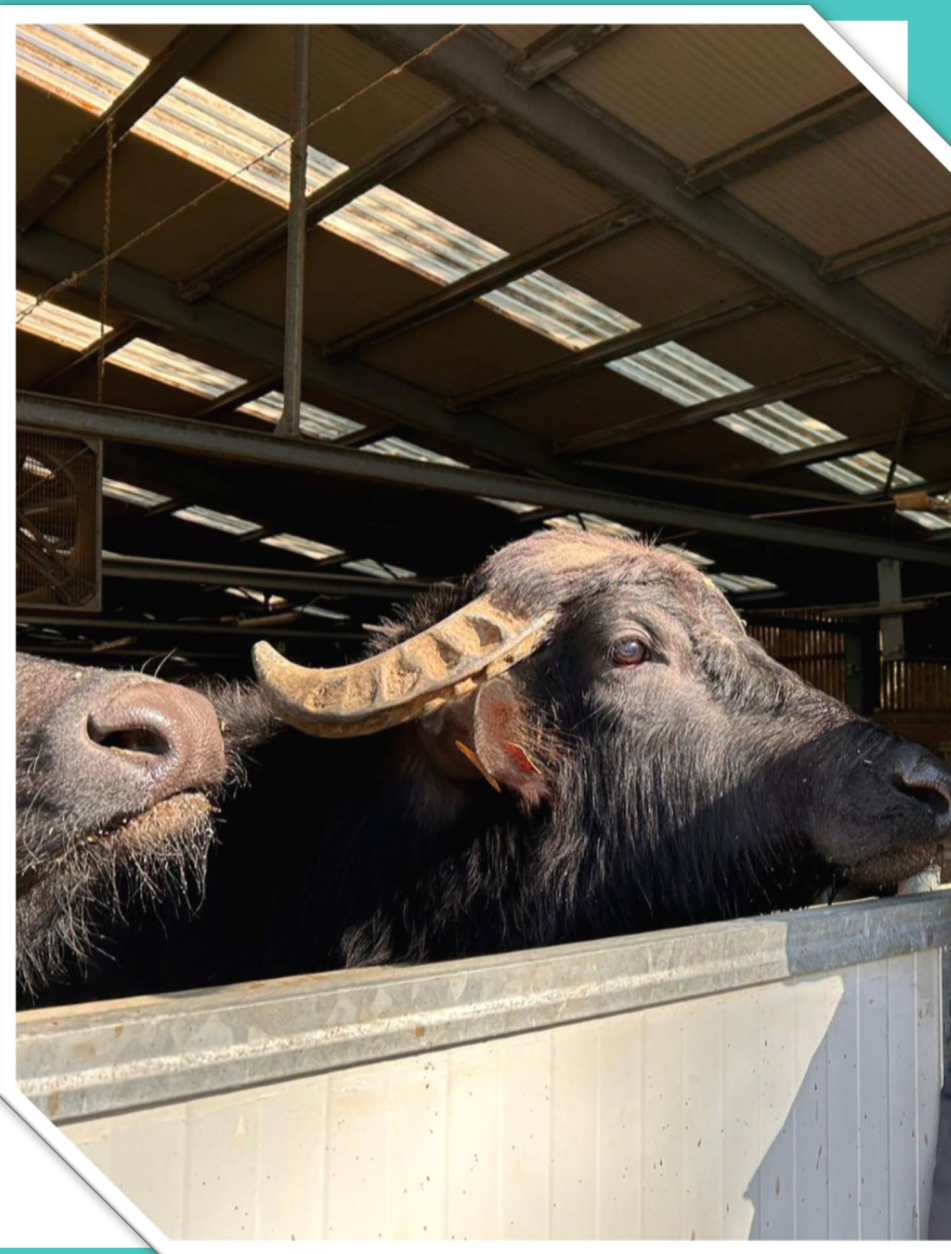
Risposta Umoreale

- FdC-RB51
- iELISA-milk

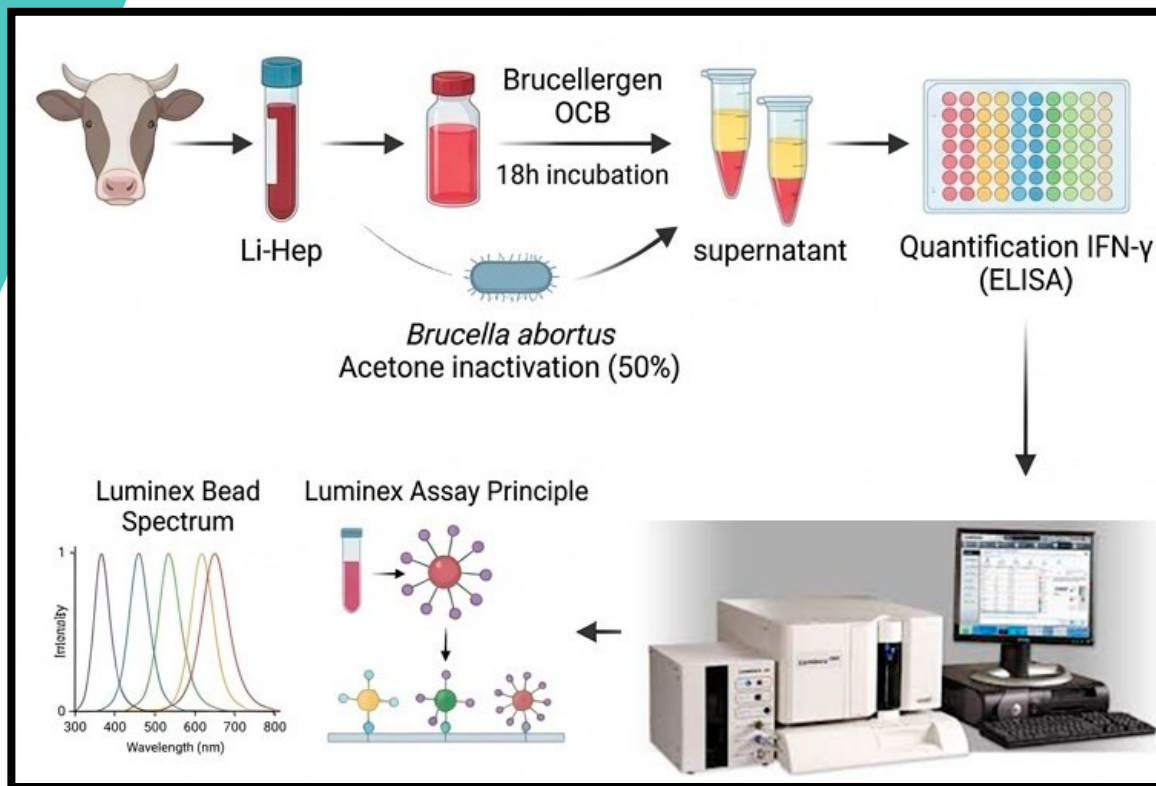


Risposta cellulo-mediata

- γ -INF
- citochine-chemochine
- citofluorimetria



Risposta immunitaria e Profilo citochinico

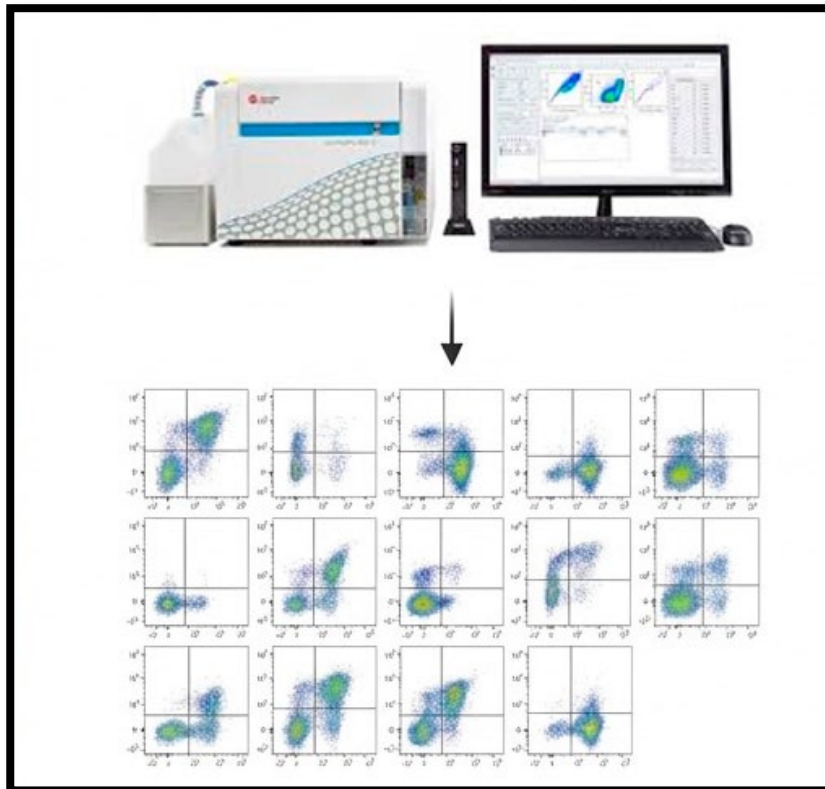


Risposta immunitaria cellulo-mediata

- ✓ Quantificazione delle citochine e chemiochine mediante tecnologia Luminex xMAP
- ✓ Quantificazione γ -INF *in-vitro*

Citofluorimetria

- ✓ Immunofenotipizzazione delle sottopopolazioni linfocitarie B e T (focus su CD4, CD8, CD21, CD45RO)



FASE-1

6 animali vaccinati

