

RISPOSTA ANTICORPALE IN OVINI VACCINATI PER VIA SOTTOCUTANEA CON REV-1

D. Nannini¹ - D. Cerri² - A. Giovannini¹ - D. Morelli¹ - M. Scacchia¹ - M. Tittarelli¹ - E. Andreani² - V. Caporale¹ - R. Farina²
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" - Teramo¹
Dipartimento di Patologia Animale Profilassi e Igiene degli Alimenti - Pisa²

RIASSUNTO

Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la dinamica degli anticorpi agglutinanti e fissanti il complemento in gruppi di animali di diversa età, inoculati per via sottocutanea con il ceppo REV-1 ufficialmente impiegato in Italia per le vaccinazioni di campo. Sono stati utilizzati due gruppi di animali vaccinati sperimentalmente e 29.483 campioni di siero di ovini e caprini appartenenti a 865 greggi nei quali è stata praticata, in tutti gli animali di età compresa fra 3 e 7 mesi, la vaccinazione con REV-1. La totalità dei sieri esaminati è stata saggiata mediante la SAR e la FDC. In ovini vaccinati in età prepubere per via sottocutanea con REV-1, gli anticorpi conseguenti alla somministrazione del vaccino possono persistere fino a 39 m.p.v. L'agglutinazione appare più sensibile della fissazione del complemento e le due prove hanno livelli di specificità soddisfacente e sostanzialmente uguale. L'età di vaccinazione sembra avere influenza sulla persistenza nel tempo di anticorpi fissanti il complemento. Vengono valutati i rischi di false positività e negatività legate a risposte sierologiche post-vaccinali e si indicano possibili strategie per limitarli.

PAROLE CHIAVE

Brucella melitensis, Ovini, Rev-1, Risposta anticorpale, Vaccinazione.

Introduzione

L'Ordinanza Ministeriale (Sanità) del 19 febbraio 1991, modificata con l'Ordinanza Ministeriale (Sanità) 8 ottobre 1991, ha adeguato il Piano Nazionale per la profilassi della Brucellosi ovina e caprina, di cui al Decreto Ministeriale (Sanità) 4 giugno 1968, alla Decisione 90/242/CEE del Consiglio delle Comunità Europee del 21 maggio 1990.

Tutte le norme precedentemente in vigore incompatibili con la Decisione 90/242/CEE vengono abrogate e l'eradicazione della Brucellosi ovi-caprina viene resa obbligatoria su tutto il territorio nazionale.

La diagnosi indiretta di Brucellosi ovi-caprina si basa solo sulle prove sierologiche e, più precisamente, sulla Siero Agglutinazione Rapida con antigene al Rosa Bengala (SAR) per la definizione dello stato di infezione del gregge e sulla Fissazione del Comple-

mento (FDC) per la definizione dello stato di infezione del singolo animale.

I prelievi di sangue, da animali vaccinati con Rev-1 prima dei 7 mesi di età, vanno effettuati a partire da 30 mesi di età dell'animale fino al 31 dicembre 1992 e, successivamente a tale data, a partire da 18 mesi di età; un animale viene considerato positivo quando nel suo siero sono contenute 20 Unità Internazionali Fissanti il Complemento (UIFCT).

È stato dimostrato che negli ovini e nei caprini di oltre 20 mesi di età vaccinati con REV-1 per via sottocutanea, con dosi più o meno uguali a quelle usate dal 1981 in Italia per la vaccinazione obbligatoria, la SAR e la FDC possono dare esito positivo in assenza di infezione (1, 7).

Non esistono, tuttavia, lavori che descrivano le curve anticorpali oltre i 18 o 24 mesi dalla vaccinazione per via sottocutanea e per i

ANTIBODY RESPONSE IN SHEEP VACCINATED SUBCUTANEOUSLY WITH REV-1

D. Nannini - D. Cerri - A. Giovannini
D. Morelli - M. Scacchia - M. Tittarelli
E. Andreani - V. Caporale - R. Farina

Foreword

It has been shown that serological tests, such as Rose Bengal Test (RBT) and Complement Fixation Test (CFT) may result positive even if infection is not present (1, 7) in ovi-caprine populations above 20-month age vaccinated s.c. with Rev-1 with doses similar to those used in Italy for vaccination made compulsory since 1981. Still, research works reporting antibody reactions above 18 or 24 months from s.c. vaccinations with doses used in Italy are not found in the current literature. More, in no paper antibody titres are reported in IUCFT as requested by the regulations in force.

Materials and methods

Two groups of animals have been used. The former consisted of 119 lambs aged 4 to 4^{1/2} months imported from Denmark (Group 1); the latter consisted of 78 lambs aged 5 to 5^{1/2} months from a brucellosis-free flock of the Abruzzo region (Group 2).

quali siano state utilizzate dosi comparabili a quelle utilizzate in Italia. Non esistono neppure lavori in cui i tassi degli anticorpi fissanti il complemento siano riportati in Unità Internazionali come è, invece, richiesto dalla normativa Comunitaria attualmente in vigore.

Con le presenti ricerche ci si è prefissi lo scopo di valutare la dinamica degli anticorpi agglutinanti e fissanti il complemento in gruppi di animali di diversa età, inoculati per via sottocutanea con il ceppo REV-1 ufficialmente utilizzato in Italia per le vaccinazioni di campo; ciò al fine di determinare se ed in quale misura le soglie di positività sierologica, stabilite dalla normativa vigente, comportano rischi di false positività dovute alla persistenza di anticorpi vaccinali.

Materiali e metodi

Animali

Sono stati utilizzati due gruppi di animali. Il primo costituito da 119 agnelle di 4-4 $\frac{1}{2}$ mesi di razza frisone, finnica e meticce importate per la presente sperimentazione dalla Danimarca (*Gruppo 1*); il secondo costituito da 78 agnelle di 5-5 $\frac{1}{2}$ mesi di razza appenninica e meticce di Ile de France x Bergamasca provenienti da un gregge della Regione Abruzzo indenne da brucellosi (*Gruppo 2*).

Sono stati inoltre esaminati 29.483 emosieri di ovini e caprini appartenenti a greggi nelle quali, a norma di legge, è stata praticata in tutti gli animali di età compresa fra 3 e 7 mesi la vaccinazione con 2×10^9 Unità Formanti Colonie (UFC) di REV-1. I campioni sono stati prelevati in 865 allevamenti della Regione Abruzzo, nell'ambito delle attività di profilassi della brucellosi ovi-caprina e sono pervenuti all'Istituto Zooprofilattico dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" nel periodo genna-

io-giugno 1991.

Vaccino e vaccinazioni

Tutte le vaccinazioni sono state effettuate con REV-1 ufficialmente usato in Italia (Istituto Zooprofilattico del Lazio e della Toscana-Roma) per via sottocutanea, alla dose stabilita dalla normativa vigente (1 ml).

