



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”**



Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie

**“Sierocaratterizzazione di 4 antigeni ricombinanti
per la diagnosi di febbre Q nei ruminanti”**

Coordinatore
Prof. Giuseppe
Cringoli

Candidato
Gianmarco Ferrara

Tutor
Prof. Serena
Montagnaro

Cotutor
Prof. Sergio Rosati

“Meravigliarsi di tutto è il primo passo della ragione verso la scoperta”

Louis Pasteur

Lista delle abbreviazioni	10	
Lista delle figure	12	
Lista delle tabelle	15	
Abstract	17	
Capitolo 1: Coxiella burnetti, un patogeno emergente e riemergente		
1.1	Storia	23
1.2	Eziologia	26
1.3	Caratteristiche di resistenza	31
1.4	Genomica	33
1.5	Bibliografia	36
Capitolo 2: La febbre Q negli animali domestici e nell'uomo		
2.1	Ospiti e trasmissione	41
2.2	La febbre Q come arma biologica	46
2.3	La febbre Q nel mondo	49
2.4	Il focolaio olandese	49
2.5	La situazione italiana	55
2.6	Fisiopatologia	57
2.7	Bibliografia	65
Capitolo 3: Dalla diagnosi alla profilassi		
3.1	Sintomatologia negli animali domestici	72
3.2	Sintomatologia nell'uomo	74
3.3	Diagnosi in veterinaria	76
3.4	Diagnosi nell'uomo	79
3.5	Limiti e problematiche della diagnostica sierologica	80
3.6	Profilassi	82
3.7	Terapia	87
3.8	Bibliografia	88

Capitolo 4: La produzione di antigeni ricombinanti e loro utilizzo in Medicina Veterinaria		
4.1	Gli antigeni ricombinanti	95
4.2	Principali proteine immunodominanti	99
4.3	Bibliografia	101
Capitolo 5: Scopo del lavoro		105
Capitolo 6: Materiali e metodi		
6.1	Selezione degli antigeni	109
6.2	Amplificazione	110
6.3	Digestione e ligasi	112
6.4	Transforming	113
6.5	Epressione in <i>E.coli</i>	113
6.6	Purificazione tramite cromatografia d'affinità	115
6.7	Spettrometria di massa	116
6.8	Western blot	117
6.9	Campionamento dei sieri esaminati	118
6.10	Elisa indiretto <i>in-house</i>	119
6.11	Elisa a doppio antigene	119
6.12	Kit Elisa commerciale	120
6.13	Questionario ed analisi statistica	121
Capitolo 7: Risultati		
7.1	Amplificazione e clonaggio delle sequenze di interesse	125
7.2	Transforming, produzione e purificazione degli antigeni	126
7.3	Spettrometria di massa	131
7.4	Western blot	133
7.5	Allestimento Elisa <i>in house</i> e confronto con Elisa commerciale	135
7.6	Valutazione della reattività vaccinale	147
7.7	Sieroprevalenza di <i>Coxiella burnetii</i> in regione Campania	148
Capitolo 8: Discussione		156

Ai miei genitori, ai miei fratelli e tutta la mia famiglia, che mi sono sempre stati vicino, anche quando ero lontano. Ai miei amici, per i momenti di svago e gli attimi di spensieratezza. Ai professori e ai colleghi che mi hanno accompagnato fin dai primi timidi passi in laboratorio, credendo sempre in me, nella speranza che non smettano mai di farlo. Ai visi nuovi entrati nel mio ristretto circolo di “cari”. Grazie infinite.

Il percorso del dottorato è ben più di un percorso di studio, bensì è un percorso di vita. E lo è ancora di più se girovaghi per due anni tra Slovacchia e Nord Italia, in parte durante una pandemia.

....”Se ho affrontato tutto ciò, posso affrontare qualsiasi cosa”...

Lista delle abbreviazioni

RMSF	Rocky Mountain Spotted Fever
LCV	Large Cell Variant
SCV	Small Cell Variant
SDC	Small Dense Cells
LPS	Lipopolisacarride
VIR	Virenosio
STREP	Streptosio
HEL	Human Embryonic Lung Fibroblast
VERO	African Green Monkey Epithelial Cells
L929	Mouse Fibroblast
DH82	Canine Macrophage Cells
XTC-2	South African Clawed Frog Epithelial Cells
ANKS	Anchirine
EFSA	European Food Safety Authority
ID50	Median Infective Dose
CDC	Center for Disease Control
OIE	Office International des Epizooties
Real time-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
MLVA	Multi-Locus Variable-number tandem-repeat Analysis
BTM	Bulk tank milk
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
PCR	Polymerase Chain Reaction
IFA	Immunofluoscence Assay
CR3	Complement Receptor 3
EEA1	Early Endosome Auto-antigen 1
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
HOPS	Homotypic Fusion and Protein Sorting
TNF	Tumor Necrosis Factor
IL-1	Interleuchina-1
CC	Chemochina
OMPA	Outer Membrane Protein A
PAG	Pregnancy Associated Glycoproteins
FDC	Fissazione del Complemento
DIVA	Differentiate Infected form Vaccinated Animals
EMA	European Medicines Agency
CHO	Chinese Hamster Ovary cells
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalattopiranoside
HSPB	Heat-Shock Protein B
NCBI	National Center for Biotechnology Information

Lista delle abbreviazioni

LB	Luria-Bertani
STE	Sodium-chloride Tris-EDTA
PBS	Phosphate Buffered Saline
GST	Glutathione S-Transferase
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
ACN	Acetonitrile
DTT	Ditiotreitolo
T-TBS	Tween Tris Buffered Saline
OD	Optical Density
HRP	Horseradish Peroxidase
TMB	3,3',5,5'- tetrametilbenzidina
IC	Intervallo di Confidenza
OR	Odds Ratio
SE	Errore Standard
AUC	Area Under Curve

- 1 Albero filogenetico sulla base del 16SRNA, 23 rRNA e delle sequenze Groel e DnaK (Eldin et al., 2017)
- 2 Particolare delle caratteristiche delle forme SCV e LCV (Coleman et al., 2007)
- 3 Profili lipopolisaccaridici delle diverse forme di *Coxiella burnetii* (Beare et al., 2018)
- 4 Cellule VERO a 4 giorni p.i. con fase II di *Coxiella burnetii* (Zamboni et al., 2002)
- 5 Colorazione Gimenez della fase I e II (Skultety et al., 2011)
- 6 Mappa fisica e genetica del cromosoma di *Coxiella burnetii* ceppo *Nine Mile* (Wilems et al., 1998)
- 7 Dendogramma dei diversi ceppi di *Coxiella burnetii* (NCBI)
- 8 Eliminazione di *Coxiella burnetii* nei diversi fluidi biologici (Maurin & Raoult; 1999)
- 9 Principali fonti di infezioni per l'uomo e gli animali (Madiaraga et al., 2003)
- 10 Gli effetti del rilascio di 50 kg di *Coxiella burnetii* (Madiaraga et al., 2003)
- 11 Focolai notificati in Olanda tra il 2007 e il 2008 (Roest et al., 2011)
- 12 Incidenza della febbre Q in Olanda e consistenza dell'allevamento ovicaprino (Roest et al., 2011)
- 13 Ingresso di *Coxiella burnetii* nella cellula ospite
- 14 Uptake di *Coxiella burnetii* espletato dalle cellule ospiti (Mertens et al., 2011)

- 15 Risposta anticorpale anti-fase I e II in animale infetti sperimentalmente (Roest et al., 2013)
- 16 Colorazione immunoistochimica di trofoblasti cotiledonari bovini infetti da *Coxiella burnetii*
- 17 Comparsa e decorso della risposta anti-fase I e II (Janowetz et al., 2017)
- 18 Rappresentazione schematica dell'espressione di geni in *E.coli* (Marin et al., 1995)
- 19 Facsimile del questionario adoperato per la raccolta dati
- 20 Visualizzazione delle bande attese in gel d'agarosio
- 21 Esempio di PCR da colonia
- 22 Differenze nel pattern di espressione proteica tra colture batteriche indotte e non
- 23 Analisi in SDS-page delle frazioni ottenute (Ybgf, Com1)
- 24 Analisi in SDS-page delle frazioni ottenute (OM, SucB)
- 25 Reattività in WB delle proteine Ybgf e Com1
- 26 Reattività in WB delle proteine OM e SucB
- 27 Grafico riassuntivo delle performances ottenute utilizzando i vari antigeni
- 28 Box-plot della distribuzione delle O.D. ottenute in rYbgf-ELISA negli ovicaprini
- 29 Box-plot della distribuzione delle O.D. ottenute in rYbgf-ELISA nei bovini

Lista delle figure

- 30 Box-plot della distribuzione delle O.D. ottenute in rYbgf-ELISA sul totale dei sieri esaminati
- 31 Curva ROC generata utilizzando i risultati ottenuti in rYbgf-ELISA
- 32 Andamento delle reattività di 10 sieri appartenenti ad animali vaccinati nei confronti degli antigeni di fase I, II e Ybgf

- 1 Tassonomia di *Coxiella burnetii*
- 2 Interventi e misure intraprese dalle autorità sanitarie olandesi (Roest et al., 2011)
- 3 Sintomi e reperti di laboratorio in corso di febbre Q nell'uomo (Maurin & Raoult; 1999)
- 4 Caratteristiche fisico-chimiche delle proteine candidate (Gerlach et al., 2017)
- 5 Caratteristiche dei primers utilizzati per l'amplificazione delle sequenze di interesse
- 6 Protocollo termico utilizzato per l'amplificazione dei geni di interesse
- 7 Ciclo termico utilizzato per la PCR da colonia
- 8 Quantizzazione in Bradford degli eluati ottenuti
- 9 Analisi in spettrometri di massa degli antigeni ricombinanti prodotti
- 10 Performances di rYbgf-ELISA
- 11 Performances di double rYbgf-ELISA
- 12 Performances di Com1-ELISA
- 13 Performances di rSucB-ELISA
- 14 Approfondimento delle performances di rYbgf-ELISA nelle varie specie di ruminanti
- 15 Tabella riassuntiva delle performances ottenute suddivise per antigene

- 16 Valori di K di Cohen suddivisi per antigene
- 17 Griglia di valutazione del valore di K proposta da d Landis e Koch
- 18 Tabella riassuntiva delle performances ottenuti in ELISA
- 20 Prevalenza di *Coxiella burnetii* in regione Campania
- 21 Analisi dei fattori di rischio

Coxiella burnetii is the causative agent of Q fever, a widespread zoonotic disease with considerable economic impact in livestock industry and public health. Domestic ruminants are the main reservoirs and the source of infection in human.

This zoonotic pathogen has also been considered a potential bioterrorism agent by Center for Disease Control (CDC) due to its very low infecting dose, its resistance in the environment and the ability to be spread by the wind.

Currently, serological diagnosis in ruminants is based on a combination of phase I and II antigens, leading to discordant results and misinterpretation, being not able to distinguish between acute or chronic infection and vaccination. Recombinant technology represents a valid option since immunodominant and stage-related proteins can be produced in large amount without the need of BSL3 laboratory. In this study 4 protein of *Coxiella* were expressed in *E. coli*, purified and characterized in Western Blot and ELISA. Data obtained suggests that Ybgf, a periplasmatic protein, is a promising marker of infection with potential application as DIVA test in cattle.

Subsequently, a total of 412 serum samples were randomly collected from dairy herds in Campania region and were assessed for the detection of specific IgG against *C. burnetii* by a commercial ELISA kit (Q fever *Coxiella burnetii* antibody test kit, IDEXX).

A total of 59 samples were positive to the assay and a seroprevalence of 14.3% (IC 95 10.6 – 17.7) was estimated.

Results obtained indicated an extensive circulation and an epidemiological situation comparable with other Italian regions.

A questionnaire was administered to each owner in order to investigate the potential main risk factors (mostly concerning farm management).

The variables were then applied to binary logistic models with the aim of find risk factors associated with the seroprevalence for Q fever. Statistical analyses were performed using MedCalc and logistic regression was performed using JMP version 14.1.0, considering significant $P < 0.05$.

The seroprevalences of *C. burnetii* do not differ between ages, farm size, presence of felines, use of antiparasite product for external use, manure management.

Several factors were, however, positively correlated with *Coxiella* seropositivity: type of flock, presence of other ruminant species, frequent animal introduction and anamnesis of reproductive disorders.

A higher prevalence, in addition, was found in Caserta province (18.75% IC 95 11.55 – 25.95) than Benevento province (8% IC 95 2.7 – 13.3). These results were in agreement with other studies described in literature which showed the influence of some risk factors on infection distribution.

Coxiella burnetii è l'agente causale della febbre Q, una zoonosi ampiamente diffusa a livello mondiale caratterizzata da considerevole impatto sull'economia zootecnica e sulla salute pubblica. I ruminanti domestici sono i principali serbatoi e la principale fonte di infezione per l'uomo.

Tale patogeno è considerato un agente di bioterrorismo dal Center for Disease Control (CDC) a causa della bassissima dose infettiva, della resistenza nell'ambiente esterno e della capacità di poter essere veicolato dal vento e altri agenti atmosferici.

Attualmente, la diagnosi sierologica nei ruminanti utilizza complesse combinazioni di antigeni di fase I e II e può condurre a risultati discordanti o difficili interpretazioni, non essendo in grado di distinguere le infezioni acute da quelle croniche e gli animali vaccinati.

In tal senso, la tecnologia ricombinante può rappresentare un valido approccio al fine di risolvere parte di tali problematiche, in quanto proteine immunodominanti e legate alla fase di infezione possono essere prodotte in grandi quantità, con costi ridotti e senza l'utilizzo di laboratori BSL3.