- **6 vitelli vitali** (1 parto distocico risolto, vitello normale)

2 animali controlli

- **1 aborto**
- **1 vitello vitale**

FASE-2

4 animali vaccinati

- **2 vitelli vitali**
- **2 nati-mortalità**

4 animali controlli

- **3 aborti**
- **1 vitello vitale**



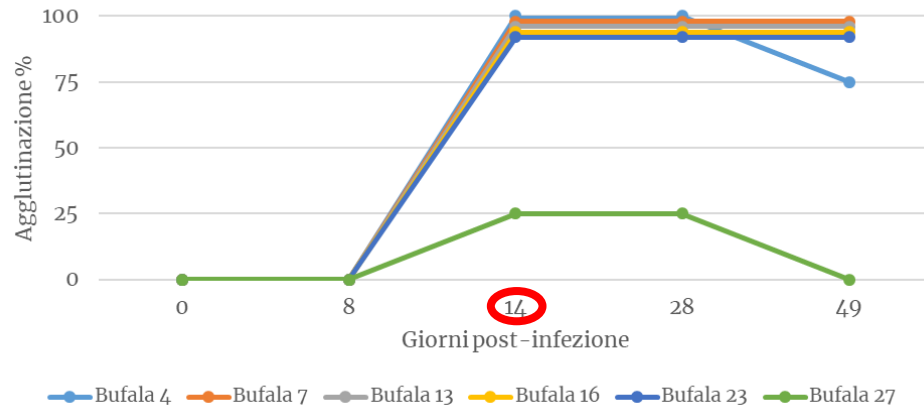
SAR

FdC

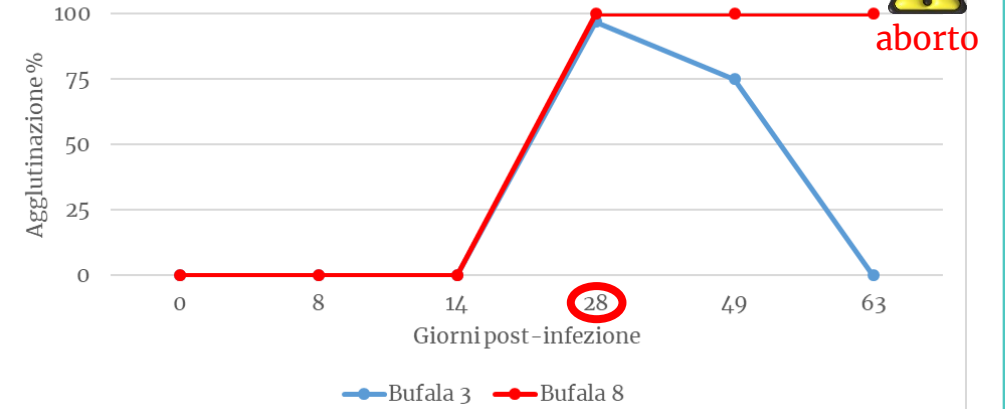
POST-CHALLENGE

Fase 1

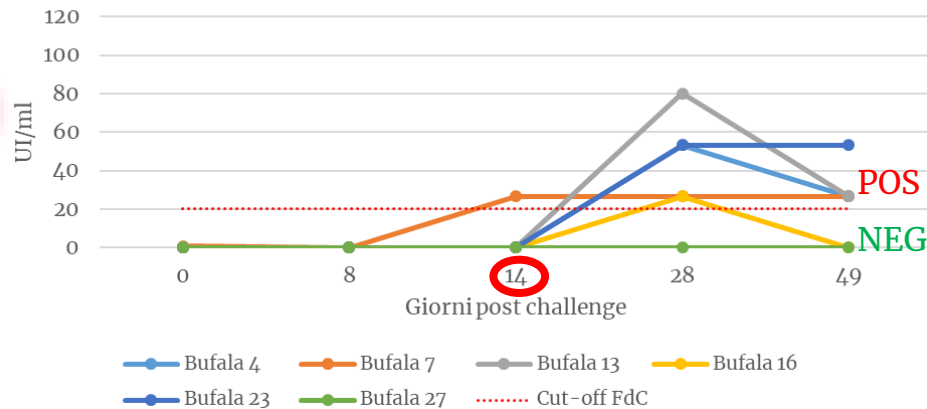
SAR - Vaccinati post-challenge (pre-parto)



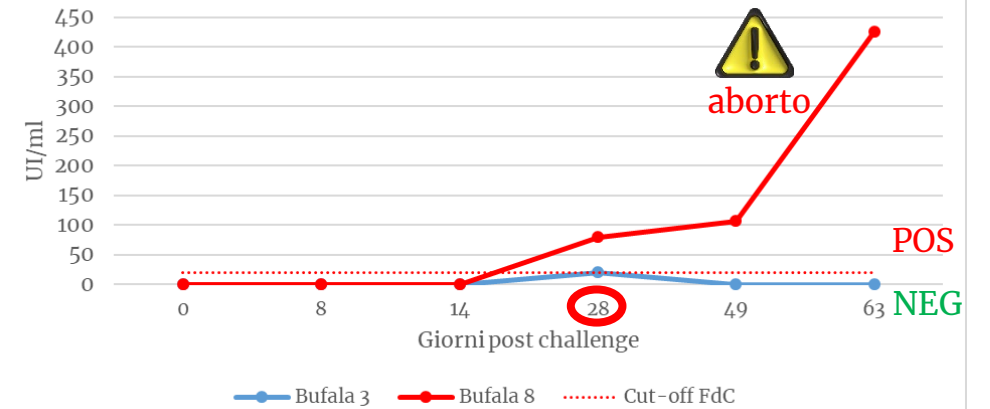
SAR - Controlli post-challenge (pre-parto)



FdC - Vaccinati post-challenge (pre-parto)