Il vaccino è risultato contenere da $2,2$ a $2,5 \times 10^9$ UFC/ml.

Sessanta agnelle del *Gruppo 1*, selezionate in modo casuale, sono state vaccinate (*Gruppo 1a*) e 59 lasciate come controlli (*Gruppo 1b*). I due gruppi sono stati separati e tenuti in isolamento ad eccezione di 7 animali del *Gruppo 1b* introdotti nel *Gruppo 1a* un mese dopo la vaccinazione (*Gruppo 1c*).

Quarantaquattro agnelle del *Gruppo 2*, selezionate in modo casuale, sono state vaccinate (*Gruppo 2a*) e 34 lasciate come controlli (*Gruppo 2b*). I due gruppi sono stati separati, ma non isolati l'uno dall'altro.

Esami sierologici

Prima di iniziare la sperimentazione gli animali di tutti i Gruppi sono stati esaminati per la presenza di anticorpi anti-brucellari.

I controlli sierologici sono stati eseguiti secondo il cronogramma riportato nella Tabella 1.

Tutti i sieri sono stati saggiati mediante SAR, effettuata secondo il metodo descritto da Morgan (9), e la FDC, effettuata secondo il metodo indicato da Caporale e coll. (4).

Gli antigeni utilizzati sono quelli prodotti dall'Istituto Zooprofilattico dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", secondo i metodi descritti da Alton e coll. (2) e controllati dall'International Laboratory for Biological Standards, Central Veterinary Laboratory di Weybridge, Regno Unito.

Sixty-six lambs of Group 1 have been vaccinated (Group 1a); 59 have been kept as controls (Group 1b). Both groups have been kept separated and isolated except for 7 animals of Group 1b added to Group 1a four weeks post vaccination (p.v.) (Group 1c).

Forty-four lambs of Group 2 have been vaccinated (Group 2a); 34 left as controls (Group 2b). The two groups have been separated but not isolated.

The effective of all groups have been tested for anti-Brucella antibodies before trials and then up to 18 and 39 months p.v. those from Group 1 and Group 2, respectively.

29,483 sheep serum field samples from flocks whose animals aged 3-7 months have been vaccinated with Rev-1 have also been tested. Samples have been collected from 865 flocks in Abruzzo region January to June 1991.

All sera of the examined animals have been RBT- and CFT-tested according to Morgan (9) and Caporale et al. (4) techniques, respectively.

Results

The sera from all experimental groups collected before starting the tests have resulted negative to RBT and CFT.

GROUP 1a

RBT: 100% animals reacted to vaccination with agglutinating antibodies. One and 2 months p.v. all sera were found positive (Figure 1); starting 6 months p.v. the percentage of reactors has lowers to 40.6% 18 months p.v.

CFT: the highest percentage of vaccinated animals that produced complement fixing antibodies is 96.7% one month p.v. (Figure 1); starting 2 months p.v. it keeps decreasing and reaches 3.1% 18 months p.v. Ninety-five percent animals is negative to CFT 12 months p.v. and the remaining 5% (Figure 3) has titres between 20 and 50 IUCFT; 18 months p.v. such a percentage decreases to 3.1%. Reactions with titres above 50 IUCFT did not take place neither after 12 nor after 18 months p.v.

GROUP 1b

All animals have reacted negatively to both RBT and CFT.

GROUP 1c

One animal had a ++++ reaction to RBT and a titre of 10 IUCFT 12 months p.v. Another one has shown a + reaction to RBT 8 months p.v.

GROUP 2a

RBT: 44.2% animals is positive at

Tabella 1: Cronogramma dei controlli sierologici effettuati sugli animali dei gruppi sperimentali.

Gruppo	1a	1b	1c	2a	2b	Gruppo	1a	1b	1c	2a	2b
Nr. capi	60	52	7	44	34	Nr. capi	60	52	7	44	34
Mesi post vaccin.	0	+	+	+	+	+	14			+	+
	1	+	+	+			15	*	*	+	+
	2	+	+	+			16			+	+
	3	+	+	+			17			+	+
	4	+	+	+			18	*	*	+	+
	5	+	+	+			19				
	6	+	+	+			20			+	+
	7	+		+			21		*	+	+
	8	+	+	+			22				
	9	+		+			23				
	10	+	+	+			24			+	+
	11						25			+	+
	12	+	+	+			26			+	+
	13	*		+	+		39			+	+

+ = esaminati tutti i capi

* = esaminato un campione randomizzato costituito da 32 capi per il Gruppo 1a e da 26 capi per il Gruppo 1b

Risultati

I sieri degli animali di tutti i Gruppi prelevati prima dell'inizio della sperimentazione sono risultati negativi sia alla SAR che alla FDC.

GRUPPO 1a

Siero agglutinazione rapida (SAR): il 100% degli animali ha reagito alla vaccinazione producendo anticorpi agglutinanti. Sia 1 che 2 m.p.v. i sieri di tutti gli animali risultano positivi (Figura 1); tale percentuale si abbassa 4 e 5 m.p.v., portandosi rispettivamente al 70% e al 46,7%, per risalire poi al 100% al sesto mese;

da questo momento in poi il numero degli animali che reagiscono si abbassa progressivamente fino a raggiungere il 40,6% 18 m.p.v.

Suddividendo gli animali positivi alla SAR per grado di agglutinazione rilevato (Figura 2) 12 m.p.v. si osserva che, rispetto al totale degli animali esaminati, quelli il cui siero presenta una agglutinazione ++++ sono il 18,6%; quelli con agglutinazione + sono il 27%; quelli con agglutinazione +++ o ++ sono complessivamente il 10,2%. Diciotto m.p.v. non si hanno sieri che reagiscono con ++++, mentre la percentuale di sieri con agglutinazione +, ++ e

the first bleeding 13 months p.v. (Figure 4); such a percentage, even if with marked variations, has remained unaltered up to 20 months p.v. (46,5%). Starting 21st month p.v. the percentage of positive has always decreased but remained above 10%; 39 months p.v. positive animals have been found 18.9%.

CFT: 23.3% animals reacted positively at the first bleeding 13 months p.v. (Figure 4). The percentage of animals with antibody titres above 20 IUCFT is between 10-15% up to 23 months p.v. Then, a slow decrease starts and 39 months p.v. 5.4% animals has still titres above 20 IUCFT.

After dividing animals positive to CFT into titre classes seen 13, 18, 24, and 39 months p.v. (Figure 6) it can be observed that a number of them has titres above the one fixed as a positivity limit by the regulation in force (20 IUCFT). In fact, 13 months p.v. 23.3% still has titres above 20 IUCFT (4.7% between 101 and 200 IUCFT, 18.6% between 22 and 100 IUCFT). Eighteen months p.v. positive animals are 13.9% (2.3% between 101 and 200 IUCFT, and 11.6% between 22 and 100 IUCFT). Positive animals 24 months p.v. are 9.6% (2.4% between 51 and 100 IUCFT, 7.2% between 22 and 50 IUCFT). Thirty-nine months p.v. animal percentage with titres above 20 IUCFT is 5.4% with titres between 23 and 53 IUCFT.