In questo studio 4 proteine di *Coxiella* sono state espresse in *E.coli*, purificate e caratterizzate in Western blot ed ELISA.

I dati ottenuti suggeriscono che Ybgf, una proteina periplasmatica, è un promettente marker di infezione con potenziale applicazione in protocolli DIVA.

Inoltre, un totale di 412 campioni di siero è stato prelevato da allevamenti di bovine da latte in regione Campania, allo scopo di rilevare specifiche IgG anti-*Coxiella* attraverso un kit ELISA commerciale (Q fever *Coxiella burnetii* antibody test kit, IDEXX).

Un totale di 59 campioni si sono rivelati positivi contribuendo al raggiungimento di una prevalenza del 14.3% (IC 95 10.6 – 17.7).

I risultati ottenuti indicano l'estensiva circolazione e una situazione epidemiologica simile a quella di altre Regioni italiane.

Sottoponendo a un questionario gli allevatori delle aziende oggetto di campionamento è stato possibile investigare sui principali fattori di rischio (concernenti principalmente la gestione aziendale) tramite l'applicazione di un modello logistico binario.

L'analisi statistica è stata effettuata con MedCalc e la regressione logistica con JMP version 14.1.0., considerando significativi valori di $P < 0.05$.

La sieroprevalenza di *C. burnetii* non differisce al variare dell'età, delle dimensioni dell'allevamento e in base alla presenza di felidi, all'utilizzo periodico di antiparassitari e alla gestione di reflui zootecnici.

Numerosi fattori risultano, invece, correlati positivamente con elevate sieropositività: tipo di allevamento, presenza di altri ruminanti in azienda, frequente introduzione di nuovi capi, anamnesi di disordini riproduttivi.

E' stata, inoltre, riscontrata una prevalenza significativamente più alta nella provincia di Caserta (18.75% IC 95 11.55 – 25.95) rispetto quella ottenuta in provincia di Benevento (8% IC 95 2.7 – 13.3).

I dati ottenuti risultano concordanti con quanto descritto in letteratura da studi che evidenziano l'influenza di alcuni fattori di rischio sulla distribuzione dell'infezione.

Capitolo 1

Coxiella burnetii: un patogeno emergente e riemergente

1.1 Storia

La febbre Q è stata descritta per la prima volta nel 1935 a Brisbane, Australia, da Edward H. Derrick, direttore del “Laboratory of Microbiology and Pathology of the Queensland Health Department”. Derrick fu incaricato di investigare su un focolaio di una strana forma febbrile che stava colpendo i lavoratori di un mattatoio: egli descrisse scrupolosamente i sintomi per la prima volta nella storia e tentò di isolare l’agente eziologico in animali da laboratorio, senza però riuscirci (Maurin & Raoult; 1999).

Per tale motivo ipotizzò che si trattasse di un virus e attribuì alla malattia la lettera “Q” probabilmente per “query” (malattia sconosciuta) o per “Queensland”, lo Stato in cui è stata descritta per la prima volta.

Nel 1937 altri due scienziati australiani, Burnet e Freeman, ricevettero del materiale infettante da Derrick e riuscirono a riprodurre l’infezione *in vivo*, dimostrando la presenza di organismi simili a *Rickettsia* nelle sezioni di milze degli animali sottoposti al trattamento.

Nel contempo (1935-1938) Davis e Cox, nel “Rocky Mountain Laboratory in Hamilton”, Montana (USA), indipendentemente dai lavori di Derrick, stavano effettuando degli studi circa la trasmissione della *Rocky Mountain Spotted Fever* (RMSF). A tale scopo riprodussero delle forme febbrili nei guinea pig utilizzando delle zecche campionate lungo il “Nine Mile” nel Montana (Maurin & Raoult; 1999).

I sintomi osservati in questi ultimi non erano però tipici di RMSF: ciò che incuriosiva i due scienziati era l’assenza di gonfiore testicolare, che solitamente accompagna tale infezione negli animali da laboratorio, nonché la trasmissibilità dell’agente ad altri animali tramite inoculo intraperitoneale di sangue infetto, evenienza che non si verifica nel caso di batteri appartenenti al genere *Rickettsia*.

Cox e Davis, quindi, supposero di aver individuato un nuovo batterio, e lo denominarono “Nine Mile Agent”. Tra il gruppo di ricerca americano e quello australiano si instaurò un legame solo nel 1938, quando Cox riuscì a propagare l’agente in uova embrionate di pollo. L’anello di connessione fu Rolla Eugene Dyer, direttore del “National Institutes of Health”, che visitò i laboratori di Hamilton per apprendere le tecniche di crescita del “*Nine Mile agent*”. Egli si infettò inavvertitamente frequentando il laboratorio e, quando tornò in Australia, il suo sangue fu inoculato in guinea pig, riproducendo una forma febbrile. Dalle milze degli animali infetti fu, inoltre, possibile individuare le “*Rickettsia*”, e fu dimostrata una cross-immunità tra il

microorganismo isolato dal sangue di Dyer e l'agente della Q Fever (Maurin & Raoult; 1999).

I due gruppi proseguirono a scambiarsi attivamente informazioni e materiale, fino a dimostrare, grazie a esperimenti di *challenge* e sieroreattività crociata, che l'agente della "Q Fever" e il "Nine mile agent", in realtà coincidevano.

L'agente fu originariamente denominato *Rickettsia burnetii*, ma qualche anno dopo, nel 1948, Cornelius B. Philip dimostrò le differenze filogenetiche tra tale agente e le altre *Rickettsie* (basate sullo studio del 16S r-cRNA), proponendo la creazione di un nuovo genere, "*Coxiella*", rinominando così l'agente *C. burnetii*, in onore di Cox e Burnet. Nel corso degli anni è stata descritta praticamente in tutto il mondo, rendendosi responsabile di infezioni e manifestazioni a carattere endemico negli animali domestici e selvatici, con sporadici focolai ad andamento epidemico anche nell'uomo (Maurin & Raoult; 1999).

I radicali cambiamenti dell'allevamento dei ruminanti degli ultimi decenni e l'orientamento di questi ultimi verso un sistema di tipo intensivo, hanno certamente contribuito alla diffusione della malattia e, al tempo stesso, all'aumento dell'interesse nei suoi confronti (Eldin et al., 2017).

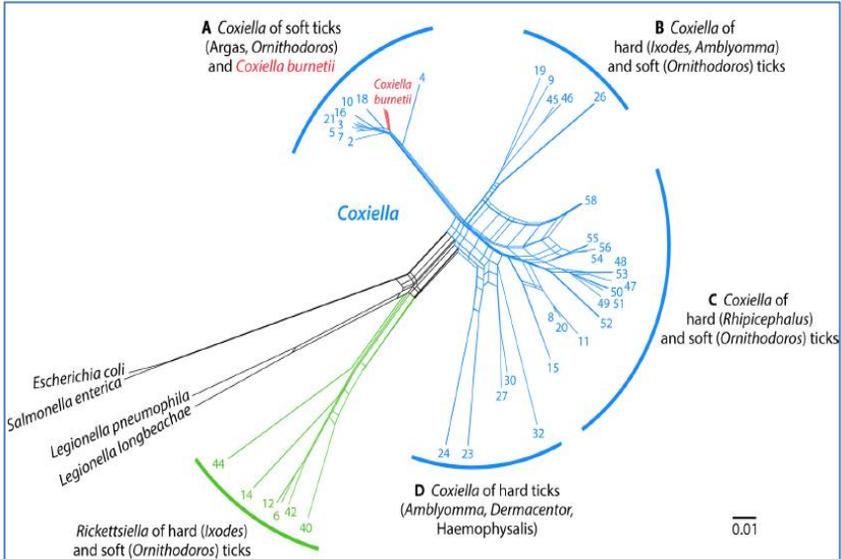


Fig. 1 Albero filogenetico sulla base del 16S rRNA, 23S rRNA e delle sequenze groEl e dnaK includendo 15 ceppi di referenza e 71 organismi coxiella-like isolati in artropodi vettori (Eldin et al., 2017).

1.2 Eziologia

Coxiella burnetii, appartenente all'ordine *Legionellales* e alla famiglia *Coxiellaceae*, è l'agente causale della febbre Q. Questo piccolo (0.3-1 µm), immobile e pleiomorfo batterio intracellulare è ampiamente diffuso in tutto il mondo, ed è considerato un Gram negativo poiché, a causa delle caratteristiche della propria parete cellulare, non è colorabile con la tecnica di Gram (difatti le colorazioni storicamente utilizzate per evidenziare questo patogeno sono la Gimenez e la Giemsa) (Maurin & Raoult; 1999).

Tab. 1 Tassonomia di *Coxiella burnetii*

Regno	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Classe	Gammaproteobacteria
Ordine	Legionellales
Famiglia	Coxiellaceae
Genere	Coxiella
Specie	<i>Coxiella burnetii</i>

Il batterio è presente in natura in diverse forme, le quali mostrano differenze morfologiche, antigeniche e metaboliche: *large-cell variants* (LCV), *small cell variants* (SCV), and *small dense cells* (SDC).

LCV e SCV rappresentano le forme correlate all'ospite (ovvero due diversi stadi intracellulari e/o extracellulari) mentre SDC è considerata una forma esterna all'ospite di tipo simil-sporale, estremamente resistente nell'ambiente esterno (secondo alcuni autori le forme SCV e SDC sembrerebbero completamente sovrapponibili, fatta eccezione per la localizzazione) (Rodolakis; 2011).

Nello specifico, SCV è di piccole dimensioni (0.2 to 0.5 µm), stazionaria, sia intra- che extra- cellulare, scarsamente replicativa, in quanto metabolicamente inattiva e molto resistente alla pressione osmotica.

SCV è l'entità con cui il batterio avvia l'infezione naturale, attaccandosi alla membrana cellulare dei fagociti.

In seguito alla fusione del fagolisosoma si ha una "attivazione acida" del metabolismo, per cui dalle SCV si differenziano le LCV.

Queste ultime sono di dimensioni maggiori ($> 0,5 \mu\text{m}$), esclusivamente intracellulari ed esponenzialmente replicanti (metabolicamente attive).

Entrambe le forme si dividono tramite scissione binaria (il tempo necessario al raddoppio è compreso tra le 12-20 h) (Zamboni et al., 2002).

Le forme LCV si replicano in modo esponenziale per 4-6 giorni, per poi entrare in fase stazionaria, che coincide con la ricomparsa delle SCV (Rodolakis; 2011).

L'analisi proteomica e la caratterizzazione delle diverse proteine suggerisce che SCV esprime numerosi peptidi coinvolti nel meccanismo di immunoevasione, mentre LCV esprime quantità notevoli di proteine che rientrano nel processo di divisione cellulare e di sopravvivenza all'interno della cellula ospite (Dragan et al., 2020).

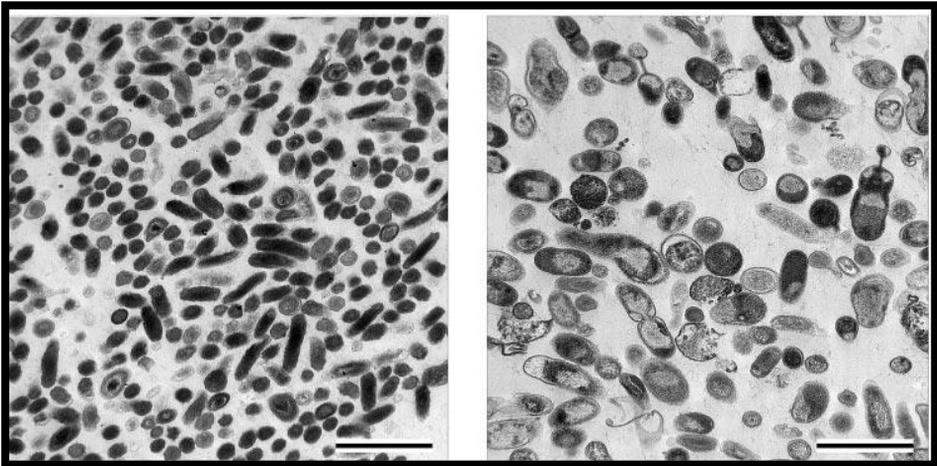


Fig. 2 Particolare delle caratteristiche fisiche delle forme SCV (sinistra) e LCV (destra) al microscopio elettronico a trasmissione. (Coleman et al., 2007).

Le forme simil-sporali differiscono dalle classiche spore tipiche dei batteri Gram-positivi. In particolare, compattano il DNA in una proteina *histone-like*, molto simile all'istone Hc 1 con cui i corpi elementari di batteri appartenenti al genere *Chlamydia* compattano il proprio materiale genetico. Inoltre, sono prive del rivestimento di acido dipicolinico e di cisteina tipico delle spore dei Gram-positivi (Madiaraga et al., 2003).

Tali forme sono in grado di resistere all'ambiente esterno e in alimenti contaminati per lunghi periodi, grazie alla tolleranza agli agenti fisici.