FdC - Controlli post-challenge (pre-parto)



i-ELISA

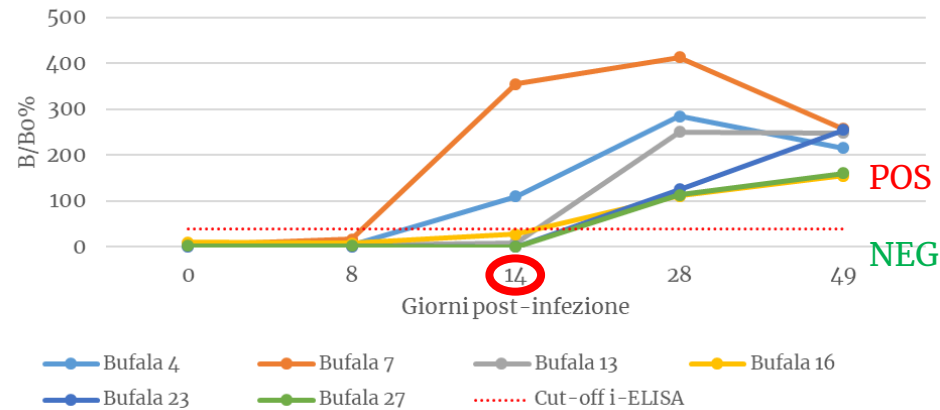
IDVet
cut-off 40%

c-ELISA

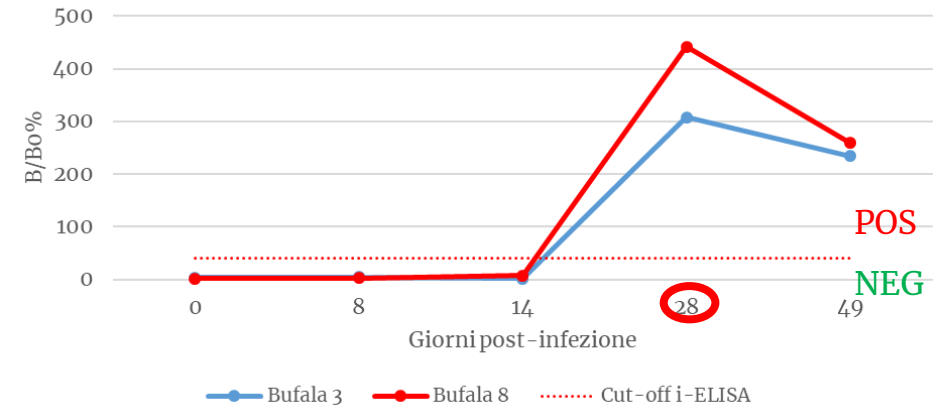
POST-CHALLENGE

Fase 1

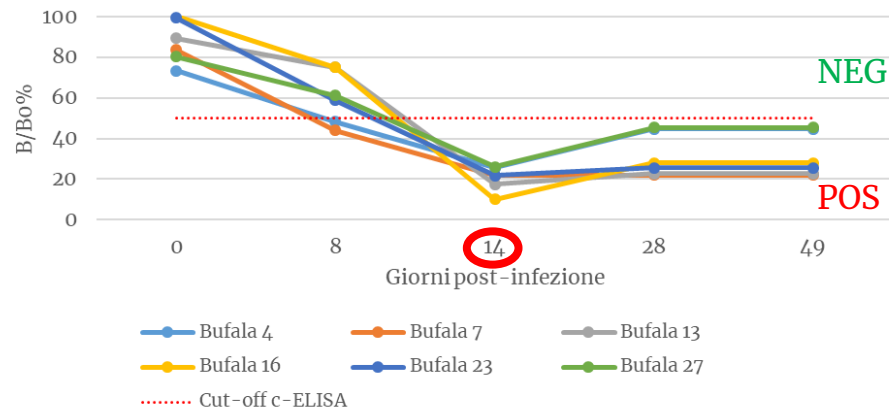
i-ELISA - Vaccinati post-challenge (pre-parto)



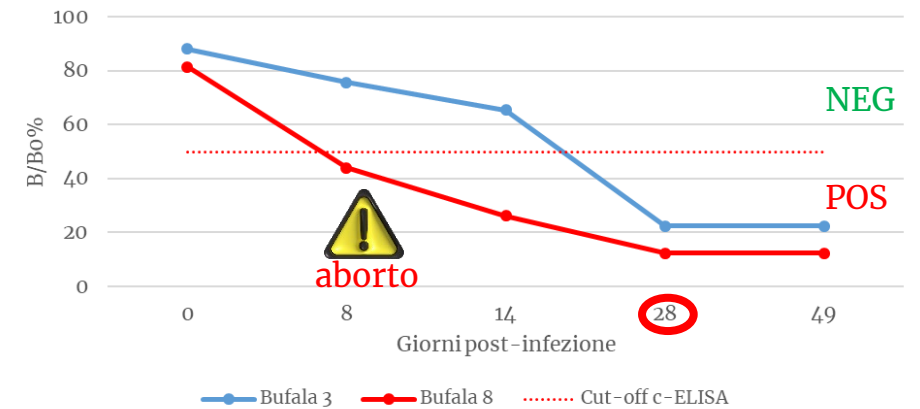
i-ELISA - Controlli post-challenge (pre-parto)



c-ELISA - Vaccinati post-challenge (pre-parto)

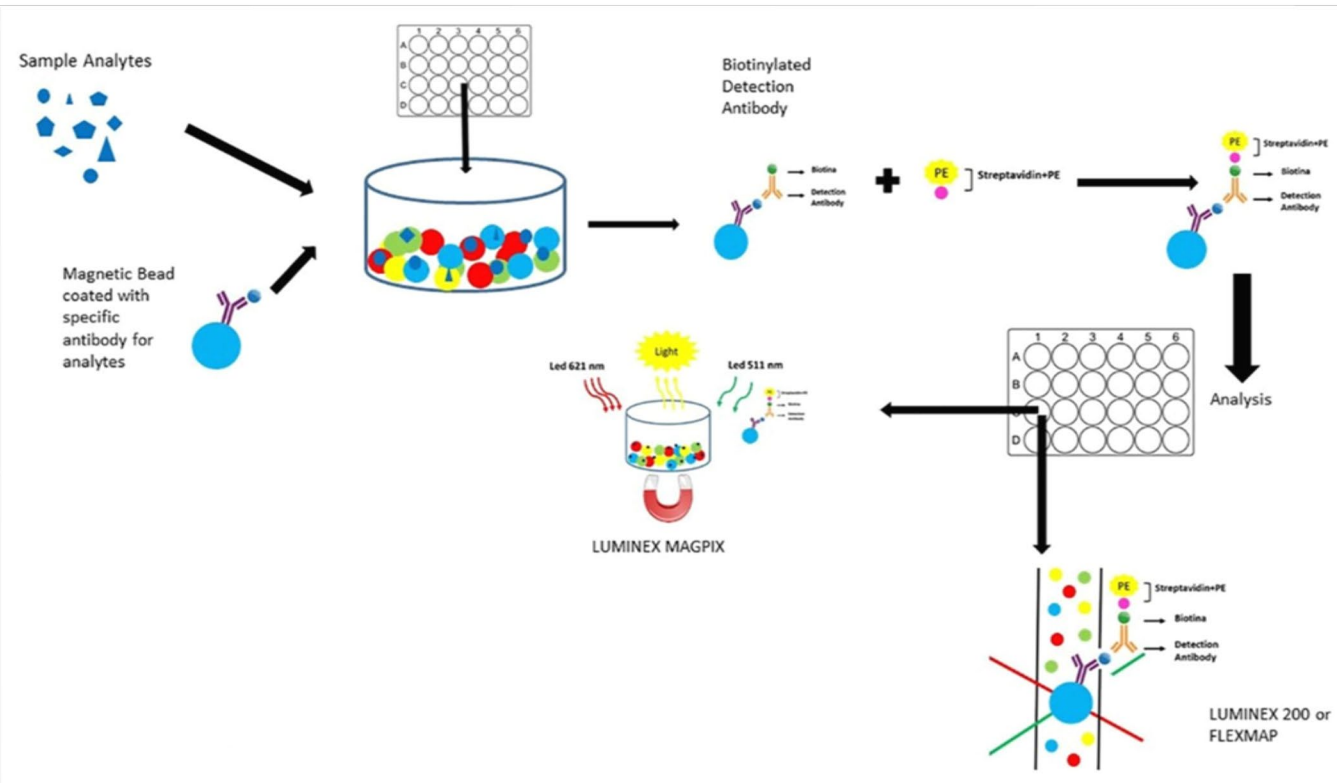


c-ELISA - Controlli post-challenge (pre-parto)