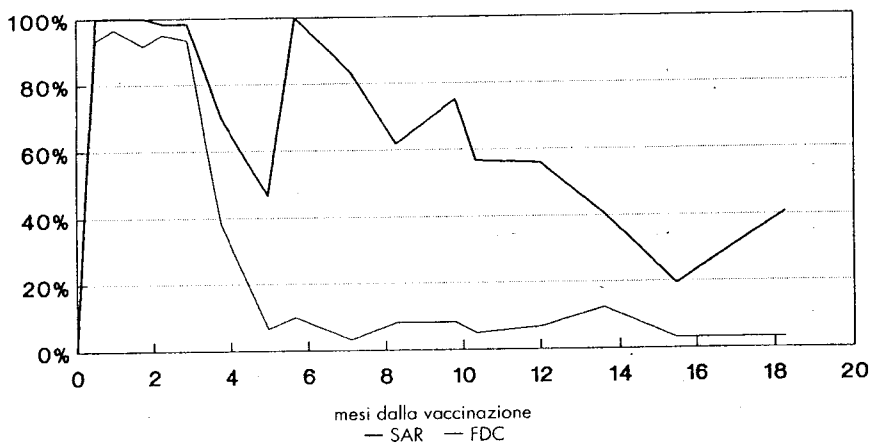
GROUP 2b

Within the 26 months of monthly bleeding 23 animals of Group 2b reacted positively to RBT. Eleven out of them reacted positively to more than one bleeding with an agglutination level between + and ++++. Two animals reacted also to CFT: 1 with a titre of 45 IUCFT at the bleeding performed 27 months following the starting of the experiment and the other with a titre of 22 IUCFT in two bleedings carried out 15 and 20 months from the beginning of the trial.

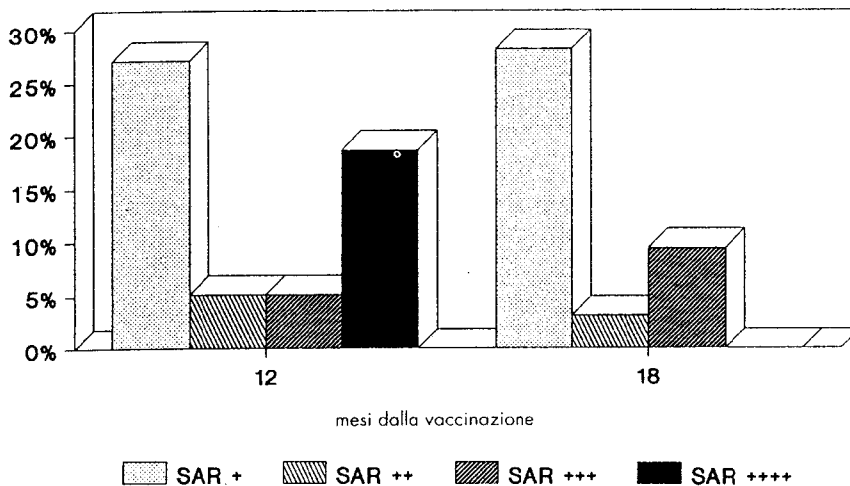
FIELD SERA

Flocks with one or more animals with titres to CFT above 20 IUCFT have resulted 23.6% of the total; animals serologically positive to RBT and CFT are 13.8 and 8.1%, respectively.

Flocks with animals whose titres to CFT are above 40, 80, 100, 160, 300 and 500 have been 19.5, 16.2, 14.8, 7.7 and 3.2%, respectively. In the same flocks the prevalence of animals serologically positive to RBT is 13.5, 12.7, 12.4, 11.5, 8.9 and 6.0%, respectively. The prevalence of animals positive to CFT is 7.9, 7.6, 7.3, 6.9,

Figura 1: Percentuale di capi positivi alla SAR e alla FDC a vari mesi dalla vaccinazione (Gruppo 1a).

Ovini vaccinati a 4-4½ mesi di età.

Figura 2: Percentuale di capi positivi alla SAR 12 e 18 mesi p.v. (Gruppo 1a).

Ovini vaccinati a $4-4\frac{1}{2}$ mesi di età.

+++ resta pressoché invariata rispetto a quella osservata 12 m.p.v. (+ = 28%; +++ o ++ = 12,4%).

Fissazione del complemento (FDC): l'incidenza massima di animali vaccinati con reazione positiva alla FDC è del 96,7% 1 m.p.v. (Figura 1); tale percentuale inizia a decrescere, anche se non in modo significativo, già 2 m.p.v. (95%) per arrivare al 3,1% 18 m.p.v. Anche nel caso degli anticorpi fissanti il complemento si è avuto un leggero incremento numerico di positività tra 5 e 6 m.p.v. (6,7% e 10% rispettivamente).

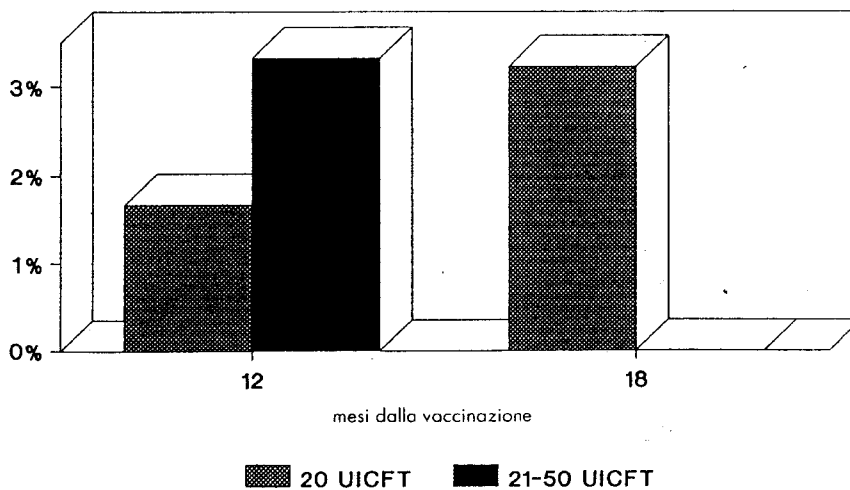
Il 95% degli animali è negativo alla FDC 12 m.p.v. mentre il restante 5% (Figura 3) presenta titoli compresi fra 20 e 50 UICFT; 18 m.p.v. la percentuale si abbassa a 3,1. Né 12 né 18 m.p.v. si sono evidenziate reazioni superiori a 50 UICFT.

GRUPPO 1b

Nessun animale ha presentato reazioni positive alla SAR o alla FDC.