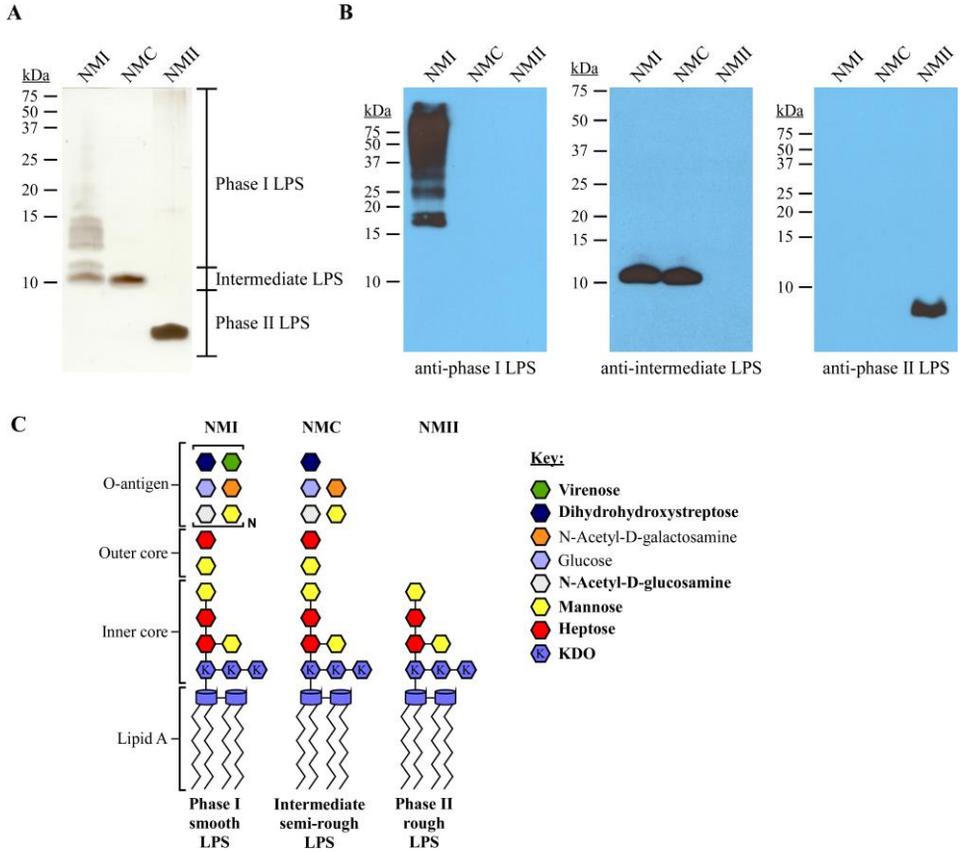


Fig. 3 Profili lipopolisaccaridici tra diverse forme di *C. burnetii*: A) LPS estratto, sottoposto a corsa elettroforetica e colorato con silver staining (NMI RSA493, NMC RSA514, and NMII RSA439). B) LPS trasferito su membrana di nitrocellulosa e incubato con anticorpi specifici per la fase I, intermediario e per la fase II. C) Strutturachimica del lipopolisaccaride. (Beare et al., 2018).

La fase I di *Coxiella burnetii* esprime 235 proteine, mentre la fase II ne esprime 215. In particolare, 78 sono specifiche per la fase I, 56 sono esclusive della fase II e 157 proteine sono comuni alle due fasi. Tali differenze nella composizione possono risultare estremamente utili per l'allestimento di test diagnostici "di fase", dal momento che la risposta immunitaria è indirizzata ad antigeni differenti durante i diversi stadi dell'infezione (Skultety et al., 2011).

La fase I contiene dei carboidrati esclusivi di *Coxiella* e non riscontrabili in nessun altro microorganismo in natura, che sono stati studiati e identificati nel dettaglio.

Tra questi riscontriamo il 3-C(hydroxymethyl)-l-lyxofuranose, conosciuto anche come diidrossi-streptosio (Strep), e il 6-deoxy-3-methyl-d-gulopyranose, conosciuto anche come virenosio (Vir). Il Vir è un marker unico dei ceppi in fase I, mentre viene completamente perso nella fase II (Abnave et al., 2017).

C. burnetii viene coltivata in laboratori con requisiti di biosicurezza di classe 3, e ciò può avvenire con l'utilizzo di uova embrionate di pollo, di colture cellulari e, recentemente, anche di speciali terreni "axenici".

La propagazione su uova embrionate di pollo, va effettuata inoculando sospensioni contenenti il microorganismo in uova al settimo giorno di incubazione, mentre la raccolta dei sacchi vitellini avviene a partire dal sesto giorno post inoculo (Schmatz et al., 1976).

Le linee cellulari utilizzate per la propagazione del batterio sono le *Human embryonic lung fibroblast* (HEL), *African green monkey epithelial cells* (Vero), *Mouse fibroblast* (L929), *Canine macrophage cells* (DH82), *South African clawed frog epithelial cells* (XTC-2), in cui provoca la formazione di grossi vacuoli intracellulari 3-4 giorni post infezione (Maurin & Raoult; 1999).

La crescita in terreni axenici rappresenta, invece, un recente metodo completamente *host-free*, in cui si mimano le condizioni fisico-chimiche del fagolisosoma, ideali per la crescita di *Coxiella*. Trattasi, infatti, di terreni acidificati (pH 4.5) e arricchiti di numerosi aminoacidi e minerali, in cui è possibile coltivare il microorganismo puro in *flask*, solitamente sature dopo 12 giorni di coltura (Sanchez et al., 2018).

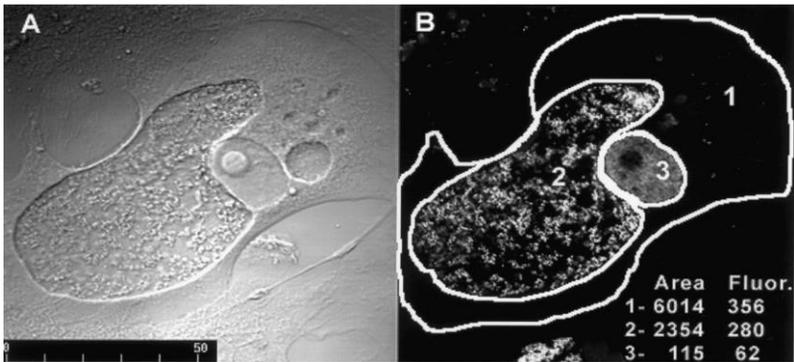


Fig.4 Cellule Vero infettate da 4 giorni con *C. burnetii* fase II. A) microscopia a contrasto di interferenza differenziale B) microscopia a fluorescenza. 1) profili cellulari 2) vacuolo parassitofo 3) nucleo (Zamboni et al., 2002).

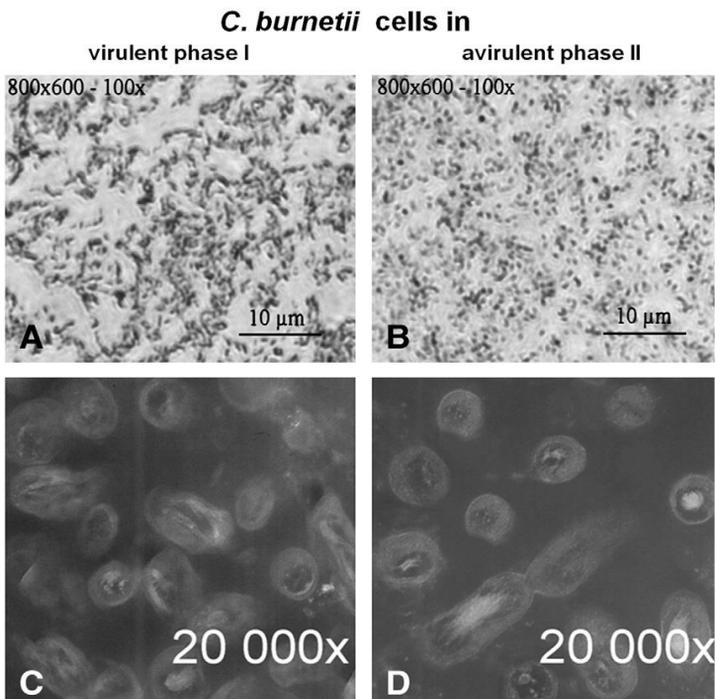


Fig. 5 *C. burnetii* fase I (A) e fase II (B), colorazione Gimenez. Elettromicroscopia a trasmissione di fase I (C) e II (D) (Skultety et al., 2011).

1.3 Caratteristiche di resistenza:

Coxiella burnetii è un batterio dotato di considerevole resistenza ambientale, anche se non comparabile a quella delle spore di germi appartenenti al genere *Bacillus* o *Clostridium*, e deve queste caratteristiche alle forme SDC, che in condizioni favorevoli possono permanere vitali e infettanti per più di 40 mesi (Gürtler et al., 2014).

Tali forme sono in grado di resistere nell'ambiente esterno e in alimenti contaminati per lunghi periodi, grazie alla tolleranza agli agenti fisici e a quelli chimici. Presentano, infatti, stabilità a variazioni di pH (resistono a valori di pH 4.5), temperatura (62 °C per 30 minuti), raggi UV, pressione (oltre 300.000 kPa), pressione osmotica, stress ossidativo, essiccamento (EFSA; 2010) e presentano resistenza a disinfettanti scarsamente diluiti, come l'ipoclorito di sodio allo 0.5%.

Nonostante siano sensibili alla formaldeide al 2%, è possibile isolare il batterio da tessuti conservati in formaldeide o in paraffina da più di 4 mesi (Angelakis & Raoult; 2010). La formaldeide gassosa sembrerebbe invece completamente inefficace nell'inattivazione (Gürtler et al., 2014).

Il batterio è resistente per 7-10 mesi nella lana a temperature di 15-20°C, per più di un mese nella carne a 4°C (Gürtler et al., 2014), nel suolo in condizioni sperimentali resiste per più di venti giorni (Evstigneeva et al., 2005), diversi mesi nel latte a 4°C, circa 30 giorni nelle urine, diversi mesi nel sangue rappreso (EFSA., 2010). Durante numerosi focolai è stato possibile isolare il patogeno da varie matrici ambientali, quali polvere (che sembrerebbe detenere le cariche batteriche più elevate), aria e terreno (Abeykoon et al., 2021).

Il ruolo del letame è stato, invece, lungamente dibattuto (Berri et al., 2003). Difatti si sospetta che il letame rappresenti la principale sorgente di infezione in numerosi focolai come, ad esempio, nel focolaio olandese verificatosi tra il 2007 e il 2010, in cui fu vietato lo spandimento del letame nei 30 giorni successivi la stagione delle nascite e furono resi obbligatori dei trattamenti speciali prima dell'utilizzo (van den Brom et al., 2015).

Il letame, infatti, non contiene solo le deiezioni degli animali, ma anche eventuali invogli fetali relativi ad aborti, quindi può contenere un gran numero di microorganismi infettanti.

In uno studio Arricau-Bouvery and Rodolakis (2005) suggeriscono il trattamento del letame con calce viva o cianamide di calcio allo 0.4%, oppure lo stoccaggio e il compostaggio prima di essere sparso sui terreni. Un altro studio, invece, evidenzia il fallimento nel tentativo di isolare il

microorganismo a partire dal letame, a fronte di imponenti quantitativi di DNA riscontrati negli stessi, suggerendo un ruolo marginale di quest'ultimo nella diffusione dell'infezione (van den Brom et al., 2015). La completa inattivazione avviene in cloroformio al 5%, acqua ossigenata al 5%, ipoclorito di sodio superiore allo 0.5%, etanolo al 70%, fenolo 1%. Per tutti i disinfettanti elencati sono necessari più di 30 minuti di esposizione (Maurin & Raoult; 1999). *Coxiella burnetii* è, inoltre, sensibile alle radiazioni gamma (10kGy) (Gürtler et al., 2014) e risulta spiccatamente sensibile alla pastorizzazione (almeno 72°C per 40 secondi) (Angelakis & Raoult; 2010). Anche la sterilizzazione a 131°C per 15 minuti inattiva completamente il microorganismo (Gürtler et al., 2014).

Il riscontro del batterio nel latte crea una problematica di sanità pubblica anche se le comuni procedure di pastorizzazione sono sufficienti a rendere innocue eventuali Coxielle escrete per via mammaria che, difatti, non risultano più resistenti dei Mycobatteri tubercolari.

E' stato ampiamente dimostrato che l'assunzione di latte contaminato generi sieroconversione nel consumatore, mentre vi sono ancora dubbi sull'effettivo rischio di contrarre l'infezione in forma clinica. Per questo motivo l'eliminazione di questo patogeno tramite la pastorizzazione rappresenta un semplice esempio di applicazione del principio di precauzione (Cerf & Condron; 2006).

Diversi studi in letteratura hanno evidenziato la presenza del microorganismo in latte crudo o in prodotti caseari e derivati a base di latte crudo. Ad esempio Abdali *et al* (2018) hanno individuato il DNA di *Coxiella burnetii* nel 8.4% dei campioni di latte crudo, nel 6.25% nei campioni di yogurt e nel 4.33% dei formaggi esaminati.

Barandika et al (2019), con un approccio simile, hanno evidenziato la presenza del DNA in 20 su 67 formaggi tradizionali testati, ottenuti a partire da latte crudo. In alcuni formaggi è stato possibile dimostrare la vitalità e l'infettività di *Coxiella* tramite esposizione sperimentale in animali da laboratorio e isolamento in colture cellulari. Tale studio ha stabilito la resistenza del patogeno nei formaggi fino a 8 mesi, specie se in condizioni di acidità e activity water ottimali.

Anche in Italia sono stati effettuati studi con approcci simili: in Piemonte è stata dimostrata la presenza del DNA del microorganismo nel latte crudo venduto presso distributori automatici aziendali in ben 49 allevamenti (Gallina et al., 2009).

Uno studio di prevalenza di *C. burnetii* in campioni di formaggio ha evidenziato delle percentuali pari a 40,4 %, con una maggiore positività per

i formaggi a base di latte bovino (75%) imputabile alla prolungata eliminazione nel latte che caratterizza questa specie (supera i 4 mesi) (Proroga et al., 2011).