Valutazione della risposta cellulo-mediata tecnologia xMAP® (della Luminex)



Luminex xMAP assay principle (Koudriavtseva T, et al., 2020)

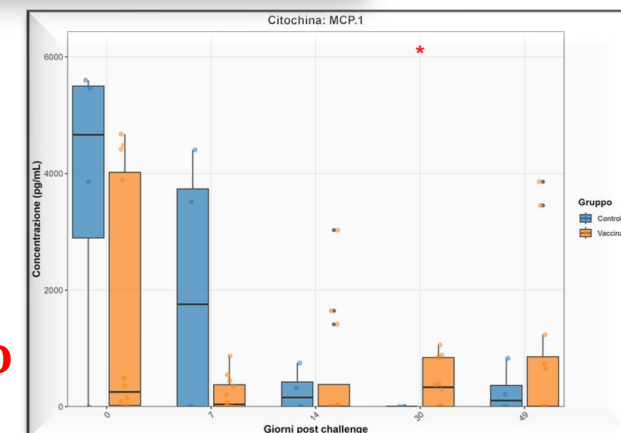
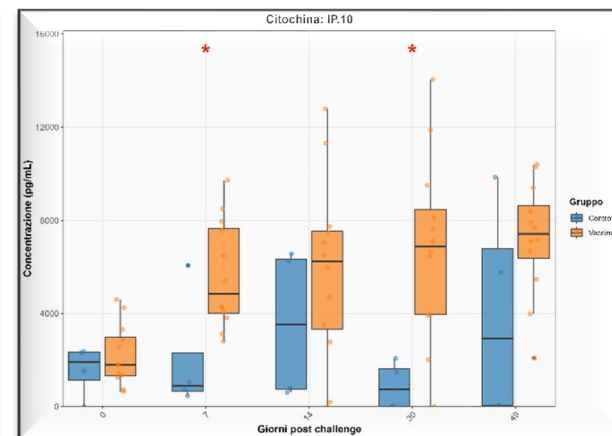
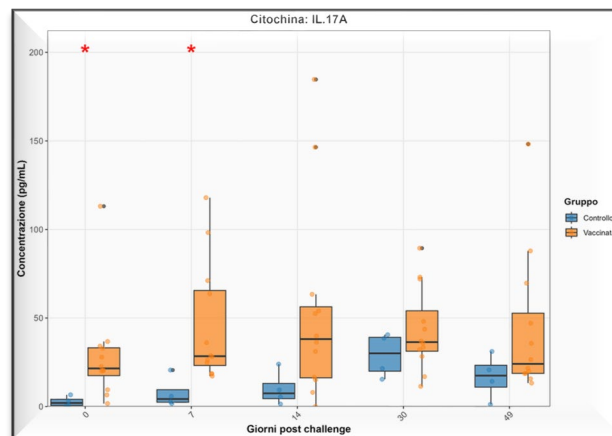
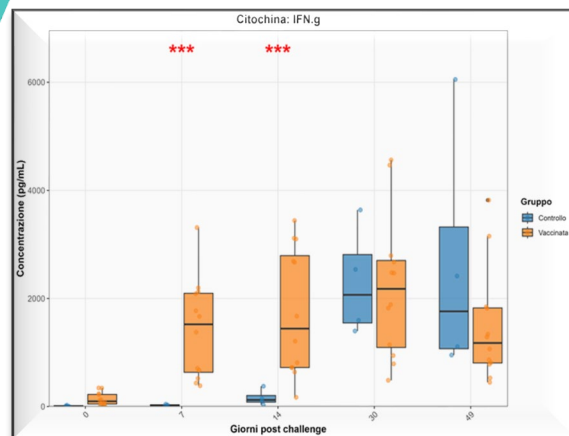
POST-CHALLENGE risposta cellulo-mediata

Fase 1

VACCINATI

- **IFN- γ** $\uparrow$: attivazione dei macrofagi
- **IL-17A** $\uparrow$: attivazione precoce delle difese mucosali
- **IP-10** $\uparrow$: richiamo e mantenimento dei linfociti T
- **MCP-1** $\uparrow$: reclutamento di monociti/macrofagi

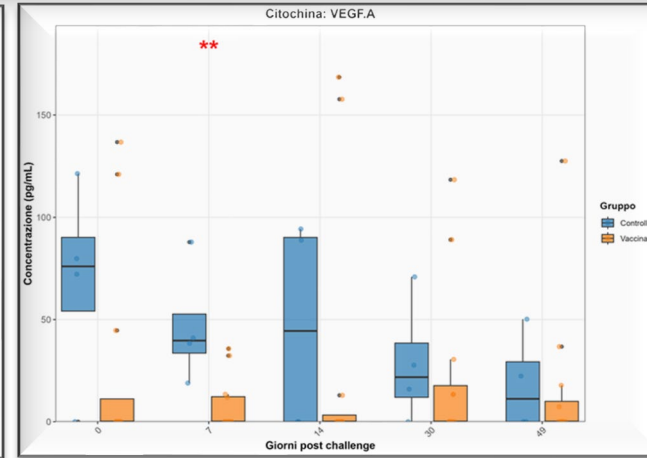
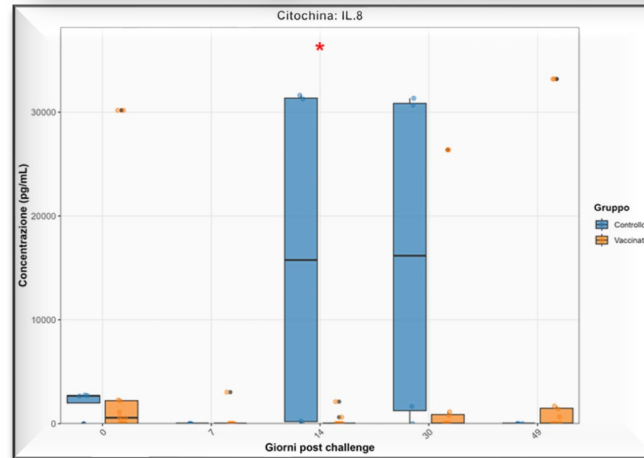
Rapida risposta cellulare di tipo Th1 che favorisce il controllo precoce della replicazione batterica



vaccinati
controlli

POST-CHALLENGE risposta cellulo-mediata

Fase 1



vaccinati
controlli

CONTROLLI

- **IL-8**: significativamente più elevata a 14 giorni
- **VEGF-A**: significativamente più elevato a 7 giorni