GRUPPO 1c

Un animale di questo Gruppo

Figura 3: Percentuale di capi positivi alla FDC 12 e 18 mesi p.v. (Gruppo 1a).

Ovini vaccinati a $4-4\frac{1}{2}$ mesi di età.

5.8 and 4.0, respectively.

If a flock is established as infected when one of its animals has at least a titre to CFT above 20, 40, 80, 100, 160, 300 and 500 IUCFT, it is noticed that by increasing this threshold value, the polynomial regression shows a linear trend if related to animals (Figure 7) while it shows a curvilinear trend with a plateau between 150 and 400 IUCFT and a flex point at 320 IUCFT if referred to flocks (Figure 8).

Flocks with animals whose titre is ≥ 100 IUCFT are 62.8% of the positive ones. In such flocks one finds 89.9% of animals positive to RBT and 90.9% of the animals with titre above 20 IUCFT (Figure 9).

Discussion

In sheep vaccinated s.c. when prepuberal with Rev-1 containing 2×10^9 CFU/dose, antibodies due to vaccine administration can be effective up to 39 months p.v. The persistence of the antibody titre is a confirmation of what observed by previous Authors on numerically smaller groups and for shorter times (6, 7, 8, Alton reported by Fensterbank et al. 7).

Agglutination appears more sensitive than CFT and age difference of animals at vaccination seems to exert no influence on the prevalence of p.v. serological positivity up to 18 months p.v. In fact, the positivity rate in vaccinated animals when $4-4\frac{1}{2}$ -month age (40.6%) is not significantly different from the one seen in animals vaccinated when $5-5\frac{1}{2}$ -month age (41.9%).

Serological negativity, seen at both RBT and CFT in all animals prior to vaccination and then in unvaccinated ones isolated from vaccinated animals, shows that both tests attain satisfactory and virtually equal specificity levels; this is a confirmation of other Authors' observations (3, 5, 12). The RBT shows a higher sensitivity than CFT. This could be due to the different sensitivity of the used antigens (12). Trace of this clashing opinions is found in previous research papers (4, 5, 7). The RBT higher sensitivity proves that in ovine mass investigation the performing of such a test reduces the risk of a false negativity to a minimum in infected flocks.

The persistence of complement fixing antibodies depends on the age of vaccination. The higher the age the longer the antibody persistence. The percentage of animals vaccinated when $4-4\frac{1}{2}$ months with a titre of ≥ 20 IUCFT both at 12 and 18 months p.v. is markedly lower (6.8% and 3.1%) than that of animals vaccinated when $5-5\frac{1}{2}$ months (23.2% and 13.9%).

ha presentato reazione ++++ alla SAR ed un titolo pari a 10 UICFT 12 m.p.v., mentre un secondo animale ha presentato reazione + alla SAR 8 m.p.v.

GRUPPO 2a

Siero agglutinazione rapida (SAR): il 44,2% degli animali è risultato positivo al primo prelievo 13 m.p.v. (Figura 4); tale percentuale pur con oscillazioni, anche piuttosto marcate (14 m.p.v. : 47,7; 15 m.p.v. : 27,3; 16 m.p.v. : 41,9; 17 m.p.v. : 30,2; 18 m.p.v. : 41,9; 20 m.p.v. : 46,5), è rimasta

pressoché invariata fino a 20 m.p.v. (46,5). A partire da 21 m.p.v. la percentuale di animali positivi si abbassa, ma resta sempre maggiore del 10% e 39 m.p.v. i capi positivi rappresentano ancora il 18,9% del totale.

Suddividendo gli animali positivi alla SAR in base all'intensità della reazione (Figura 5) 13 m.p.v. si osserva che, rispetto al totale degli animali esaminati, quelli il cui siero presenta agglutinazione ++++ sono il 20,9%; quelli con agglutinazione +++ il 11,6%; quelli con agglutinazione ++ sono il

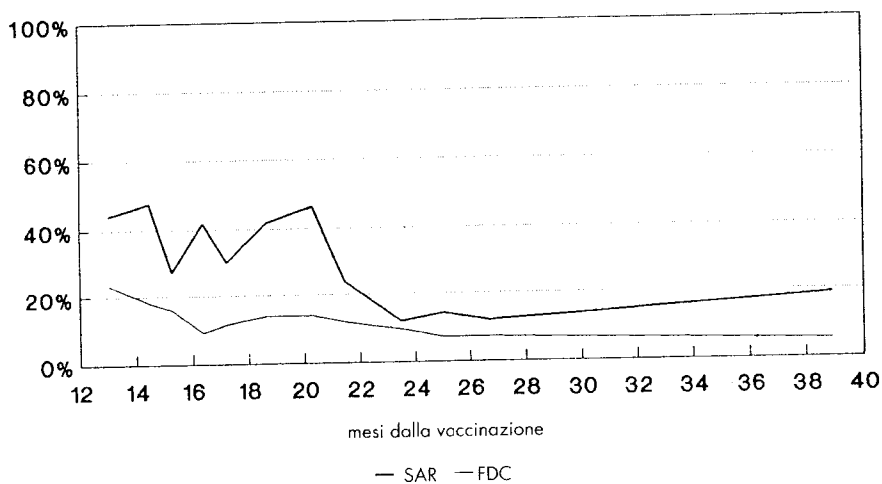
Thirty-nine months p.v. 5.4% animals vaccinated when 5-5^{1/2} month age is still serologically positive. In the former animals antibody titres above 50 IUCFT have never been seen 12 or 18 months p.v., while in the latter ones 13 and 18 months p.v. 2.3% and 7% animals have titres between 51 and 100 IUCFT and 4.7% and 2.3% between 101 and 200 IUCFT, respectively.

Serological positivity observed in unvaccinated animals could be probably due to a contact with vaccinated ones. Such an hypothesis matches 1966 Neeman's remarks (10) which remained unconfirmed the following years (11). In fact, positivity frequencies seen in unvaccinated animals kept close to the vaccinated ones in the two experimental groups do not differ in a statistically significant way (chi-square, $p=0.13$) while in unvaccinated animals kept isolated from the vaccinated ones no serological positivity has ever been observed. The coincidence between oestrus and increase of the prevalence of serological positivity seen at the RBT in animals of Group 1a 6 months p.v. could be fortuitous if compared to that of the same animals 5 months p.v. However, given the influence the sexual maturity has on the pathogenesis of Brucella infection in sheep, a further investigation would be needed on a practical level whenever it should not be deemed as casual.

If one extrapolates the prevalence of positivity to RBT and CFT seen in animals of the group vaccinated when 5-5^{1/2} months it might be expected that the prevalence of the serological positivity due to the persistence of vaccinal antibodies in ovi-caprine populations to RBT and CFT is nearly 4 and 2%, respectively. Such values agree with a positivity threshold between 100 and 160 IUCFT. In fact, positivity frequencies seen in field sera have been 14.3 and 8.5% to RBT and CFT, respectively. If animals of flocks with one positive subject at least with a titre of ≥ 100 IUCFT are excluded, positivity rates lower to 4.3 and 1.6% to RBT and CFT, respectively. These are values very near to the theoretical ones expected from the trials.