Nonostante tutte queste prerogative non esistono, ad oggi, requisiti normativi che impongono la ricerca di *Coxiella* nel latte e in altre matrici alimentari.

1.4 Genomica

Le dimensioni del genoma di *C. burnetii* sono piuttosto variabili a seconda del ceppo preso in considerazione (da circa 1.5 Mb a 2.4 Mb), ad esempio il genoma di *C. burnetii* ceppo *Nine Mile* è di 2.1 Mb.

Il primo sequenziamento è avvenuto piuttosto recentemente, nel 2003 (Seshadri et al., 2003).

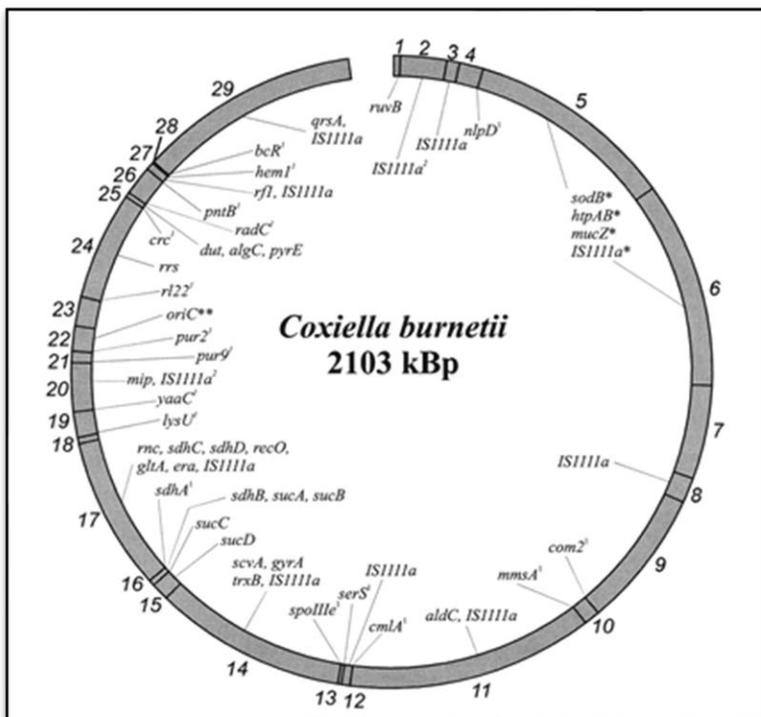


Fig. 6 Mappa fisica e genetica del cromosoma di *C. burnetii* *Nine Mile* (Willems et al., 1998).

Studi di genomica, e in particolare di genomica comparativa, hanno dimostrato come l'appartenenza a un diverso ceppo, e quindi a un determinato pattern genomico, possa influenzare la patogenicità e la virulenza di *Coxiella* (Eldin et al., 2017).

Il ceppo *RSA 493*, isolato da zecca per la prima volta nel 1935, è stato il primo ceppo ad essere sequenziato. Esso presenta un plasmide QpH1 (37.393 bp) e un cromosoma di 1.995.275 bp (Eldin et al., 2017).

Comparando il genoma con quello di microorganismi relativamente simili, come *Legionella*, *Chlamydia* e *Rickettsia*, si riscontrano delle particolarità. Esso possiede 719 ipotetiche sequenze codificanti, completamente assenti in altri gammaproteobatteri. Inoltre, presenta 83 pseudogeni, a dimostrazione del fatto che il microorganismo ha adottato, nel corso della propria evoluzione, dei meccanismi per ridurre il proprio genoma. Si osservano, inoltre, 29 sequenze di inserzione, a testimonianza dell'alta plasticità genomica del batterio (Eldin et al., 2017).

Riguardo il metabolismo, il genoma esprime per un gran numero di trasportatori, condizione che si configura con la vita intracellulare del batterio e la necessità di ricercare i nutrienti organici all'interno della cellula eucariotica. Per gli stessi motivi sono presenti numerosi scambiatori ionici, i quali conservano un ruolo fondamentale nella sopravvivenza del batterio all'interno del vacuolo parassitoforo per l'eliminazione di sostanze di scarto. In comparazione con gli altri batteri intracellulari, il metabolismo centrale del carbonio e le vie bioenergetiche sono, sostanzialmente, conservate (Eldin et al., 2017).

Alcuni i geni possiedono alti gradi di omologia con geni di cellule eucariote, riscontrati anche in *Legionella* e senza equivalenti nel mondo microbico, come ad esempio quelli relativi alla famiglia di “*ankyrin repeatcontaining proteins*” (Anks), mediatori di interazioni proteiche e importanti in numerosi processi intracellulari (Eldin et al., 2017).

Dal 2003, 6 nuovi interi genomi sono stati depositati su GenBank.

Più recentemente D'Amato *et al.*, ha effettuato un'analisi pangenomica di 7 ceppi il cui genoma era già stato sequenziato, ottenendo un rapporto genoma/pangenoma del 96%. Un totale di 13.542 geni è condiviso da tutti i ceppi: 498 sono geni accessori (riscontrati solo in alcuni ceppi) e 88 geni risultano unici (trovati in singoli ceppi). Dunque, i ceppi di *C. burnetii* hanno una somiglianza genomica elevata, con simili pangenomi, ma sono presenti numerose particolarità che possono anche riflettere sulla virulenza. (D'Amato et al., 2016).

Carrie M Long *et al* (2019), hanno investigato sul potenziale patogenetico delle variazioni genetiche di differenti ceppi in vivo, utilizzando guinea pig come modello.

I ceppi NMI and *Ohio* causavano le infezioni più severe, con comparsa di febbre al giorno 3 nel 75% degli animali infetti, perdita di peso, splenomegalia e con considerevole risposta IgG specifica anti-*Coxiella*. (Long *et al.*, 2019).

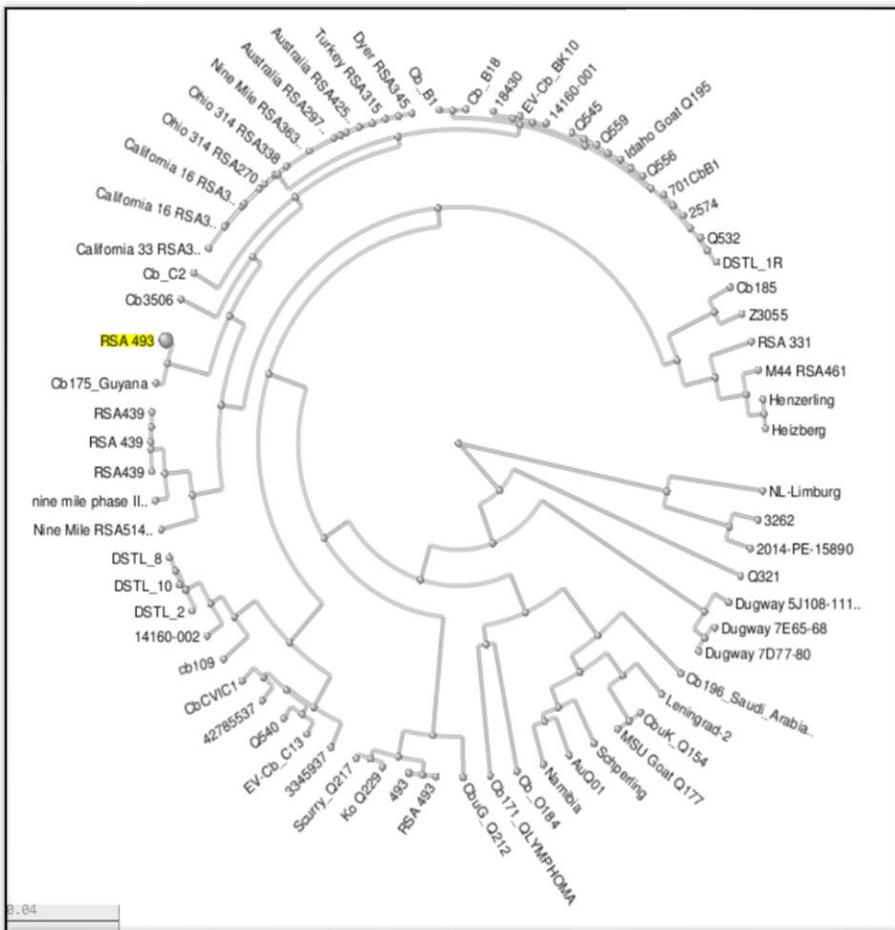


Fig. 7 Dendrogramma dei diversi ceppi di *Coxiella burnetii* (fonte NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=coxiella+burnetii>)

- Abdali F, Hosseinzadeh S, Berizi E, Shams S. Prevalence of *Coxiella burnetii* in unpasteurized dairy products using nested PCR assay. *Iran J Microbiol.* 2018 Aug;10(4):220-226. PMID: 30483373; PMCID: PMC6243153.
- Abeykoon A, Clark N, Soares Magalhaes R, Vincent G, Stevenson M, Firestone S, Wiethoelter A. *Coxiella burnetii* in the environment: A systematic review and critical appraisal of sampling methods. *Zoonoses and Public Health.* 2020; 68(3): 165-181. doi:10.1111/zph.12791
- Abnave P, Muracciole X, Ghigo E. *Coxiella burnetii* Lipopolysaccharide: What Do We Know? *Int J Mol Sci.* 2017 Nov 23;18(12):2509. doi: 10.3390/ijms18122509. PMID: 29168790; PMCID: PMC5751112.
- Angelakis E, Raoult D. Q Fever. *Vet Microbiol.* 2010 Jan 27;140(3-4):297-309. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.07.016. Epub 2009 Aug 8. PMID: 19875249.
- Barandika JF, Alvarez-Alonso R, Jado I, Hurtado A, García-Pérez AL. Viable *Coxiella burnetii* in hard cheeses made with unpasteurized milk. *Int J Food Microbiol.* 2019 Aug 16;303:42-45. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.010. Epub 2019 May 18. PMID: 31132730.
- Bearé PA, Jeffrey BM, Long CM, Martens CM, Heinzen RA. Genetic mechanisms of *Coxiella burnetii* lipopolysaccharide phase variation. *PLoS Pathog.* 2018 Feb 26;14(3):e1006922. doi: 10.1371/journal.ppat.1006922. PMID: 29481553; PMCID: PMC5843353.
- Berri M, Rousset E, Champion JL, Arricau-Bouvery N, Russo P, Pepin M, Rodolakis A. Ovine manure used as a garden fertiliser as a suspected source of human Q fever. *Vet Rec.* 2003 Aug 30;153(9):269-70. doi: 10.1136/vr.153.9.269. PMID: 12974339.
- Cerf O, Condrón R. *Coxiella burnetii* and milk pasteurization: an early application of the precautionary principle? *Epidemiol Infect.* 2006 Oct;134(5):946-51. doi: 10.1017/S0950268806005978. Epub 2006 Feb 22. PMID: 16492321; PMCID: PMC2870484.
- Coleman SA, Fischer ER, Cockrell DC, Voth DE, Howe D, Mead DJ, Samuel JE, Heinzen RA. Proteome and antigen profiling of *Coxiella burnetii* developmental forms. *Infect Immun.* 2007 Jan;75(1):290-8. doi: 10.1128/IAI.00883-06. Epub 2006 Nov 6. PMID: 17088354; PMCID: PMC1828411.

- D'Amato F, Eldin C, Raoult D. The contribution of genomics to the study of Q fever. *Future Microbiol.* 2016;11(2):253-72. doi: 10.2217/fmb.15.137. Epub 2016 Feb 8. PMID: 26854360.
- Dragan AL, Voth DE. *Coxiella burnetii*: international pathogen of mystery. *Microbes Infect.* 2020 Apr;22(3):100-110. doi: 10.1016/j.micinf.2019.09.001. Epub 2019 Sep 28. PMID: 31574310; PMCID: PMC7101257.
- EFSA, 2010. Panel on animal health and welfare (AHAW), scientific opinion on Q fever. *EFSA J.* 8 (5), 1595
- Eldin C, Mélenotte C, Mediannikov O, Ghigo E, Million M, Edouard S, Mege JL, Maurin M, Raoult D. From Q Fever to *Coxiella burnetii* Infection: a Paradigm Change. *Clin Microbiol Rev.* 2017 Jan;30(1):115-190. doi: 10.1128/CMR.00045-16. PMID: 27856520; PMCID: PMC5217791.
- Evstigneeva AS, Komarova AI, Fetisova NF, Makarova VA, Tarasevich IV. [Survival of *Coxiella burnetii* in soil]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2005 Nov-Dec;(6):57-9. Russian. PMID: 16438377.
- Gallina, S., D. Bianchi, E. Fontana, M. Gennero, A. Dalmaso, T. Civera, M. Bottero, and L. Decastelli. "Raw milk at vending machines: evaluation of *E. Sakazakii*, *Coxiella burnetii* and *M. Paratuberculosis* in Piedmont experience. *Italian Journal of Food Safety*, Vol. 1, no. 6, Dec. 2009, pp. 53-56, doi:10.4081/ijfs.2009.1123.
- Gürtler L, Bauerfeind U, Blümel J, Burger R, Drost C, Gröner A, Heiden M, Hildebrandt M, Jansen B, Offergeld R, Pauli G, Seitz R, Schlenkrich U, Schottstedt V, Strobel J, Willkommen H. *Coxiella burnetii* - Pathogenic Agent of Q (Query) Fever. *Transfus Med Hemother.* 2014 Feb;41(1):60-72. doi: 10.1159/000357107. Epub 2013 Dec 23. PMID: 24659949; PMCID: PMC3949614.
- Long CM, Beare PA, Cockrell DC, Larson CL, Heinzen RA. Comparative virulence of diverse *Coxiella burnetii* strains. *Virulence.* 2019 Dec;10(1):133-150. doi: 10.1080/21505594.2019.1575715. PMID: 30782062; PMCID: PMC6389282.
- Madariaga MG, Rezai K, Trenholme GM, Weinstein RA. Q fever: a biological weapon in your backyard. *Lancet Infect Dis.* 2003 Nov;3(11):709-21. doi: 10.1016/s1473-3099(03)00804-1. PMID: 14592601.
- Maurin M, Raoult D. Q fever. *Clin Microbiol Rev.* 1999 Oct;12(4):518-53. PMID: 10515901; PMCID: PMC88923.