- Maggiore infiammazione locale
- Maggiore coinvolgimento tissutale



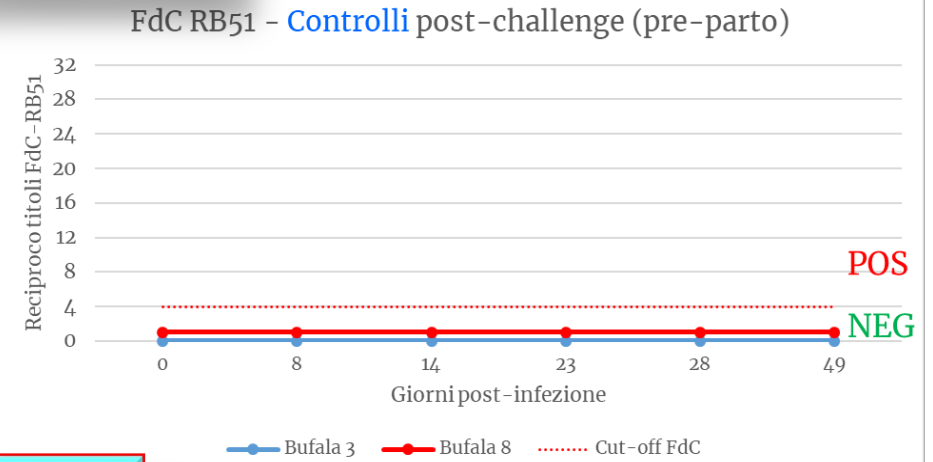
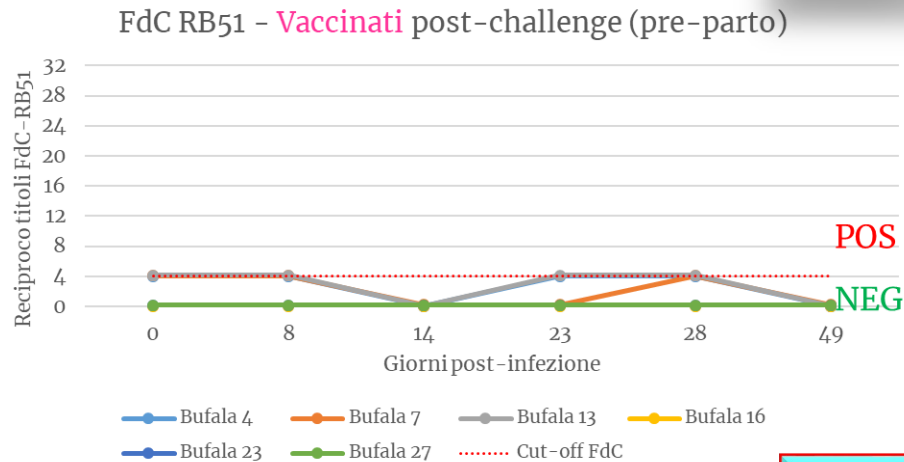
Compatibile con una minore
capacità di controllo dell'infezione

**L'infezione
non determina
un effetto
booster degli
Ab vaccinali**

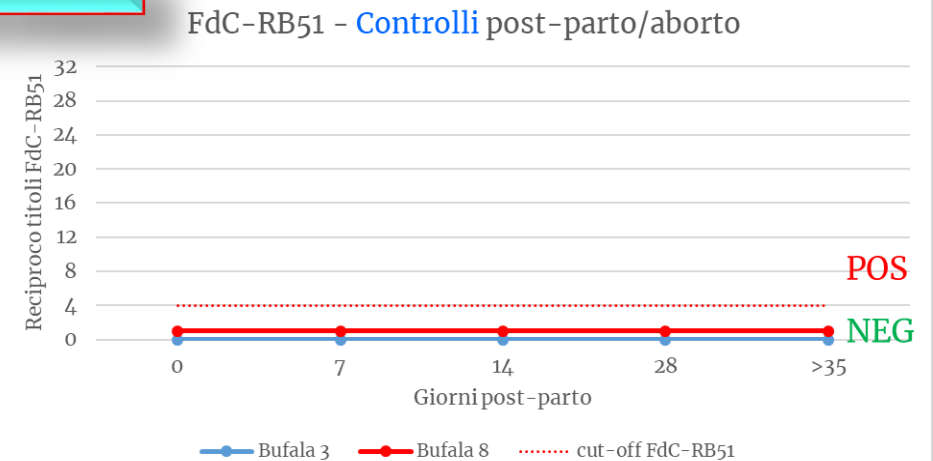
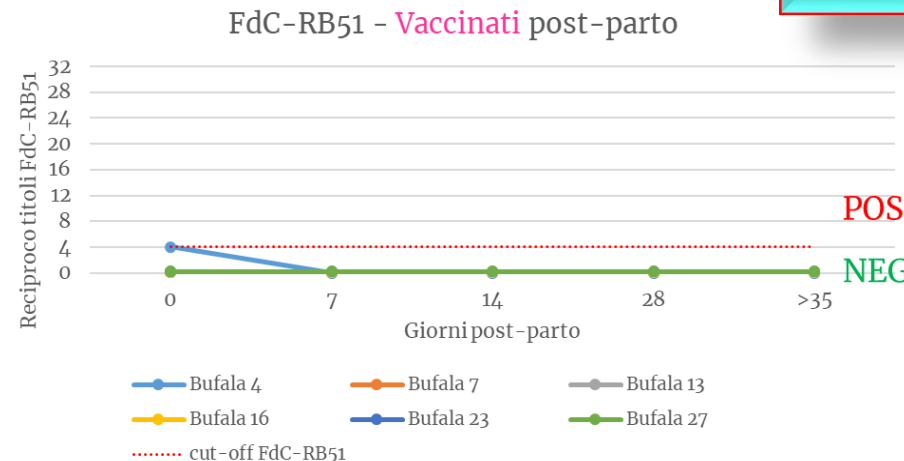
FdC-RB51

Fase 1

POST-CHALLENGE

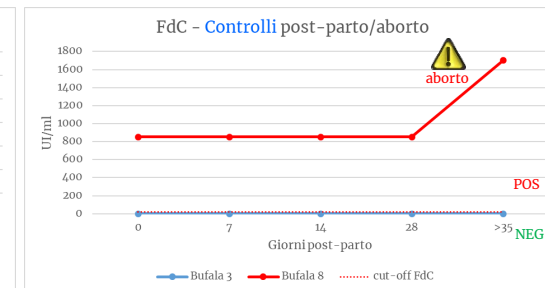
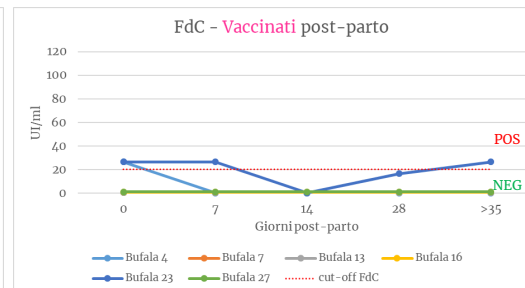
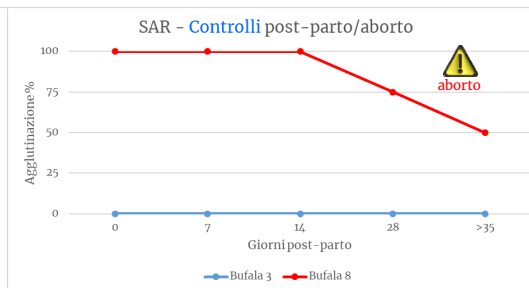
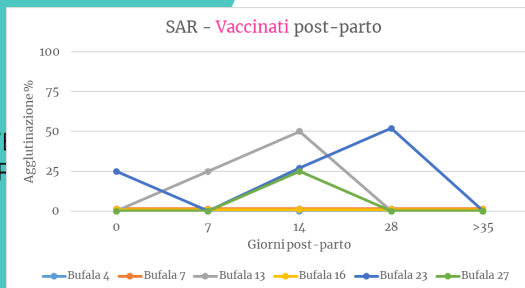