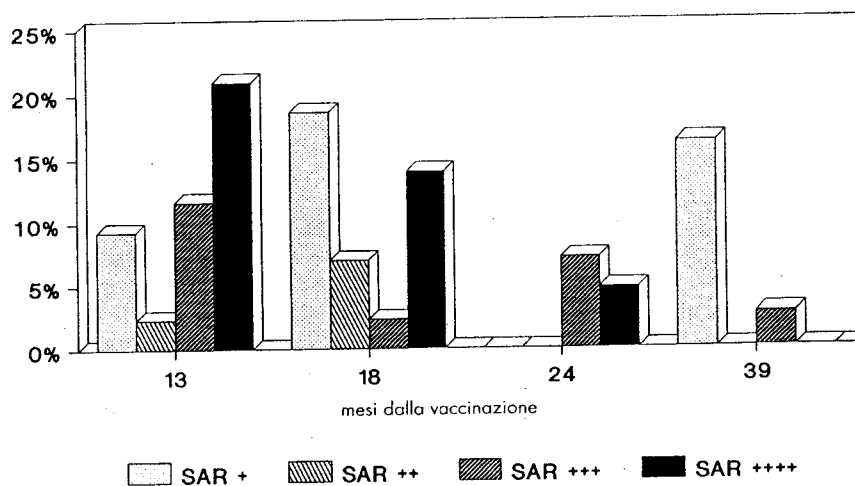
The percentage trend in positive flocks shows the presence of two large groups of flocks, one having low-titred animals to CFT (first decreasing phase of the regression curve), the other having high-titred animals (second decreasing phase), while rarely the highest titre seen in the flock is between 150 and 400 IUCFT (plateau). The first group may represent the whole flocks where only the persistence of vaccinal

Figura 4: Percentuale di capi positivi alla SAR e alla FDC a vari mesi dalla vaccinazione (Gruppo 2a).



Ovini vaccinati a 5-5^{1/2} mesi di età.

Figura 5: Percentuale di capi positivi alla SAR 13, 18, 24, 39 mesi p.v. (Gruppo 2a).



Ovini vaccinati a 5-5^{1/2} mesi di età.

2,3%; quelli con agglutinazione + il 9,3%. Diciotto m.p.v. il 14% degli animali ha una reazione ++++; il 2,3% una reazione +++; il 7% una reazione ++; il 18,6% una reazione +. All'ultimo prelievo (39 m.p.v.) nessun animale è positivo ++++; il 2,7% ha una reazione +++; il 16,2% ha una reazione +.

Fissazione del complemento (FDC): il 23,3% degli animali ha presentato sieropositività al primo prelievo 13 m.p.v. (Figura 4); fino a 23 m.p.v. la percentuale degli animali con titoli anticorpali superiori a 20 UICFT si mantiene tra il 10% ed il 15%, inizia quindi una lentissima discesa (9,5% 23 m.p.v.; 7,1% 25 m.p.v.; 7,1% 27 m.p.v.) per arrivare a 39 m.p.v. quando il 5,4% degli animali reagisce ancora a titoli superiori a 20 UICFT.

Suddividendo gli animali positivi alla FDC per classi in base al titolo rilevato 13, 18, 24 e 39 m.p.v. (Figura 6) si nota che un numero significativo di capi vaccinati in età inferiore a quella massima consentita presenta titoli superiori a quello considerato soglia di positività dalla legislazione vigente (20 UICFT). Infatti 13 m.p.v., ovvero all'età di 18 mesi,

il 23,3% degli animali ha ancora titoli superiori a 20 UICFT (4,7% fra 101 e 200 UICFT; 2,3% fra 51 e 100 UICFT; 2,3% fra 23 e 50 UICFT; 14% 22 UICFT). Diciotto m.p.v., ovvero all'età di 24 mesi, i positivi costituiscono in complesso il 13,9% con percentuali di positività per le quattro classi del 2,3%; 7%; 2,3%; 2,3%, rispettivamente. Gli animali positivi all'età di 29 mesi (24 m.p.v.) sono il 9,6% (2,4% fra 51 e 100 UICFT; 4,8% fra 23 e 50 UICFT; 2,4% 22 UICFT). A 44 mesi di età (39 m.p.v.), infine, la percentuale di quelli con titoli >20 UICFT è del 5,4% con valori compresi fra 23 e 53 UICFT.

GRUPPO 2b

Nei 27 mesi durante i quali si sono effettuati i prelievi, 23 animali del Gruppo 2b hanno reagito positivamente alla SAR almeno ad un prelievo. Di questi, 11 sono risultati positivi a più di un prelievo con grado di agglutinazione variabile da + a ++++. Due animali hanno reagito anche alla FDC: uno al titolo di 45 UICFT al prelievo effettuato 27 mesi dopo l'inizio dell'esperimento e l'altro al titolo di 22 UICFT in due prelievi

antibodies is seen and the second those where infection is present. The flex point (320 IUCFT) in the middle of the plateau can be regarded as a theoretical threshold to discriminate the two groups. The risk of infection or the persistence of vaccinal antibodies for flocks being in the plateau are equivalent. Then, it can be more suitable to assume the beginning of the plateau as a threshold value. A mild discrepancy between the two thresholds (150 IUCFT vs 100-160 IUCFT) could be due to the fact that field animals have been vaccinated up to 7 months, that could have favoured the persistence of vaccinal antibodies.

No doubt that in ovine populations vaccinated s.c. with Rev-1 with $2 \cdot 10^9$ CFU at least (and more in unvaccinated animals), the definition of infection state of each animal on the ground of the positivity to CFT at a titre ≥ 20 IUCFT involves a double risk;

a) in vaccinated and uninfected flocks the average level of false positivity ranges at least 13.9% in sheep examined 18 months p.v. and is equivalent to at least 5.4% in those examined 39 months p.v. Given the influence of the vaccinal age on the persistence of vaccinal antibodies, also seen in the present trial, such a risk increases if tested animals have been vaccinated when older than $5.5^{1/2}$ months;

b) in infected flocks CFT has not a sensitivity level to display all animals that harboured Brucella. Such a risk can be reduced by means of synergistic action RBT and CFT.

A decrease of the two risks is possible if flocks are divided into infected and healthy ones.