- Sanchez SE, Vallejo-Esquerria E, Omsland A. Use of Axenic Culture Tools to Study *Coxiella burnetii*. *Curr Protoc Microbiol*. 2018 Aug;50(1):e52. doi: 10.1002/cpmc.52. Epub 2018 May 18. PMID: 29927105.
- Schmatz HD, Schmatz S, Krauss H. Der Einfluss der Inokulationsdosis auf die Gewinnung von *Coxiella burnetii*-Antigenen aus dem Dottersack embryonierter Hühnereier [The influence of inoculation dose on the production of *Coxiella burnetii* antigen in the yolk sac of embryonated chicken eggs]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 1976 Mar 15;89(6):120-2. German. PMID: 1259698.
- Seshadri R, Paulsen IT, Eisen JA, Read TD, Nelson KE, Nelson WC, Ward NL, Tettelin H, Davidsen TM, Beanan MJ, Deboy RT, Daugherty SC, Brinkac LM, Madupu R, Dodson RJ, Khouri HM, Lee KH, Carty HA, Scanlan D, Heinzen RA, Thompson HA, Samuel JE, Fraser CM, Heidelberg JF. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 29;100(9):5455-60. doi: 10.1073/pnas.0931379100. Epub 2003 Apr 18. PMID: 12704232; PMCID: PMC154366.
- Skultety L, Hajduch M, Flores-Ramirez G, Miernyk JA, Ciampor F, Toman R, Sekeyova Z. Proteomic comparison of virulent phase I and avirulent phase II of *Coxiella burnetii*, the causative agent of Q fever. *J Proteomics*. 2011 Sep 6;74(10):1974-84. doi: 10.1016/j.jprot.2011.05.017. Epub 2011 May 15. PMID: 21616182.
- van den Brom R, Roest HJ, de Bruin A, Dercksen D, Santman-Berends I, van der Hoek W, Dinkla A, Vellema J, Vellema P. A probably minor role for land-applied goat manure in the transmission of *Coxiella burnetii* to humans in the 2007-2010 Dutch Q fever outbreak. *PLoS One*. 2015 Mar 27;10(3):e0121355. doi: 10.1371/journal.pone.0121355. PMID: 25816149; PMCID: PMC4376525.
- Willems H, Jäger C, Baljer G. Physical and genetic map of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *J Bacteriol*. 1998 Aug;180(15):3816-22. doi: 10.1128/JB.180.15.3816-3822.1998. PMID: 9683477; PMCID: PMC107364.
- Zamboni DS, Mortara RA, Freymuller E, Rabinovitch M. Mouse resident peritoneal macrophages partially control in vitro infection with *Coxiella burnetii* phase II. *Microbes Infect*. 2002 May;4(6):591-8. doi: 10.1016/s1286-4579(02)01577-0. PMID: 12048028.

Capitolo 2

La febbre Q negli animali domestici e nell'uomo

2.1 Ospiti e trasmissione

Coxiella burnetii può infettare una grande varietà di ospiti, come bovini, ovini, caprini, carnivori domestici (gatto, cane ecc.), uomo, primati, roditori, mammiferi selvatici (sia ruminanti che non), rettili, anfibi, uccelli, pesci e artropodi (più di 40 specie di zecche).

Tale patogeno è stato identificato virtualmente in tutti i regni animali. (Babudieri; 1959), ed è stato possibile riscontrare la sua presenza persino nelle amebe, in cui è in grado di resistere per 6 settimane (Marin & Raoult; 1999).

Nella vastità di ospiti elencati i ruminanti domestici assumono grande rilevanza, sia per i danni economici che l'infezione provoca in maniera diretta, che per le problematiche di sanità pubblica derivanti dalla presenza del patogeno in allevamento. In particolare, gli ovicaprini sono considerati i principali serbatoi di infezione per l'uomo, in quanto i focolai che coinvolgono la popolazione umana sono spesso correlati a focolai in greggi nelle aree adiacenti (Delsing et al., 2011).

Gli animali infetti eliminano il batterio attraverso le urine, feci, latte e soprattutto col prodotto del concepimento e/o dell'aborto (placenta, lochiazioni, fluidi vaginali): più di 10^9 batteri per grammo di placenta vengono eliminati al momento dell'espulsione della stessa (Babudieri; 1959).

La durata dell'eliminazione da parte di animali infetti è piuttosto variabile, e dipende dalla via di escrezione, dalla specie considerata e da fattori individuali (fig 8).

Ad esempio, nel latte, *C. burnetii* viene eliminata per 8 giorni negli ovini e per più di 13 mesi nella specie bovina, nelle feci viene eliminata per più di 8 giorni dopo il parto nella pecora, e più di 20 giorni nella capra. Nei caprini l'eliminazione può essere incostante e avvenire in due periodi distinti. L'escrezione attraverso la via mammaria possiede alcune particolarità: non è associata ad alcuna alterazione del tessuto mammario, né ad alterazioni qualitative e quantitative del latte, quali riduzione delle produzioni, alterazioni del pH o delle cellule somatiche (Moretti; 1984). Spesso gli animali eliminatori risultano completamente asintomatici (Roest et al., 2012).

Ruminant species	Duration of <i>C. burnetii</i> shedding		
	Vaginal mucus	Feces	Milk
Cow	ND	14 days [86]	13 months [20]
Goat	14 days [8]	20 days [8]	52 days [8]
Ewe	71 days [16]	8 days after lambing [10, 16]	8 days [10, 16]

ND: not determined.

Fig. 8 Eliminazione di *Coxiella burnetii* nei fluidi vaginali, feci e latte in ruminanti sottoposti a infezione sperimentale (Maurin & Raoult; 1999).

La via aerogena rappresenta la più comune modalità di infezione per l'uomo ed è frequente anche negli animali. L'aerosol contaminato può originare a partire da fluidi di animali partorienti, feti abortiti, placenta, lana, feci ecc, e, data l'elevata resistenza nell'ambiente esterno delle forme SDC, tale pulviscolo può risultare infettante per diverse settimane, con la possibilità di essere veicolato da parte di fattori atmosferici, tra cui spicca per importanza il vento, che può veicolare il microbo anche per diversi chilometri (Tissot-Dupont et al., 2004).

Esistono evidenze in bibliografia su come il vento sia un fattore epidemiologico da tenere in considerazione nei focolai di febbre Q, come dimostrato da Tissot-Dupont *et al* (2004) in uno studio che descrive un focolaio verificatosi in Francia. Durante l'inverno 1998/1999 si riscontrò un inaspettato aumento di casi di febbre Q nell'uomo diagnosticati nel sud della Francia e tale dato fu correlato all' aumento dell'attività del vento maestrale in aree particolarmente dedite all'allevamento di piccoli ruminanti (in cui furono riscontrate elevate sieropositività) che di conseguenza aveva favorito la diffusione di *C. burnetii* nelle aree limitrofe (Tissot-Dupont et al., 2004). Altro esempio che suggerisce l'influenza dei fattori ambientali sull'incidenza della malattia, è stato descritto in Australia: attraverso uno studio retrospettivo è stata correlata l'incidenza annuale dell'infezione nell'uomo alla piovosità media e si è dimostrato statisticamente come gli anni maggiormente piovosi coincidessero con gli anni di maggiore incidenza di casi diagnosticati. In più questi ultimi si sono verificati per lo più in corrispondenza dell'estate, che in Australia corrisponde alla stagione delle piogge (Sivabalan et al., 2017).

Per questi motivi l'infezione può verificarsi anche in persone che non sono a stretto contatto con animali, anche se la popolazione maggiormente esposta al rischio di contagio resta quella routinariamente esposta a ruminanti e loro prodotti (veterinari, allevatori, macellatori, personale di laboratorio ecc.) (Beare et al., 2006).

Lo stesso concetto è applicabile anche alla trasmissione tra gli animali: non è sempre necessario un contatto diretto tra gli allevamenti per l'instaurarsi del contagio.

Sporadicamente, inoltre, anche gli animali da compagnia possono rappresentare fonti primarie di contagio nei confronti dell'uomo, ed esistono numerose evidenze scientifiche al riguardo.

Un esempio di come anche i gatti eliminano il batterio attivamente e in quantitativi significativi con il prodotto del concepimento, è stato descritto in Nova Scotia, in un focolaio storicamente noto come "*Poker Players Pneumonia*" (polmonite dei giocatori di poker). Un totale di 12 individui aveva sviluppato delle particolari forme febbrili due settimane dopo che gli stessi si erano incontrati per giocare a poker (Langley et al., 1988).

L'indagine epidemiologica condotta dopo aver conferito la diagnosi di febbre Q sulla base di reperti di laboratorio, si è concentrata sul felide del proprietario di casa, il quale era stato a contatto con tutti i presenti e nella stessa stanza aveva partorito.

La conferma della sorgente di contagio avvenne quando furono riscontrate specifiche evidenze sierologiche nel felino (Langley et al., 1988).

La via orale (ingestione di latte non pastorizzato per l'uomo o ingestione di fieni contaminati per gli animali) e quella relativa ad artropodi vettori sono vie secondarie di trasmissione (Maurin & Raoult; 1999).

Riguardo il rischio di contrarre l'infezione attraverso il consumo di latte, l'*European Food Safety Authority* (EFSA; 2010) ha chiarito come il consumo di latte crudo rispetto al consumo di prodotti che hanno subito un trattamento termico costituisce sicuramente un rischio di esposizione al microrganismo, e che il consumo di latte e derivati contenenti *C. burnetii* determina la comparsa di sieroconversione nell'uomo anche se non vi sono chiare evidenze che possa indurre la comparsa della forma clinica di febbre Q.

Gli artropodi vettori (zecche) possiedono, invece, un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'infezione nella fauna selvatica e nella sua trasmissione dalla fauna selvatica agli animali domestici, che può verificarsi a causa della promiscuità con roditori, lagomorfi, uccelli selvatici, grandi mammiferi (es. cinghiali, cervi, ecc) (Eldin et al., 2017).

Le zecche possono infettarsi (e divenire quindi infettanti) nel momento in cui espletano pasti di sangue su ospiti durante la transitoria batteriemia che caratterizza le primissime fasi della malattia.

Sebbene la trasmissione possa avvenire tramite il morso (sono necessari ripetuti pasti per l'instaurarsi del contagio), è di maggiore rilevanza la disseminazione massiva nell'ambiente esterno che avviene tramite le feci dell'artropode, in cui sono presenti anche da 10^3 a 10^8 microrganismi per grammo, vitali anche per diversi giorni (Eldin et al., 2017).

Tra le 40 specie di zecche che possono albergare il batterio, sono incluse anche quelle appartenenti ai generi più diffusi come *Dermatocentor*, *Ixodes* e *Rhipicephalus*.

Nell'organismo del vettore i batteri colonizzano principalmente l'epitelio e il lume dello stomaco, le ghiandole salivari e le ovaie, infatti è stata dimostrata anche la trasmissione transovarica e transtadiale, a sostegno del fatto che le zecche ospitano il batterio per periodi prolungati e senza alcun tipo di effetto deleterio sul proprio ciclo biologico (Eldin et al., 2017).

La trasmissione dell'infezione tramite morso di zecca nell'uomo è un evento estremamente raro ed occasionale.

Sono stati effettuati numerosi tentativi allo scopo di individuare *Coxiella* in altri artropodi vettori, come zanzare, mosche, pidocchi, pulci ecc, ma nessuno ha dato esito positivo.

Nell'uomo bisogna considerare la possibilità di contagio interumano infatti, anche se estremamente rari, sono stati descritti contagi verificatosi per contatto di fluidi infetti di partorienti, trasfusioni di sangue e durante le autopsie di soggetti infetti (Maurin & Raoult; 1999).