POST-PARTO



POST-PARTO

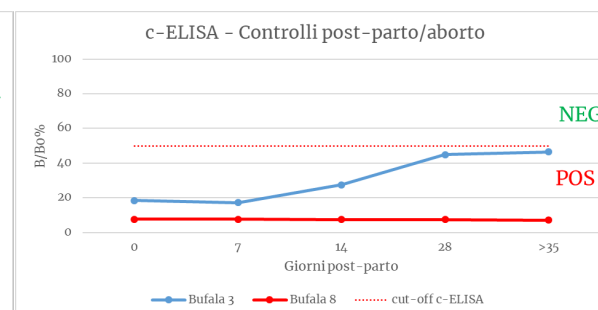
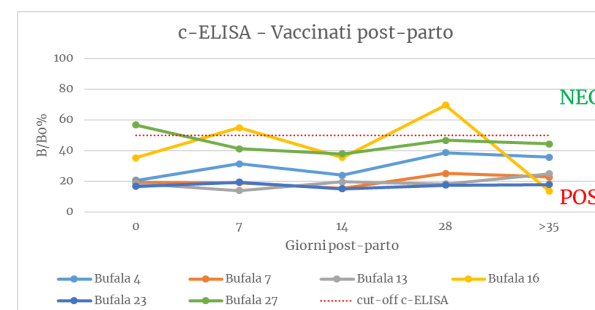
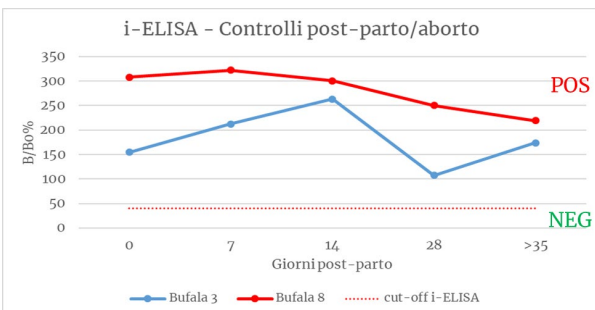
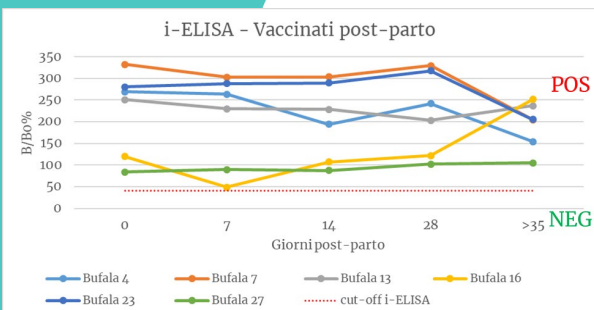
Fase 1



SAR

Positività
Temporanea nei vaccinati

FdC



i-ELISA
IDVet
cut-off 40%

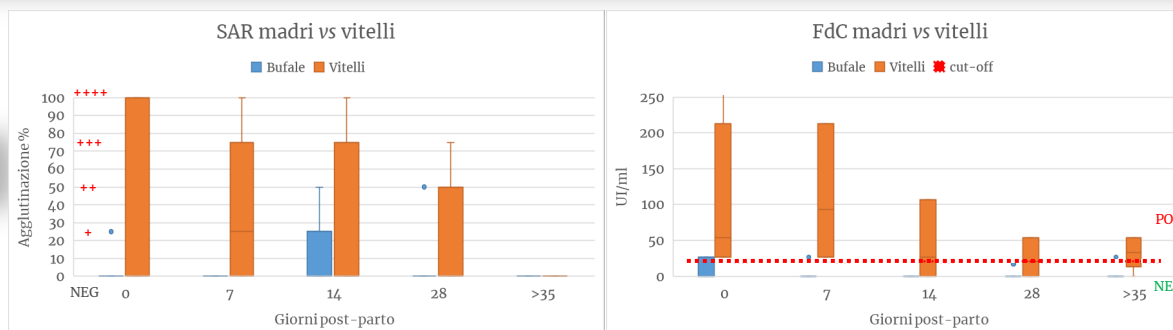
Positività
lunga durata

c-ELISA

Immunità materna: madri infette vs vitelli

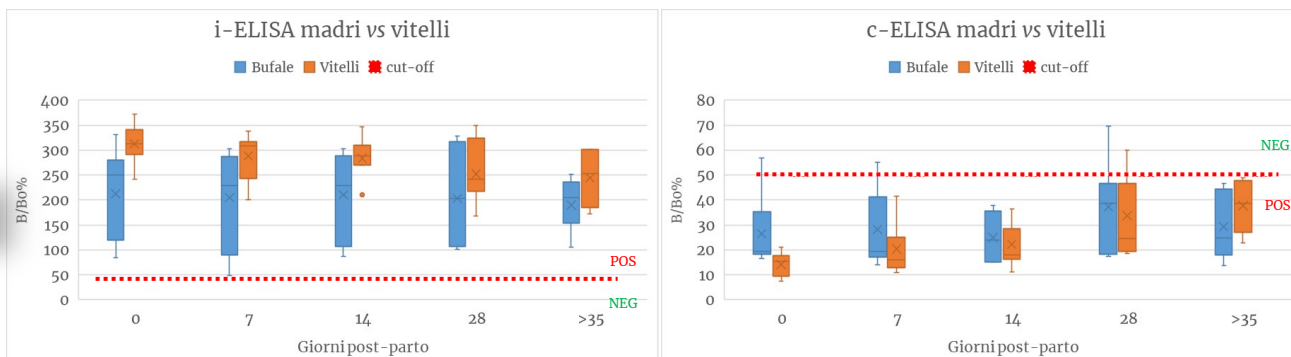
Fase 1

SAR e FdC



In seguito all'assunzione del colostro, i **vitelli presentano concentrazioni di anticorpi specifici anti-Brucella fino a 4 volte superiori a quelle delle madri**, con positività ai test SAR e FdC che può persistere per circa un mese.

i-ELISA e c-ELISA



Ai test ELISA BRC i vitelli rimangono **positivi** per oltre 4 settimane

I prelievi effettuati all'età di **8 mesi** sono **risultati negativi** a tutte le prove (SAR, FdC, i-ELISA e c-ELISA)

i-ELISA latte

Tutti i campioni di latte analizzati a partire dal colostro e fino a 4-6 settimane (LATTE MATURO) post-parto sono risultati **costantemente positivi**.

Risvolti pratici esami sierologici: madre infetta-vitello

L'identificazione dei vitelli a rischio basata esclusivamente sulla madre può essere insufficiente.



L'esposizione può avvenire anche attraverso **colostro** e **latte** di altre **femmine infette** presenti nel gruppo parto.

Sfruttando **l'immunità colostrale** e saggiando i vitelli entro il 1° mese di vita con test sierologici per BRC possiamo cambiare prospettiva e target:

- Non solo figli di madre infetta, ma in generale **vitelli esposti a latte di animali infetti**, indipendentemente dalla correlazione genetica.