The difference can be performed on the epidemiological and clinical bases. On the ground of the sole serological tests and taking into account the vaccinal status of animals, a flock may be considered as infected when:

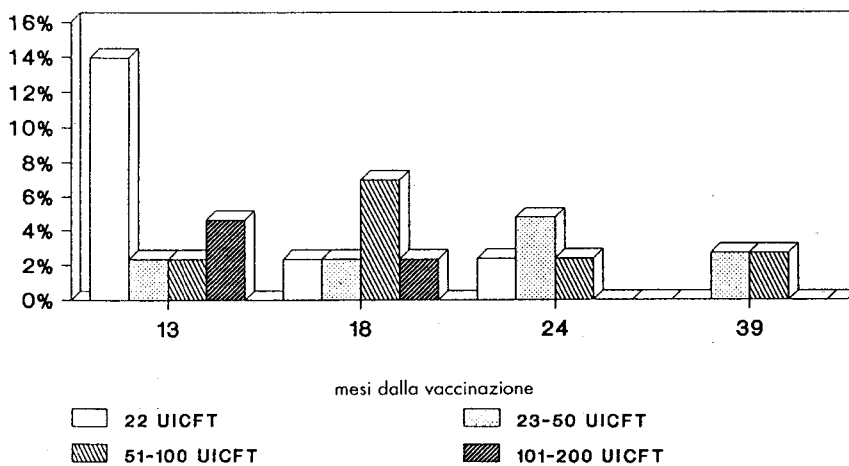
a) animals have not been vaccinated, yet one at least is positive to RBT and/or CFT with ≥ 20 IUCFT;

b) animals have been vaccinated up to 7 months and one at least is between 18 and 30 months with a titre ≥ 100 IUCFT and/or one at least is aged ≥ 30 months with a titre ≥ 40 IUCFT;

c) animals have been vaccinated up to 5 months and one at least is between 18 and 30 months with a titre ≥ 50 IUCFT and/or one at least is aged ≥ 30 months with a titre ≥ 20 IUCFT.

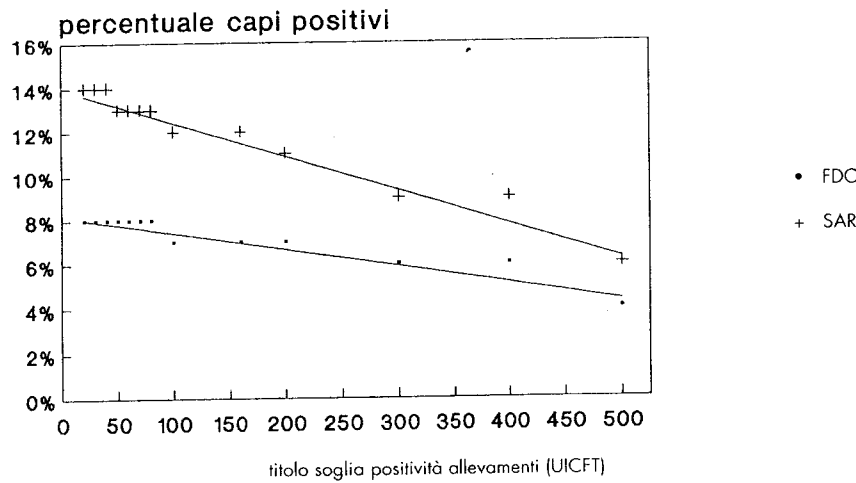
In infected flocks all animals that positively react to RBT or with titres ≥ 20 IUCFT to CFT should be regarded as infected.

Figura 6: Percentuale di capi positivi alla FDC 13, 18, 24, 39 mesi p.v. (Gruppo 2a).



Ovini vaccinati a $5.5^{1/2}$ mesi di età.

Figura 7: Percentuale di capi positivi alla FDC in relazione alla soglia per considerare un allevamento infetto.



effettuati 15 e 20 mesi dopo l'inizio dell'esperimento.

SIERI DI CAMPO

Gli allevamenti con uno o più animali con titoli alla FDC ≥ 20 UICFT sono stati il 23,6% degli esaminati; la prevalenza di capi con reazione positiva risulta complessivamente il 13,8% alla SAR e l'8,1% alla FDC.

Gli allevamenti con almeno un capo con positivo alla FDC a titolo superiore o uguale rispettivamente a 40, 80, 100, 160, 300 o 500 UICFT sono stati il 19,5%, 16,2%, 14,8%, 7,3% e 3,2%; negli stessi allevamenti la prevalenza di capi positivi alla SAR è del 13,5%, 12,7%, 12,4%, 11,5%, 8,9% e 6,0% rispettivamente, quella alla FDC è del 7,9%, 7,6%, 7,3%, 6,9%, 5,8% e 4,0% rispettivamente.

Se si ritiene infetto un allevamento in cui è presente almeno un capo positivo alla FDC a titolo superiore o uguale rispettivamente a 20, 40, 80, 100, 160, 300 o 500 UICFT si nota che all'aumento del valore-soglia per considerare un allevamento infetto, la regressione polinomiale evidenzia per i capi un andamento rettilineo (Figura 7), e per gli allevamenti un andamento curvilineo con un plateau compreso tra 150 e 400 UICFT ed

un flesso a 320 UICFT (Figura 8).

Gli allevamenti in cui è presente almeno un capo positivo a titolo

≥ 100 UICFT rappresentano il 62,8% di quelli positivi; tuttavia in tali allevamenti si riscontra l'89,9% dei capi positivi alla SAR e il 90,9% dei capi con titoli superiori a 20 UICFT (Figura 9).

Quelli in cui è presente almeno un capo con titolo ≥ 160 UICFT sono il 52,9% degli allevamenti positivi ed in questi ultimi si riscontra l'83,5% di capi positivi alla SAR e l'85,9% di capi positivi alla FDC.

Discussione

Dai risultati ottenuti nei due gruppi sperimentali emerge che in ovini impuberi, inoculati per via sottocutanea con REV-1, gli anticorpi vaccinali possono persistere

Figura 8: Percentuale di allevamenti positivi alla FDC in relazione alla soglia per considerare un allevamento infetto.

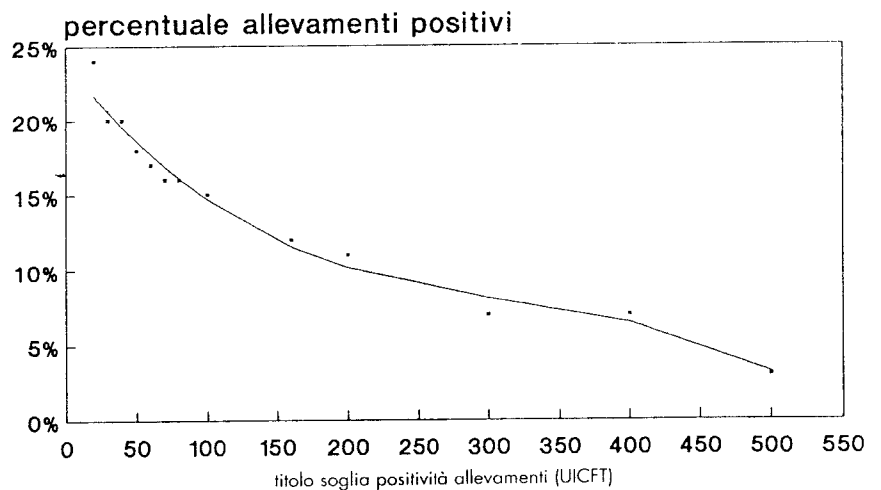
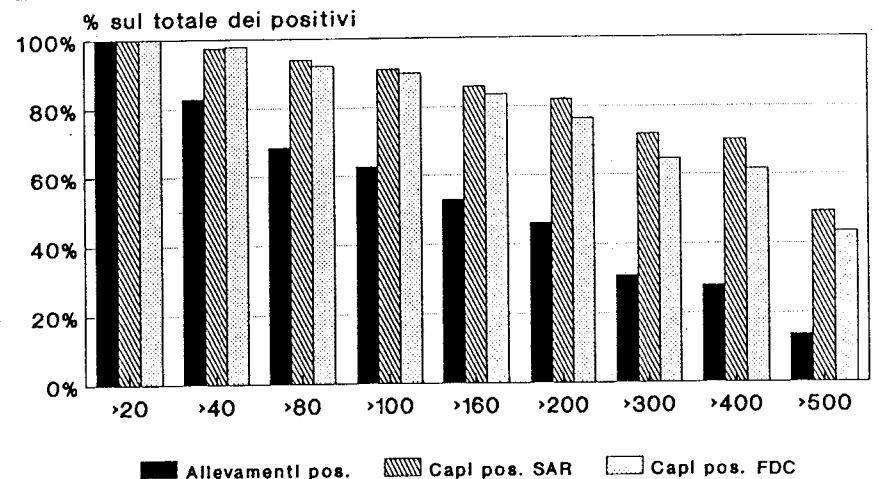


Figura 9: Percentuale di allevamenti e capi positivi, suddivisi per titolo massimo alla FDC riscontrato in allevamento.



fino a 39 m.p.v.

La persistenza di tali anticorpi negli animali vaccinati per via sottocutanea conferma quanto osservato da altri Autori su gruppi di animali numericamente più ridotti e seguiti per periodi di tempo inferiori [6, 7, 8, Alton citato da Fensterbank e coll. (7)].

La risposta anticorpale svelata dalla SAR mostra una cinetica diversa da quella che si rileva mediante FDC.

La prima reazione appare più sensibile della seconda e la differenza di età degli animali al momento della vaccinazione non sembra influenzare la prevalenza di positività sierologica post-vaccinale almeno fino a 18 m.p.v. Infatti la percentuale di positività negli animali vaccinati a 4-4 $\frac{1}{2}$ mesi (40,6%) 18 m.p.v. non è significativamente diversa da quella osservata negli animali vaccinati a 5-5 $\frac{1}{2}$ mesi 18 m.p.v. (41,9%).

La negatività, sia alla SAR che alla FDC in tutti gli animali prima della vaccinazione e successivamente in quelli non vaccinati e tenuti isolati da quelli vaccinati, dimostra che le due prove hanno livelli di specificità soddisfacente e sostanzialmente uguale; il che conferma quanto già constatato in precedenza da vari Autori (3, 5, 12).

La SAR mostra maggiore sensibilità della FDC, in accordo con quanto ripetutamente evidenziato in precedenti sperimentazioni da alcuni Autori (4, 5), ma in contrasto con le osservazioni di altri (7). Tale discrepanza può trovare spiegazione nel diverso grado di sensibilità degli antigeni utilizzati (12).

La maggiore sensibilità della SAR indica che per indagini di massa in popolazioni ovine l'uso di tale prova consente di ridurre le false negatività il che riveste una

particolare importanza soprattutto nelle greggi infette.

L'età di vaccinazione sembra avere influenza sulla persistenza in circolo degli anticorpi fissanti il complemento; infatti, negli animali vaccinati a 5-5 $\frac{1}{2}$ mesi tali anticorpi si ritrovano più a lungo che in quelli vaccinati a 4-4 $\frac{1}{2}$ mesi. La percentuale di questi ultimi con titoli ≥ 20 UICFT sia 12 che 18 m.p.v., è significativamente inferiore (6,8 e 3,1) rispetto a quella osservata nei primi (23,2 e 13,9). Dopo 39 mesi dalla vaccinazione il 5,4% degli animali vaccinati a 5-5 $\frac{1}{2}$ mesi è ancora sierologicamente positivo.

Mentre nei soggetti vaccinati a 4-4 $\frac{1}{2}$ mesi non si osservano anticorpi a titoli ≥ 50 UICFT né 12 né 18 m.p.v., in quelli vaccinati a 5-5 $\frac{1}{2}$ mesi di età, 13 e 18 m.p.v., si rilevano rispettivamente anticorpi a titoli compresi tra le 51 e le 100 UICFT nel 2,3% e nel 7% dei capi e anticorpi a titoli compresi tra le 101 e le 200 UICFT nel 4,7% e nel 2,3%.

Le positività sierologiche osservate negli animali non vaccinati potrebbero essere dovute al contatto con gli animali vaccinati. Tale ipotesi sembra confermare quanto riportato da Neeman nel 1966 (10), ma non confermato dallo stesso Autore l'anno successivo (11) sulla trasmissione del REV-1 da animali vaccinati ad animali recettivi. Le frequenze di positività rilevate negli animali non vaccinati tenuti a contatto con quelli vaccinati nei due gruppi sperimentali non differiscono in maniera statisticamente significativa (chi-quadrato, $P=0,13$), mentre negli animali non vaccinati tenuti isolati dai vaccinati non si è mai osservata alcuna positività sierologica.

La coincidenza tra il periodo dell'estro e l'incremento della prevalenza di positività sierologica osservato alla sola SAR negli ani-

mali del Gruppo Ia 6 m.p.v. rispetto a quella osservata negli stessi animali 5 m.p.v. potrebbe essere fenomeno casuale. Data, tuttavia, l'evidente influenza che la maturità sessuale ha sulla patogenesi della infezione brucellare negli ovini, un ulteriore approfondimento appare necessario anche per i possibili rilevanti effetti che il fenomeno potrebbe avere sul piano pratico, qualora dovesse non essere casuale.

Estrapolando la prevalenza di positività alla SAR e alla FDC osservata negli animali del gruppo vaccinato a 5-5 mesi, nella popolazione ovi-caprina italiana la prevalenza attesa di positività sierologica dovuta a code di vaccinazione è di circa il 4% alla SAR ed il 2% alla FDC.

I valori corrispondono ad una soglia di positività compresa tra 100 e 160 UICFT. Infatti, le frequenze di positività riscontrate nei sieri di campo sono state del 14,3% alla SAR e dell'8,5% alla FDC; se si escludono gli animali di allevamenti nei quali è presente almeno un capo positivo a titoli ≥ 100 UICFT i tassi di positività passano al 4,3% per la SAR e all'1,6% per la FDC, a valori cioè molto vicini al teorico atteso dalle prove sperimentali.