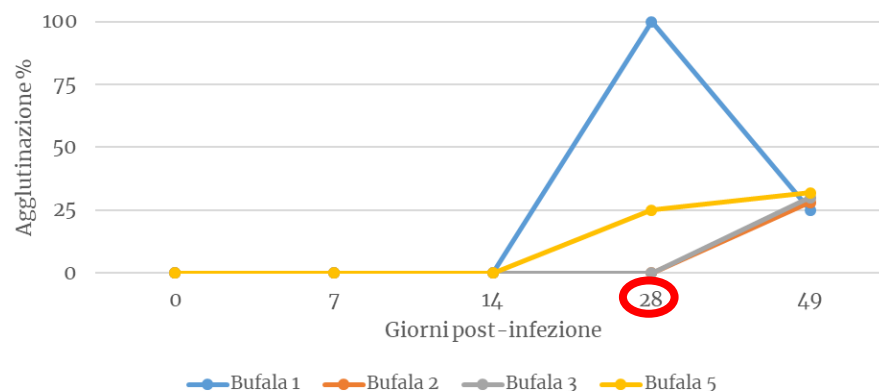
SAR

FdC

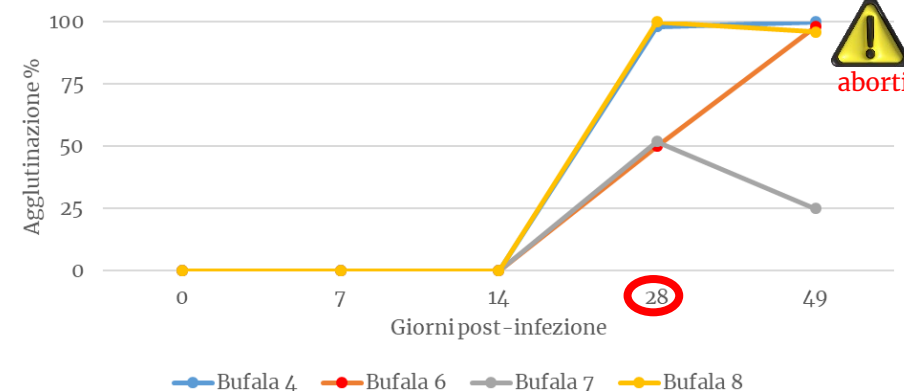
POST-CHALLENGE

Fase 2

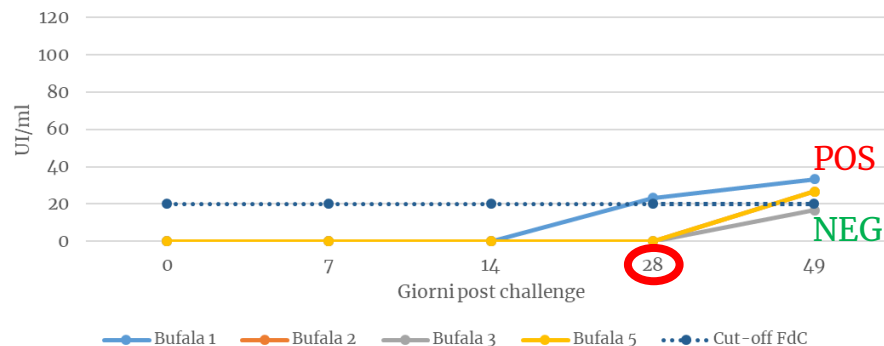
SAR - Vaccinati post-challenge (pre-parto)



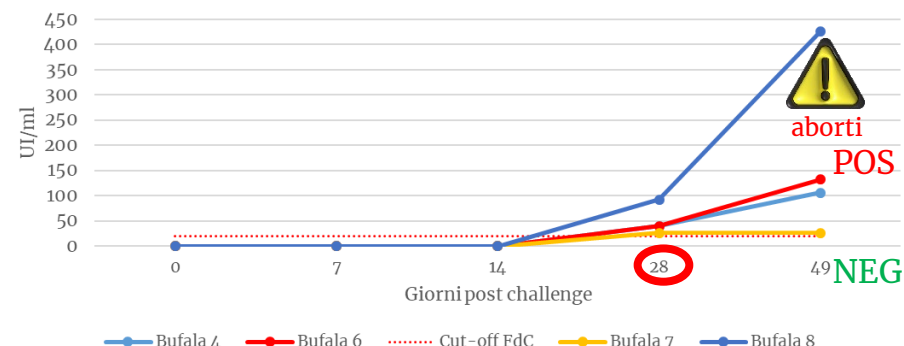
SAR - Controlli post-challenge (pre-parto)



FdC - Vaccinati post-challenge (pre-parto)



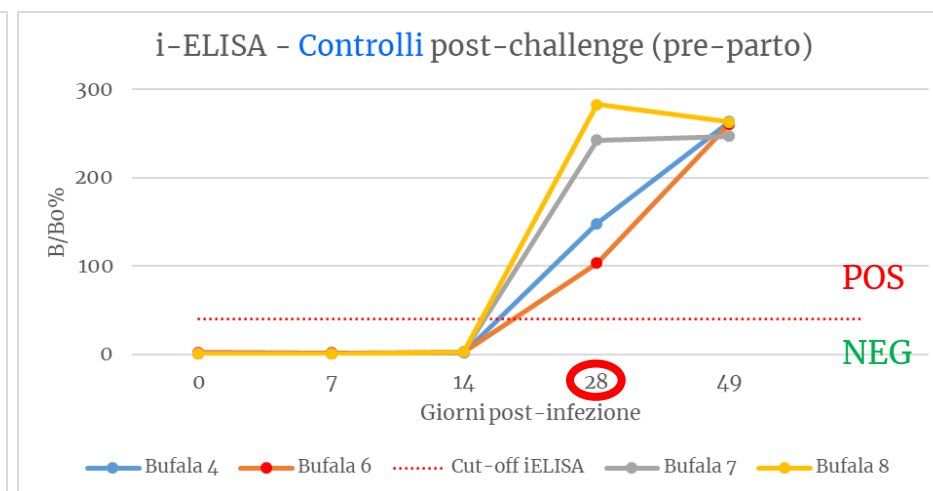
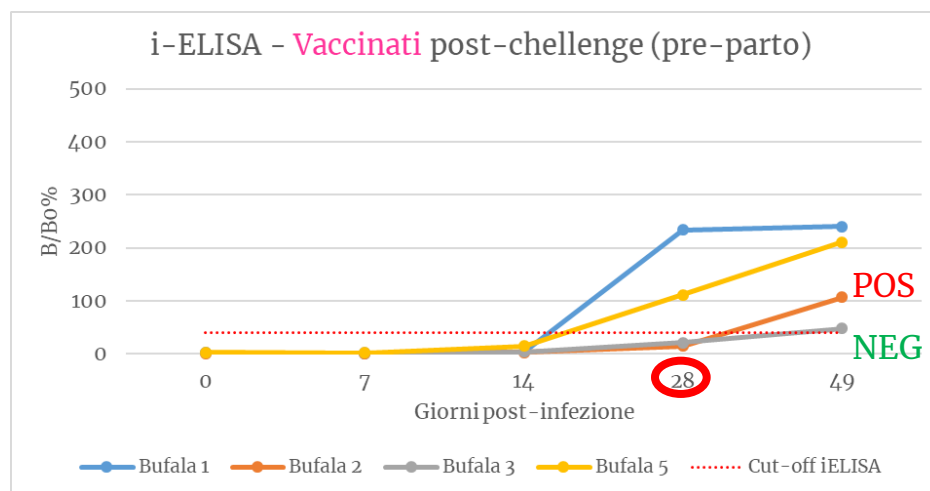
FdC - Controlli post-challenge (pre-parto)



i-ELISA
IDVet
cut-off 40%

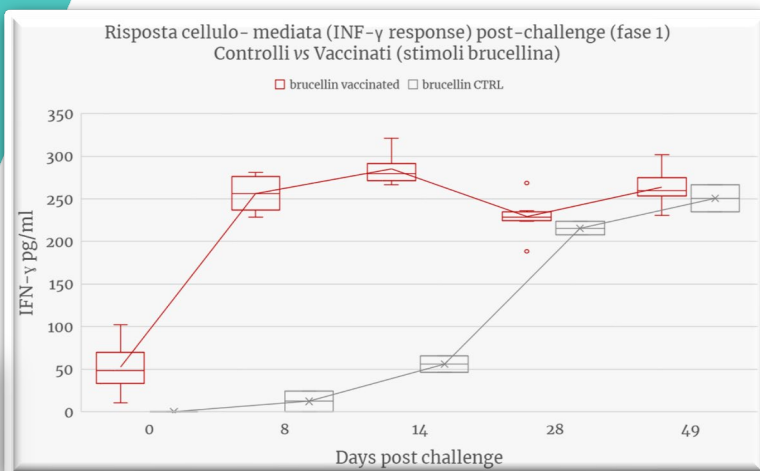
POST-CHALLENGE

Fase 2

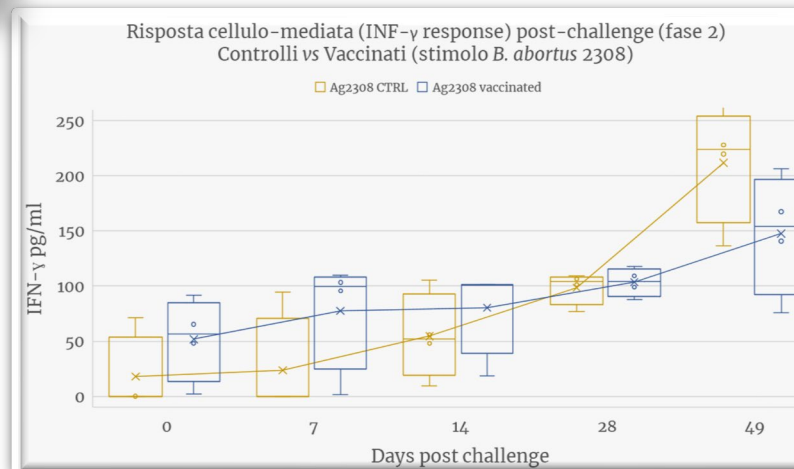
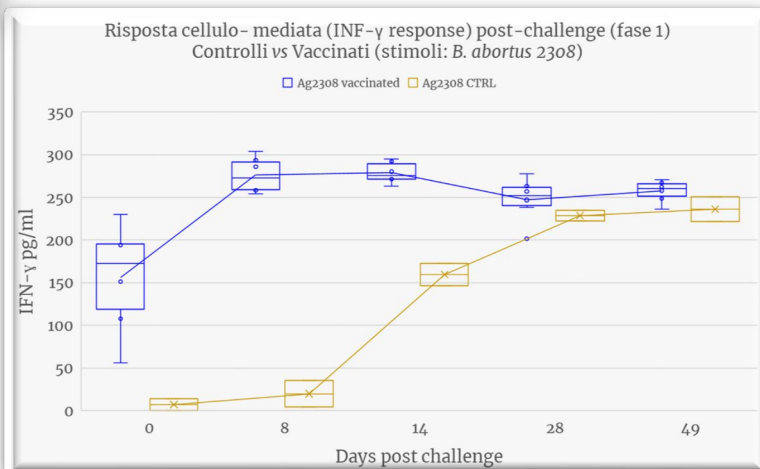
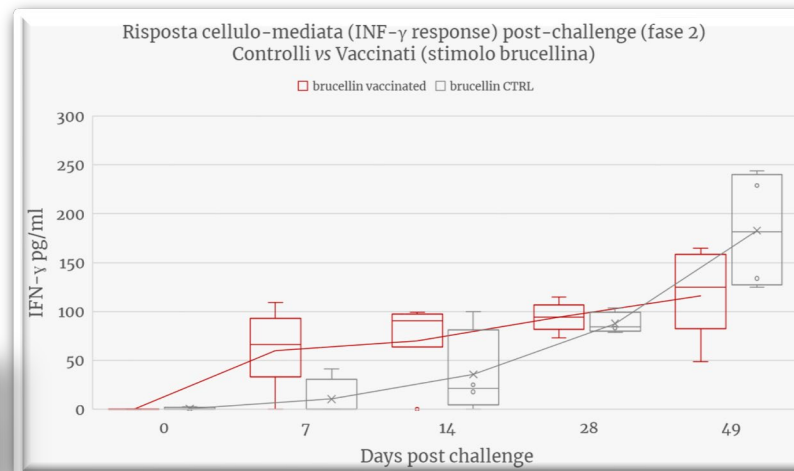


Risultati **post-challenge (fase 2)**: immunità cellulo-mediata (IFN- γ)

Fase 1



Fase 2



2 casi di nati-mortalità



**diminuita
copertura vaccinale**

Conclusioni FASE 1

Il protocollo vaccinale autorizzato in Italia:

1. Conferisce un'immunità che permane per almeno 4 anni dalla vaccinazione.
2. Protegge gli animali dalla sintomatologia ma non dall'infezione.
3. Previene / riduce il rilascio del patogeno a seguito di infezione (parto, latte), riducendo la pressione infettiva in corso di focolaio. Gli animali vaccinati si infettano ma non amplificano la trasmissione.
4. In caso di infezione, la vaccinazione influenza la risposta anticorpale ai test sierologici classici SAR e FdC in termini di durata (più breve) e titoli anticorpali (più bassi/negativi). Necessario integrare utilizzo di più test sierologici (ELISA)

Conclusioni FASE 2

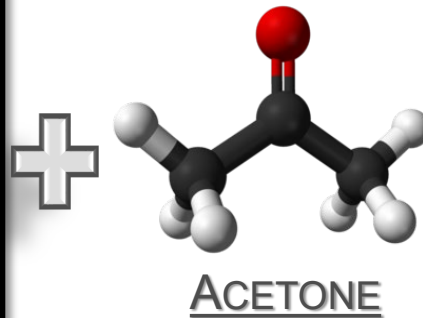
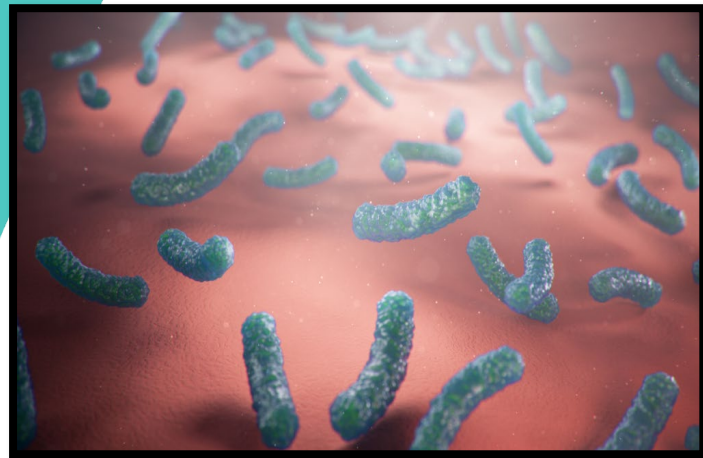
Dopo 5 anni: il vaccino sembra perdere di efficacia

- Nati-mortalità nei vaccinati;
- risposta umorale ritardata;
- risposta cellulo-mediata (INF- γ) meno intensa e più tardiva.

Conclusioni FASE 2

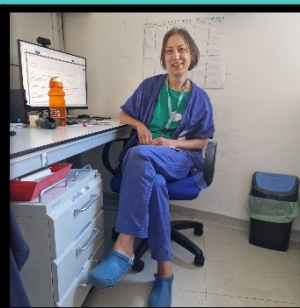
? Booster :

- RB51 (vivo attenuato) non sicuro in età adulta in termini di sanità pubblica e animale.
- *B. abortus* inattivato in acetone: sembra capace di attivare sia la risposta immunitaria innata che quella adattativa *ex vivo*.



- Mantiene l'architettura strutturale e l'esposizione degli epitopi antigenici;
- possibilità di lavorare in sicurezza

➡ Potenziale impiego come vaccino inattivato per richiamo in animali adulti, inclusi animali gravidi e in lattazione, precedentemente vaccinati con ceppi vivi attenuati.



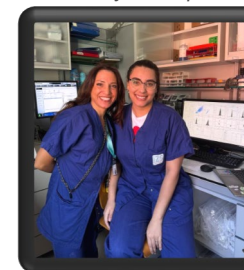
CEN
NAZI
BRU



- IZSAM 09/13 RC
- IZSAM 09/19 RC
- IZSAM 04/22 RC



Un grazie speciale
alla Dott.ssa Maysa Serpa Gonçalves



Grazie alla
Dott.ssa Giulia Cugini
(dottoranda UNITE)