La variazione della percentuale di allevamenti positivi in relazione all'aumento del valore-soglia per considerare un gregge infetto, indica l'esistenza di due grandi gruppi di allevamenti, uno con presenza quasi esclusiva di animali con titoli bassi alla FDC (prima fase decrescente della curva di regressione), l'altro con presenza di animali con titoli elevati (seconda fase decrescente), mentre raramente il titolo massimo riscontrato in allevamento è compreso tra 150 e 400 UICFT (plateau). Il primo gruppo può rappresentare l'insieme degli allevamenti dove si riscontrano solo anticorpi vaccinali ed il secondo

quelli dove è presente l'infezione. Il punto di flesso (320 UICFT) al centro del plateau può essere considerato la soglia teorica per discriminare i due gruppi. Il rischio di infezione o di presenza di code di vaccinazione per gli allevamenti che si trovano sul plateau si equivalgono, quindi può essere più opportuno scegliere come valore-soglia l'inizio del plateau.

La leggera discrepanza tra queste due soglie (150 UICFT e 100-160 UICFT) potrebbe essere dovuta al fatto che gli animali di campo sono stati vaccinati fino a 7 mesi di età il che potrebbe aver favorito la persistenza di code anticorpali.

Appare pertanto evidente che nelle popolazioni di ovini vaccinati con REV-1 per via sottocutanea con almeno 2×10^9 UFC (e ancor più nelle popolazioni non vaccinate), la definizione dello stato di infezione dei singoli capi sulla scorta della sola positività alla FDC a titoli ≥ 20 UICFT comporta un duplice rischio:

a) nelle greggi vaccinate e non infette il tasso di false positività è mediamente pari ad almeno il 13,9% negli ovini esaminati 18 m.p.v. e ad almeno il 5,4% in quelli controllati 39 m.p.v. Data l'influenza che l'età degli animali al momento della vaccinazione esercita sulla persistenza degli anticorpi vaccinali, influenza confermata anche nel presente esperimento, tale rischio aumenta se gli animali sottoposti ad esame sono stati vaccinati in età superiore ai $5-5\frac{1}{2}$ mesi;

b) nelle greggi infette la FDC non consente l'individuazione di tutti gli animali venuti a contatto con le Brucelle. Tale rischio può ridursi sensibilmente mediante l'uso combinato della SAR e della FDC.

Una diminuzione dei due rischi è possibile se si distinguono le

greggi in infette e non infette.

La differenziazione tra le une e le altre, oltre che su base epidemiologica e clinica, può essere fatta sulla scorta delle sole prove sierologiche tenendo conto comunque della vaccinazione eseguita sugli animali che le compongono. Si dovrebbe allora considerare infetto un gregge in cui:

a) gli animali non siano stati vaccinati e si riscontri almeno un capo positivo alla SAR e/o alla FDC a titoli ≥ 20 UICFT;

b) gli animali siano stati vaccinati fino a 7 mesi di età e vi sia almeno un capo di età compresa tra 18 e 30 mesi con titolo ≥ 100 UICFT e/o almeno un capo di età ≥ 30 mesi con titolo ≥ 40 UICFT;

c) gli animali siano stati vaccinati fino a 5 mesi di età e vi sia almeno un capo di età compresa tra 18 e 30 mesi con titolo ≥ 50 UICFT e/o almeno un capo di età ≥ 30 mesi con titolo ≥ 20 UICFT.

Nelle greggi infette sono da considerare infetti tutti quei capi che reagiscono positivamente alla SAR o che presentano positività alla FDC a titoli ≥ 20 UICFT.

Bibliografia

- 1) Alton, G.G. 1985. Rev-1 and H38 Brucella melitensis vaccines, p. 215-227. In M. Plommet and J.M. Verger (eds.), *Brucella melitensis*. 1985. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht.
- 2) Alton, G.C., L.M. Jones, R.D. Angus and J.M. Verger. 1988. Techniques for the Brucellosis laboratory. ISBN:2-7380-0042-8. I.N.R.A., Paris.
- 3) Blasco, J.M., I. Moriyon, C. Marin and R. Diaz. 1985. Evaluation of a radial immunodiffusion test for differentiating infected from Rev-1 vaccinated sheep, p. 147. In M. Plommet and J.M. Verger (eds.), *Brucella melitensis*. 1985. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht.
- 4) Caporale, V.P., G. Semproni, T. Di Antonio and A. Pomanti. 1977. Prove comparative tra varie prove

sierologiche nella diagnosi della brucellosi bovina. Atti Soc. Ital. Sci. Vet. 31:790-792.

- 5) Caporale, V.P., D. Nannini, A. Di Matteo, C. Di Francesco, P. Nicolussi, O. Puglielli, G. Migliorati, N. Ferri e D. Giannobile. 1986. Esperienze di applicazione della tecnica ELISA nella diagnosi sierologica delle infezioni brucellari ovine. Atti del Sesto Congresso Nazionale della Società di Patologia e dell'Allevamento degli Ovini e dei Caprini. *Molise Economico* 12(1/5):135-146.
- 6) Fensterbank, R. 1985. Conjunctival Rev-1 vaccination. In: *Brucella melitensis*, p. 241-245. In M. Plommet and J.M. Verger (eds.), *Brucella melitensis*. 1985. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht.
- 7) Fensterbank, R., P. Pardon and J. Marly. 1985. Vaccination of ewes by a single conjunctival administration of *B. Melitensis* Rev-1 vaccine. *Ann. Rech. Vet.* 16:351-356.
- 8) Fensterbank, R., J.M. Verger and M. Grayon. 1987. Conjunctival vaccination of young goats with *B. Melitensis* strain Rev-1. *Ann. Rech. Vet.* 18:397-403.
- 9) Morgan Brinley, W.J. 1978. Brucellosis diagnosis standard laboratory techniques. 2nd ed., Central Veterinary Laboratory, Surrey, U.K.
- 10) Neeman, L. 1966. Citato da Alton, G.G., and S.S. Elberg. 1967. Rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine. A review of ten years of studies. *Vet. Bull.* 37:793-800.
- 11) Neeman, L. 1967. Citato da Alton, G.G., and S.S. Elberg. 1967. Rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine. A review of ten years of studies. *Vet. Bull.* 37:793-800.
- 12) Trap, D. et A.J.R. Gaumont. 1975. Le diagnostic sérologique de la brucellose bovine et ovine par l'épreuve à l'antigène tamponné. *Int. Symp. on Brucellosis, Rabat. Develop. Biol. Standard* 31:136-140.

Ricevuto per la pubblicazione: dicembre 1991.

VETERINARIA ITALIANA

RIVISTA DI SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA