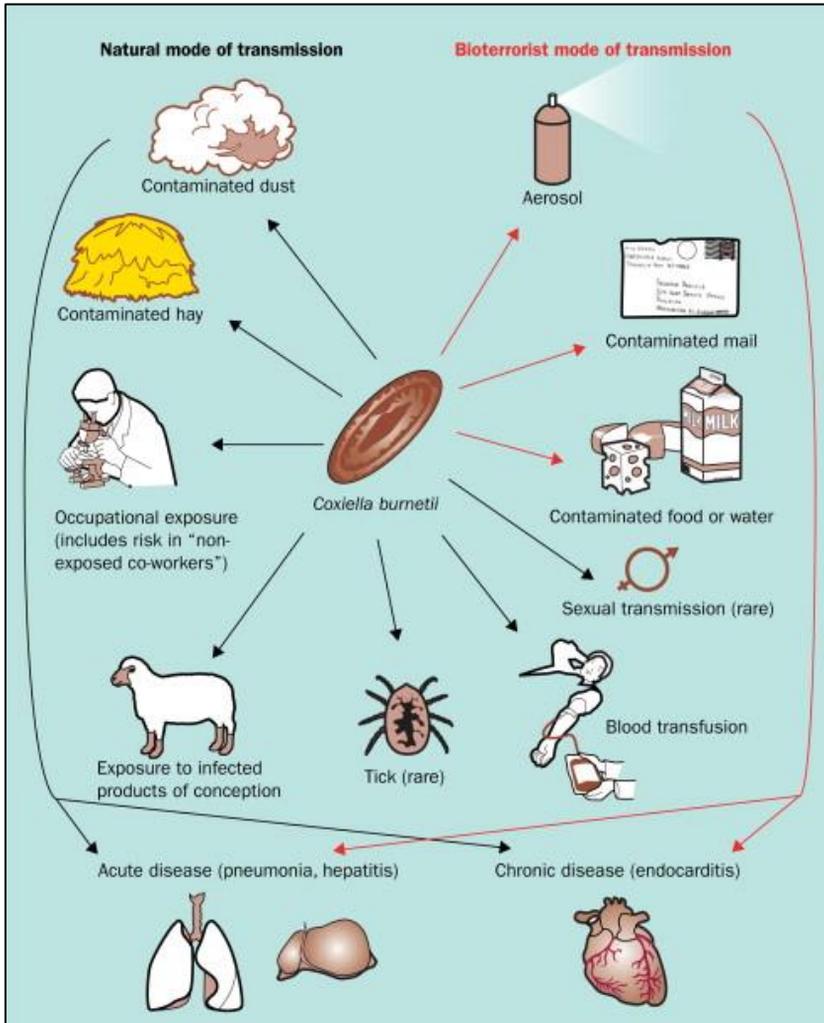


Fig. 9 Principali fonti di infezione da *Coxiella burnetii* per gli animali e per l'uomo (Madaraga et al., 2003).

2.2 La febbre Q come arma biologica:

Coxiella burnetii è considerato uno dei più efficienti patogeni per l'uomo, con una $ID_{50} = 1$ (*median infective dose*-dose infettante 50), quindi un singolo batterio è potenzialmente in grado di provocare l'infezione (Vigil et al., 2011).

Per le sue caratteristiche di stabilità e di resistenza nell'ambiente esterno è stato classificato dal *Centers for Disease Control* (CDC, USA) come un agente di bioterrorismo di categoria B (Vigil et al., 2011) ed è altresì presente nella *ex lista B* della *World Organization for Animal Health* (OIE). Non è stato chiarito l'effettivo utilizzo di tale patogeno come arma biologica durante la Seconda guerra mondiale, ma diversi focolai sospetti o comprovati sono stati riportati in diversi Paesi in quel periodo e si sono susseguiti tra il personale militare anche dopo la fine del conflitto, anche se presumibilmente casuali e dovuti all'inalazione di pulviscolo infetto o al contatto diretto ruminanti cui i militari potevano essere soggetti (Madiaraga et al., 2003).

Nel dopoguerra il batterio riuscì ad attrarre l'interesse dei programmi di offensiva biologica delle principali potenze mondiali. Gli Stati Uniti d'America inclusero l'agente della febbre Q tra quelli che potevano essere utilizzati come arma biologica nel programma iniziato nel 1942 a Fort Detrick, MD, USA. Nel 1954, numerosi volontari furono deliberatamente esposti al batterio nel cosiddetto programma "*Whitecoat*", un programma di difesa biomedico che aveva lo scopo di difendere militari e civili da eventuali attacchi di bioterrorismo (si presupponeva che l'Unione Sovietica effettuasse tali attività).

Oltre alla febbre Q le sperimentazioni comprendevano numerose infezioni che potevano prestarsi al bioterrorismo, come la febbre gialla, Febbre della *Rift Valley*, epatite A, peste, tularemia, la encefalite equina del Venezuela e molte altre (Madiaraga et al., 2003).

Anche l'ipotesi che tali attività fossero sfociate nella produzione e nello stoccaggio di bombe contenenti *C. burnetii* non fu mai dimostrata e, in ogni caso, tale programma terminò nel 1969-70.

Nell'Unione Sovietica il programma di sviluppo delle armi biologiche fu stabilito nel 1920 e, già prima della Seconda guerra mondiale, furono prodotte armi biologiche con *Coxiella burnetii*. Tale programma continuò ininterrotto fino ai primi anni Novanta, quando con la caduta dell'Unione

Sovietica, il presidente russo Boris Yeltsin decise di bandire definitivamente tutte le armi biologiche (Madiaraga et al., 2003).

In Giappone la setta "Aum Shinrinko", salita alla ribalta della cronaca nera per un attacco col gas sarin nella metro di Tokyo nel marzo del 1995, stava effettuando ricerche su diversi agenti biologici (incluso *Coxiella*) da utilizzare per ulteriori attacchi terroristici pianificati (fortunatamente sventati).

Nel Regno Unito, precisamente nello Oxfordshire, nel 1987 ci fu un attacco bioterroristico e, sebbene fu diffusa la notizia che si trattasse di lettere all'antrace, molti indizi ed alcune caratteristiche del focolaio suggerivano che si potesse trattare di *Coxiella burnetii* (Madiaraga et al., 2003).

C. burnetii può essere utilizzata come arma biologica in forma aerosolizzata o come contaminante di cibo, acqua e lettere postali. L'ingestione di moderate dosi di *Coxiella* potrebbe non provocare alcun sintomo, mentre non si hanno grandi informazioni circa l'assunzione di dosi massive in cibo o acqua.

Il lavoro di Madiaraga *et al*, invece, ha evidenziato come il rilascio di *Coxiella* in forma aerosolizzata in una area densamente popolata potrebbe causare la brusca insorgenza di forme febbrili, simulando le caratteristiche di un focolaio instauratosi naturalmente (Madiaraga et al., 2003). Il focolaio esploderebbe 14-26 giorni dopo il rilascio, ed i soggetti colpiti presenterebbero i sintomi tipici, quali febbre, dolori e malessere generale, in alcuni casi si evidenzerebbero segni evidenti di epatite, polmonite e sintomi ascrivibili a malattie respiratorie

Grazie a tali caratteristiche il quadro iniziale sarebbe difficilmente differenziabile clinicamente da un comune focolaio di influenza o, per quanto riguarda i casi più severi, da altre cause di polmoniti atipiche, come quelle causate da *Mycoplasma* o da agenti virali. In uno stadio iniziale, laddove si sospettasse un attacco bioterroristico, i sintomi primari sarebbero configurabili con quelli provocati da altri agenti responsabili di sintomi simil influenzali, quali peste, antrace e tularemia.

E' stato calcolato che il rilascio di 50 kg del microrganismo in un'area di 2 km e con popolazione di 500.000 abitanti, provocherebbe circa 150 morti e circa 125.000 forme acute, con numerosi soggetti debilitati. Grazie all'azione del vento il batterio si propagherebbe per più di 20 chilometri. Tra i soggetti infetti in forma acuta, circa 9000 potrebbero sviluppare la forma cronica, con relative endocarditi e complicanze cardiache che si verificherebbero nei mesi successivi all'attentato, e corrispettivo aumento dei decessi (Madiaraga et al., 2003).

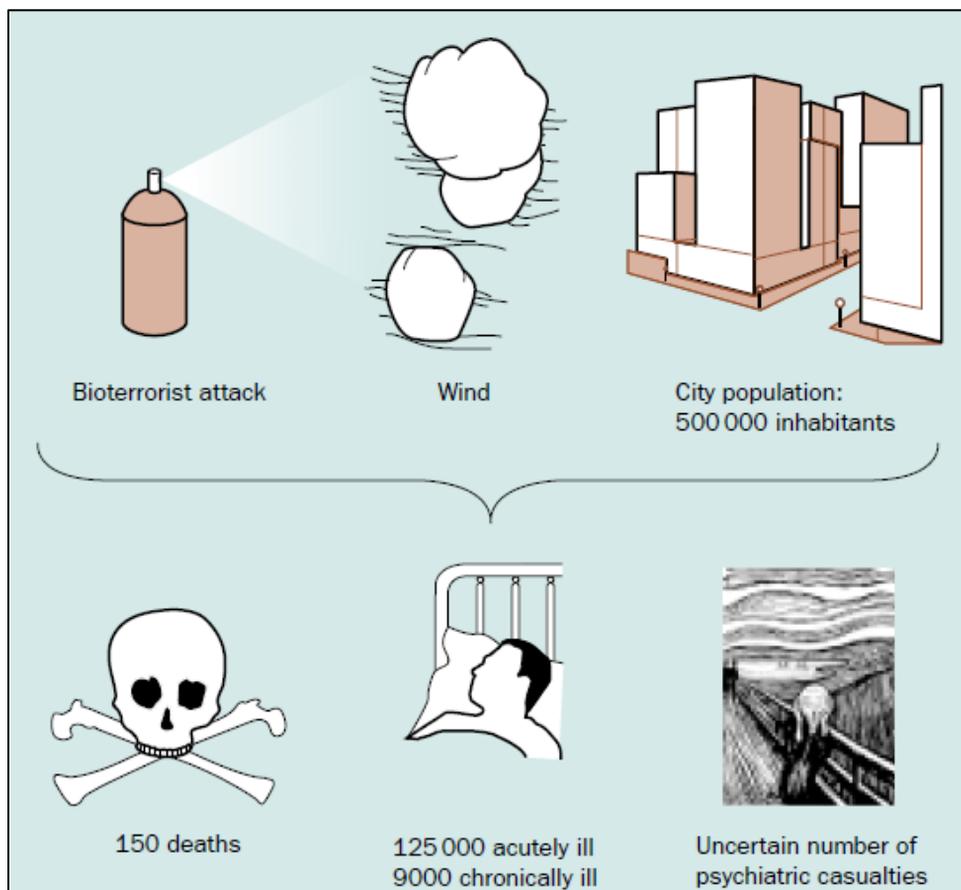


Fig. 10 Tutti gli effetti del rilascio di 50 kg di *C. burnetii* in un'area di 2 chilometri con popolazione di 500.000 abitanti (Madiaraga et al., 2003).

2.3 Febbre Q nel mondo:

L'incidenza e la prevalenza mondiale della malattia sono scarsamente definite sia nell'uomo che negli animali e ciò è dovuto sia all'ampia diffusione che alla varietà dei sintomi, che la rendono facilmente confondibile con altre infezioni. Tutto ciò concorre nel definire la febbre Q una malattia nettamente sottodiagnosticata, specie in aree in cui vi sono scarsità di risorse e di strumenti. (Dragan et al., 2020).

Negli Stati Uniti d'America a fronte di 200 casi annuali diagnosticati, vi è circa il 3.5% di popolazione sieropositiva, dato che indica inconfutabilmente che solo una piccola percentuale dei casi viene effettivamente accertata (Anderson et al., 2009).

Sempre in America, una sieropositività del 22% riscontrata nei veterinari, indica l'esistenza di figure professionali maggiormente esposte al rischio di infezione (Whitney et al., 2009).

Approssimativamente ogni anno si infettano 50 individui su 100.000 persone, e una persona ogni 100.000 sviluppa la forma cronica (Hackstadt; 1996).

2.4 Il focolaio olandese:

Tra il 2007 e il 2010, l'Olanda è stata coinvolta dal più grande focolaio di febbre Q, riportando più di 4.000 casi. Sulla base delle notifiche e della sieroconversione in donatori di sangue, è stata calcolata una ratio di un caso notificato ogni 12.6, quindi si è stimato che circa 50.000 individui hanno contratto l'infezione durante questo focolaio (Dijkstra et al., 2012).

Quest'ultimo si è instaurato nella provincia di Noord-Brabant, nel sud del Paese, area densamente popolata in cui da alcuni anni l'allevamento aveva acquisito caratteristiche sempre più intensive: la provincia è abitata da 2.4 milioni di persone e 6.4 milioni di animali da reddito, con un gran numero di caprini (Karagiannis et al., 2009).

Studi retrospettivi hanno evidenziato, negli anni immediatamente precedenti al 2007, un aumento dei tassi di aborto in numerosi allevamenti della provincia, rimarcando come l'epizoozia si sia prima ampiamente diffusa nei ruminanti (Roest et al., 2011).

I picchi epidemici annuali, inoltre, sono occorsi sempre in corrispondenza con la stagione delle nascite degli ovicaprini.

La magnitudo dell'epidemia è stata probabilmente magnificata dalla compresenza e combinazione di numerosi fattori: presenza di un gran numero di animali infetti, la localizzazione di allevamenti in prossimità di aree urbane, l'assenza di sorveglianza, un basso livello di immunità protettiva nella popolazione (Dijkstra et al., 2012).

Fino al 2006, la febbre Q aveva una scarsa incidenza in Olanda, essendo notificata con una media di circa 17 casi all'anno (da 1 a 32), e la maggior parte dei casi erano rappresentati da persone a rischio occupazionale, specialmente allevatori e veterinari.

Già nel primo anno di epidemia furono confermati 168 casi e le autorità olandesi furono costrette ad intervenire: fu sviluppato un piano di salute pubblica di controllo del focolaio, dapprima caratterizzato da misure piuttosto blande, poi incentivato e implementato nella primavera del 2008 a causa del progressivo aumento dei contagi (Roest et al., 2011).

Nel giugno del 2008 furono rese obbligatorie la vaccinazione e la notifica di aborto per gli allevamenti delle aree colpite che possedevano più di 50 animali.

Gli allevamenti infetti furono identificati con test di biologia molecolare, e in particolare *Real-time polymerase chain reaction* (Real time-PCR) effettuati su latte di massa, volti alla ricerca del DNA del microrganismo (Roest et al., 2011).

Nel dicembre del 2009, a causa della parziale inefficienza delle misure intraprese, si decise di abbattere sistematicamente tutti gli animali gestanti appartenenti ad allevamenti positivi e di imporre il divieto di riproduzione per tali aziende (Delsing et al., 2010). Tale campagna portò all'abbattimento di più di 50.000 capi in 88 allevamenti diversi.

L'altra misura fondamentale per la successiva risoluzione del focolaio è stata la vaccinazione di massa, la cui campagna obbligatoria iniziò nel 2008 per poi essere intensificata nel 2009, allo scopo di ridurre il fenomeno dell'aborto dei ruminanti e, di conseguenza, l'eliminazione del batterio. (Hogerwerf et al., 2011).

Hogerwerf et al (2011) hanno comparato quantitativamente l'eliminazione del batterio in diversi escreti da parte di animali vaccinati e non, sottoposti ad infezioni sperimentali.

Nei soggetti vaccinati solo lo 0.43% dei tamponi uterini erano positivi, 30% dei tamponi vaginali, 4% di campioni di latte. Negli animali non vaccinati il 26% dei tamponi uterini, 76% di tamponi vaginali, e 33% di campioni di latte erano positivi.

Grazie all'insieme di tali misure, dal 2010 in poi l'incidenza nell'uomo iniziò la sua decrescita suggerendo l'efficacia degli interventi.

Il numero di casi notificati si ridusse a 81 nel 2011 e 66 nel 2012. Dal 2013 fino al 2016 il numero di casi annuali nell'uomo è tornato ai livelli pre-epidemici, con 19 casi nel 2013, 28 nel 2014, 22 nel 2015 e 9 nel 2016 (Roest et al., 2011).

Quando i ceppi responsabili del focolaio olandese sono stati analizzati tramite *multiple-locus variable-number tandem repeat analysis* (MLVA), si è osservato che differivano per una singola sequenza ripetuta, e che tale differenza aveva dato vita probabilmente a una nuova microvariante di un ceppo ipervirulento (Kowalczywska et al., 2011).

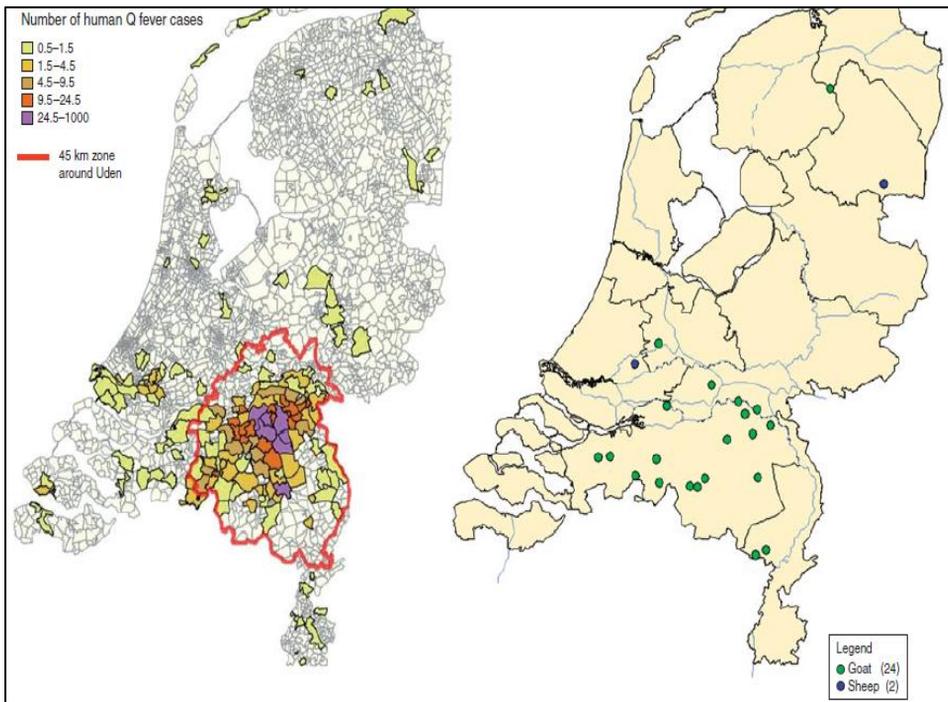


Fig. 11 Mappa dell'Olanda, sulla sinistra focolai notificati nell'uomo nel 2007 e nel 2008. La linea rossa indica l'area in cui fu approvato il vaccino per l'immunizzazione volontaria. Sulla destra gli allevamenti con anamnesi di aborto da febbre Q tra il 2005 e il 2008 (Roest et al., 2011).

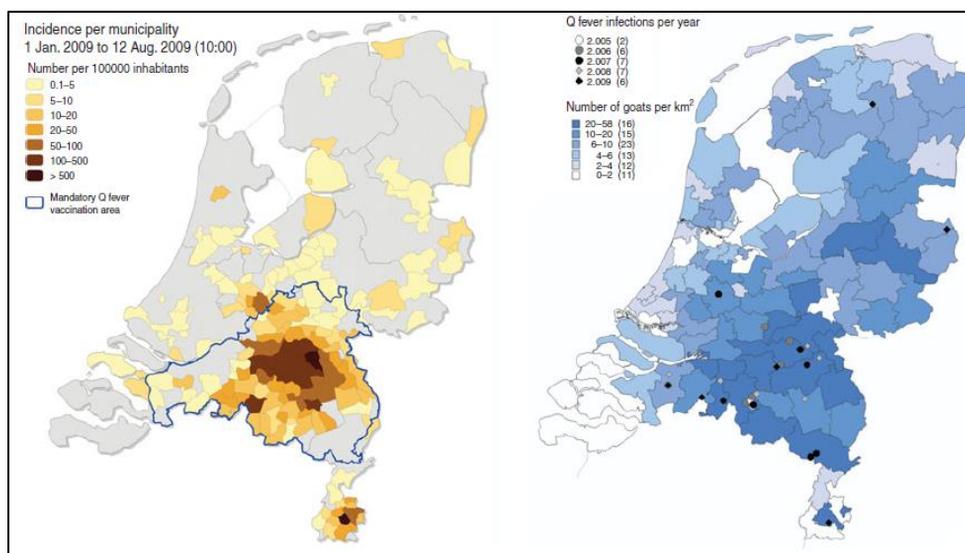


Fig. 12 Cartina dell'Olanda, sulla sinistra l'incidenza della febbre Q ogni 100.000 abitanti per municipalità. La linea blu indica l'area in cui fu indetto l'obbligo di vaccinazione per gli allevamenti di ovicapri. Sulla destra gli allevamenti con anamnesi di aborto da febbre Q tra il 2005 e il 2008 e densità di caprini per kilometro quadrato (Roest e al., 2011).

Tab. 2 *Tabella riassuntiva delle principali misure intraprese dalle autorità sanitarie olandesi durante il focolaio di febbre Q avvenuto tra il 2007 e il 2010 (Roest et al., 2011).*

Data di intervento	Misure
12 Giugno 2008	Obbligo di notifica in allevamento ovicaprini. Obbligo di notifica di aborto quando il tasso supera il 5% in allevamenti con più di 100 capi, e quando supera il 3% per allevamenti con meno di 100 animali.
12 Giugno 2008	Divieto di spandimento del letame e divieto di accesso a qualsiasi visitatore per i 90 giorni successivi la notifica.
16 Ottobre 2008	Deroga per l'utilizzo di Coxevac (CEVA) in Olanda. Vaccinazione volontaria di capre e pecore da latte in allevamenti inferiori a 50 capi e animali da zoo, nell'area di prossima al focolaio, con raggio di 45 chilometri.
2 Febbraio 2009	Obbligo per gli allevamenti con più di 50 capi di implementare le misure igienico-sanitarie e di biosicurezza riguardanti la gestione del letame, la gestione di feti e placenti e il controllo degli ectoparassiti.
20 Aprile 2009	Obbligo di vaccinazione per allevamenti con più di 50 animali, animali da zoo e fattorie sociali nell'area specificata.
1 Ottobre 2009	Obbligo di monitoraggio dell'infezione con raccolta di BTM ogni due mesi. Divieto di spostamento per tutti gli animali appartenenti ad allevamenti positivi. In entrata è permesso l'ingresso di nuovi animali esclusivamente se vaccinati.
9 Dicembre 2009	Divieto di riproduzione in allevamenti positivi

1 Gennaio 2010	Obbligo di vaccinazione esteso a livello nazionale e ad altre categorie di allevamenti, come ad allevamenti aperti al pubblico, allevamenti transumanti, e animali di riserve naturali.
14 Dicembre 2009	Obbligo di monitoraggio con BTM ogni 2 settimane
16 Dicembre 2009	Divieto di rimozione del letame dall'azienda per i 30 giorni successivi alla fine della stagione delle nascite, se non previo stoccaggio per 90 giorni in azienda.
16 Dicembre 2009	Abbattimento di tutti gli animali gravidi negli allevamenti positivi
18 Dicembre 2009	Divieto di rimonta per allevamenti positivi.

2.5 La situazione italiana:

In Italia le informazioni circa questa malattia sono piuttosto scarse e frammentarie, dovute a una sorveglianza incompleta che si basa essenzialmente sull'evidenza del patogeno successiva a disordini riproduttivi negli allevamenti (Rizzo et al., 2016). Spesso la diagnosi in allevamento è puramente occasionale e dovuta ad approfondimenti effettuati solo per escludere altre ben più temute infezioni provocanti aborto e, per questo motivo, non è sempre seguita da accorgimenti e misure correttive.

Non esistono dati sulla prevalenza e l'incidenza nazionale, e gli studi effettuati su larga scala risultano esigui (quantomeno a livello regionale). Uno di questi è stato effettuato in Sardegna campionando sangue e feti abortiti in allevamenti affetti da disordini riproduttivi e in cui erano stati notificati degli aborti (Masala et al., 2004).

L'*enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) ha evidenziato delle sieroprevalenze a livello aziendale del 38% per gli ovini e del 47% per i caprini, mentre *C. burnetii* è stata identificata tramite PCR nel 10% dei feti abortiti ovini e nel 6% di quelli caprini.

Anche in Piemonte sono state riscontrate sieroprevalenze che testimoniano la circolazione del patogeno a livello regionale, nella fattispecie del 38.7% negli allevamenti ovini e del 19.5% negli allevamenti caprini. La prevalenza individuale, sovrapponibile per entrambe le specie, consisteva nel 15.9% (Rizzo et al., 2016).

Prevalenze simili sono state osservate anche in Sicilia nel 2019 in uno studio condotto su vacche da latte: 38.8% a livello aziendale e 5.28% a livello individuale (Galluzzo et al., 2020).

I dati ottenuti da questi lavori sono in linea con quelli ottenuti nei principali Paesi europei, considerando che piccole variazioni sono imputabili alla scelta del test utilizzato e all'approccio condotto.

In Polonia, ad esempio il 13% degli allevamenti ovini e il 66.66% di quelli caprini ha almeno un animale sieropositivo (Szymańska-Czerwińska et al., 2015). In Spagna la sieroprevalenza varia dal 74% al 45% in base alla specie (rispettivamente ovini e caprini) (Ruiz-Fons et al., 2008), in Francia 25.7 nelle pecore e 41.5% nelle capre (Gache et al., 2017).

La Svizzera riporta un 5% di positività per le aziende ovine e l'11.1% in quelle caprine (Magouras et al., 2017).

Tornando al nostro Paese, alcune sporadiche epidemie di lieve entità sono state descritte anche nell'uomo, nella maggior parte dei casi assimilabili al contatto diretto o indiretto con greggi infetti.

La prima evidenza della malattia sul suolo italiano risale addirittura alla Seconda guerra mondiale e al focolaio di Grottaglie (Puglia) verificatosi tra i soldati americani sbarcati nel 1945 sulle coste tarantine, i quali presentarono sintomi ascrivibili alla malattia. La diagnosi di certezza fu ottenuta solo al ritorno dei militari negli USA.

Circa quaranta anni dopo, tra il 1987 e il 1988 si verificò un nuovo focolaio, in una comunità agricola per la riabilitazione di tossicodipendenti, a San Patrignano (Rimini): 235 soggetti lamentavano sintomi simil influenzali. Dopo che la febbre Q fu confermata, il focolaio si risolse senza decessi e senza la comparsa di forme croniche (nonostante molti pazienti fossero immunodepressi perché malati di HIV) e con l'individuazione della sorgente, rappresentata dall'allevamento ovino, interno all'istituto, la cui cura faceva parte delle attività svolte dagli ospiti e che risultava ampiamente infetto (Boschini et al., 1999).

Un importante focolaio fu descritto a Vicenza, con un totale di 58 casi notificati in un periodo di 5 mesi. Anche in questa circostanza, l'indagine epidemiologica fu volta a identificare l'agente nei ruminanti domestici, per tal motivo furono analizzati circa 100 allevamenti insediati in prossimità del focolaio. La causa fu identificata in 3 greggi transumanti nelle aree adiacenti all'epicentro nei mesi precedenti, e che mostravano valori di sieroprevalenza elevati (tra 45 e il 53%) anche se l'epidemia si esaurì spontaneamente (Manfredi Selvaggi et al., 1996).

Più recentemente, nel 2003, un focolaio verificatosi a Como colpì 133 persone, salì alla ribalta della cronaca per via del fatto che molti pazienti erano detenuti e dipendenti presso la casa circondariale di Como (Starnini et al., 2005).

Una volta escluse le principali tossinfezioni alimentari e le principali cause di polmonite nell'uomo, fu possibile definire la diagnosi eziologica e iniziò un'indagine epidemiologica volta a svelare la sorgente del focolaio e favorirne l'estinzione. Anche in questo caso l'infezione fu associata a un gregge transumante (750 animali) presentanti elevate sieropositività (34.2%). Qualche mese prima dell'acuirsi del fenomeno, il gregge aveva sostato in prossimità del carcere, contaminando i pascoli e i terreni, e grazie l'azione di agenti atmosferici era stato veicolato nelle aree limitrofe. La risoluzione avvenne qualche mese dopo, grazie all'intervento dell'autorità

sanitarie e alle misure intraprese nell'allevamento in questione (Starnini et al., 2005).

Numerosi studi testimoniano la diffusione del patogeno praticamente in ogni regione.

Ad esempio, in Lombardia sono stati riscontrati 337 campioni di latte di massa positivi alla PCR su 780 analizzati (Vicari et al., 2013).

Uno studio condotto in Sicilia ha evidenziato che più del 20% degli allevatori presenta anticorpi nei confronti di *Coxiella burnetii* (Verso et al., 2016).

L'evidenza del patogeno in artropodi vettori è stata dimostrata sia in animali domestici che in selvatici (Chisu et al., 2020)

In Campania nel 17.5% degli aborti bufalini è stato possibile identificare il DNA di *C. burnetii* (14 feti su 164), dimostrando come sia una delle principali cause di aborto anche in tale specie (Perugini et al., 2009).

Sempre in Campania, Capuano et al (2001) hanno riscontrato una sieropositività tramite immunofluorescenza indiretta (IFA) del 14.4% in allevamenti bovini della provincia di Avellino.

Tutti questi studi confermano, attraverso differenti approcci, la presenza e l'ampia diffusione sul territorio italiano, la circolazione tra gli animali domestici e la fauna selvatica, nonché le conseguenze che il patogeno comporta sia in termini di sanità pubblica che a livello di indici zootecnici ed economici aziendali.

Implementare le informazioni disponibili e migliorare le attività di sorveglianza rappresentano steps di primaria importanza per intraprendere misure maggiormente efficienti volte al contenimento della malattia, anche in previsione di eventuali epidemie nell'uomo.

2.6 Fisiopatologia

Una volta inalate o ingerite le forme extracellulari di *C. burnetii* si legano alla membrana cellulare dei monociti e/o dei macrofagi, vengono fagocitate e trasportate nei linfonodi regionali prossimi alla porta d'ingresso dove avviene una prima replicazione e dove vengono poste le basi per la successiva batteriemia (dai 7 ai 21 giorni, con cui il batterio viene disseminato in altri organi) (Capo et al., 1999).

Coxiella è in grado di sopravvivere nel vacuolo parassitoforo che si crea a partire dalla fusione del fagosoma e del lisosoma, legandosi alle anchirine, proteine di membrana legate, a loro volta, ad un'altra famiglia di proteine,

dette spetttrine, in grado di mediare l'interazione tra le diverse porzioni della membrana cellulare (Madiaraga et al., 2003).

L'efficienza della fagocitosi dipende invece dall'attivazione del recettore fagocitico CR3 (complement receptor-3) attraverso l' $\alpha\text{v}\beta 3$ integrina e il CD47 (proteine associate alle integrine) ed avviene con modalità ed efficacia differente nelle due forme del patogeno (fase I virulenta e II avirulenta).

Il processo di internalizzazione è più efficace per la fase II avirulenta, poiché coinvolge anche il recettore 3 del complemento CR3, ed è per questo motivo che la forma avirulenta cresce più velocemente in laboratorio su colture cellulari (Capo et al., 1999).

La fase I, grazie al proprio LPS, modula la fagocitosi recettore-mediata attraverso l'inibizione dell'interazione tra le integrine e recettori di membrana, rimodellando l'organizzazione strutturale dell'actina e attivando le tirosin-chinasi. Ciò porta ad una scarsa internalizzazione di questa forma, la quale prosegue la sua azione inducendo un'attivazione precoce delle tirosin-chinasi e la fosforilazione della tirosina in due *SRC-chinase* correlate: Hck e Lyn.

Al contrario la forma avirulenta non stimola le tirosin-chinasi. Le tirosine fosforilate sono alloggiato dentro le protrusioni "F-actina". Queste protrusioni della membrana cellulare sono indotte tramite l'attivazione delle tirosin-chinasi da parte del LPS, che possiede un ruolo cruciale nella captazione di *C. burnetii*. L'utilizzo di inibitori delle tirosin-chinasi, sembra limitare la fagocitosi di *Coxiella* (Meconi et al., 2001).

Diversi batteri intracellulari come *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Shigellae* e *Listeria monocytogenes* minano i meccanismi di difesa delle cellule ospiti prevenendo ed inibendo completamente la fusione del fagosoma-lisosoma e quindi la formazione del fagolisosoma. Grazie a questo processo, che segue meccanismi differenti a seconda del patogeno preso in considerazione, è garantita la sopravvivenza del batterio, che normalmente non si verificherebbe a causa dei valori di pH, alla presenza di radicali e proteasi degradanti del fagolisosoma.

A differenza di altri patogeni intracellulari, *C. burnetii* utilizza una strategia differente, in quanto non evita l'innescò di questo meccanismo, bensì permette e favorisce la fusione del fagolisosoma traendone i relativi vantaggi: protezione fisica offerta nei confronti dell'ambiente intra- ed extracellulare e nei confronti cellule immunocompetenti (immuno-evasione), "attivazione acida" del metabolismo (*Coxiella* necessita di pH acidi per

attivare il proprio metabolismo e per dar luogo a una replicazione ottimale) (Beare et al., 2009).

Immediatamente dopo la fagocitosi, sia le forme virulente che quelle avirulente si localizzano all'interno del fagosoma primario, inibendo temporaneamente i EEA1 (early endosome auto-antigen-1). Il fagosoma primario va incontro a maturazione dando vita a un fagosoma secondario, presentante sulla propria membrana i marker Lamp-1, CD63, recettori mannosio-6-fosfato, e V-H⁺ ATPase. Già all'interno del fagosoma secondario si assiste a una graduale riduzione del pH. La principale differenza tra fagosomi contenenti forme virulente e avirulente consiste nella presenza delle proteine Rab (GTPasi monomeriche coinvolte nel traffico vescicolare intracellulare) presenti superficie del fagosoma quando ospita la forma virulenta.

Il fagosoma ospitante la forma virulenta, non maturerà in fagolisosoma, poiché, attraverso numerosi meccanismi, ne viene inibita la maturazione (Abnave et al., 2017).

Diversi studi hanno dimostrato come l'LPS della forma virulenta non induce la fosforilazione di p38 MAPK dal MKK 6 (Mitogen-Activated Protein Kinase 6).

Questa defezione previene la fosforilazione della serina (S796E) da parte di Vps41 e, in assenza di fosforilazione, Vps41 non promuove il targeting del complesso HOPS (homotypic fusion and protein sorting) per i siti di fusione vacuolo-endosoma, e quindi risulta deficitario nel reclutare le Rab 7 GTP-ligate fondamentali per la fusione e la maturazione del fagolisosoma. (Abnave et al., 2017).

Una volta che i batteri si internalizzano nelle cellule ospiti, restano nel fagolisosoma per tutto l'arco del proprio ciclo vitale, in quanto sono in grado di sopravvivere nell'ostile ambiente del fagolisosoma tramite l'uso di scambiatori di ioni sodio, canali mecano-sensitivi per ioni e trasportatori per osmoprotettori, che provvedono alla resistenza in mezzo acido e in stress ossidativo.

Una caratteristica peculiare di *Coxiella* risiede nel fenomeno della plasticità metabolica in quanto, a differenza di altri batteri intracellulari, possiede enzimi per numerosi *pathways* che permettono la produzione di nutrienti e di energia.

Anche questi enzimi sono attivati dal pH acido del fagolisosoma, e l'attivazione porta allo sviluppo e alla replicazione delle forme LCV a partire da quelle SCV.

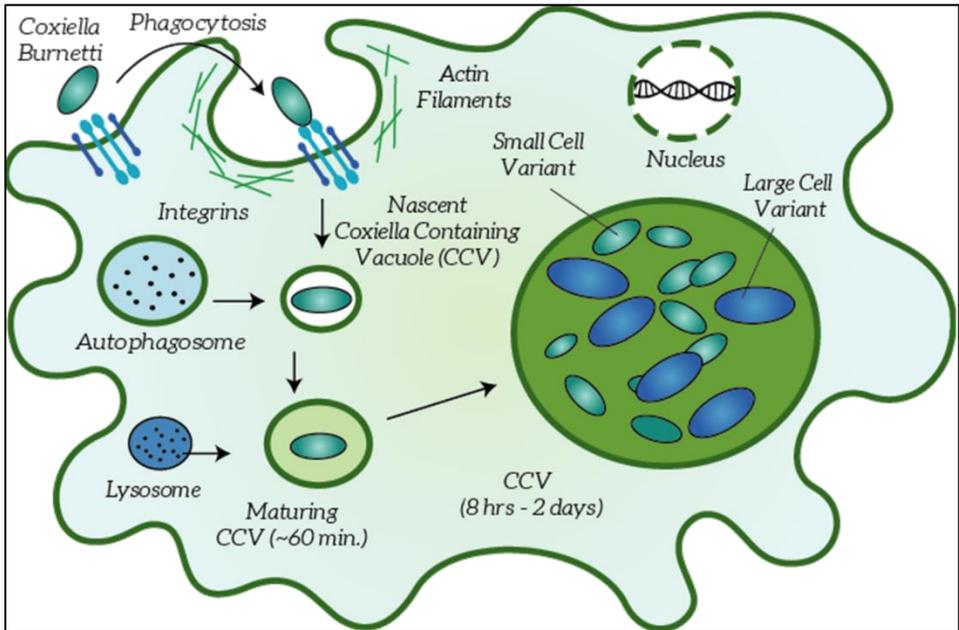


Fig. 13 Ingresso di *C. burnetii* nella cellula ospite tramite fagocitosi, formazione del vacuolo parassitario e ciclo vitale intracellulare.

Fonte: "http://2015.igem.org/Team:TU_Eindhoven/Policy_Practices/Application_scenarios"

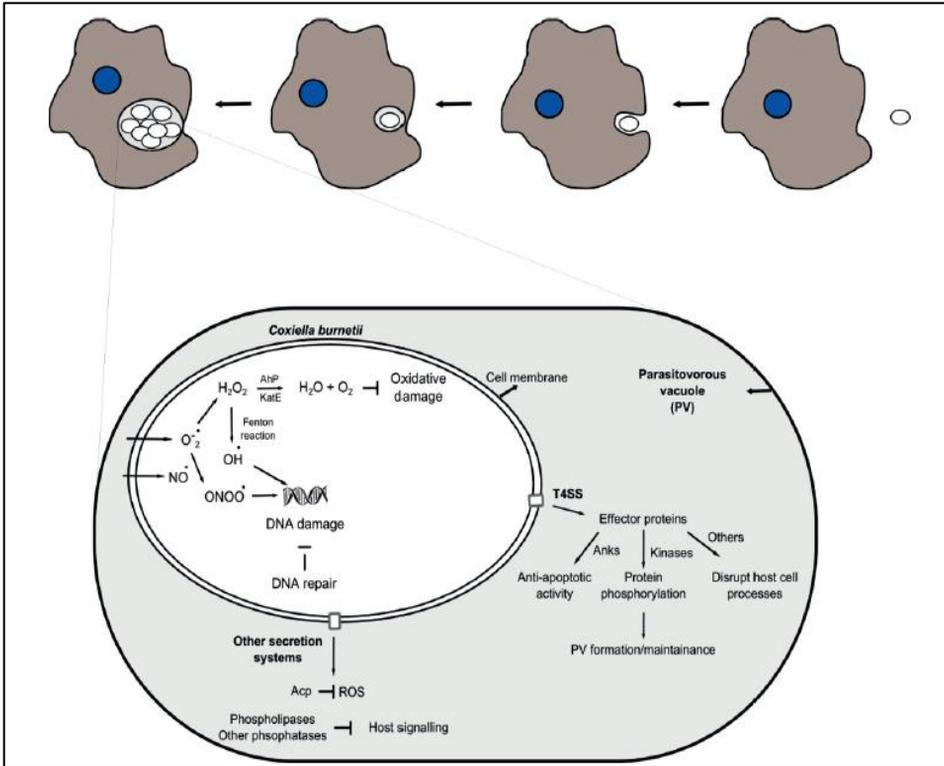


Fig. 14 Uptake di *C. burnetii* dalle cellule ospiti e meccanismi di virulenza contro gli stress ossidativi e processi cellulari dell'ospite. *C. burnetii* entra all'interno delle cellule ospiti tramite fagocitosi e si moltiplica nel vacuolo parassitovoro utilizzando enzimi ossidativi come meccanismi difensivi contro ROS e altri sistemi di difesa della cellula ospita. La manipolazione dei sistemi difensivi dell'ospite può essere mediata da numerose proteine effettrici, trasportate nel citoplasma cellulare da T4SS e altri sistemi di secrezione (Acp-enzimi fosfatasi acide; Anks- Proteine contenenti anchirine ripetute) (Mertens et al., 2012).

Sebbene sia coinvolta anche l'immunità umorale nel controllo delle infezioni da *C. burnetii*, quella cellulo-mediata sembrerebbe fondamentale nell'eradicazione dell'agente dall'organismo.

Numerose citochine sono coinvolte nel processo di risposta all'infezione, alcune di esse hanno effetti opposti, come ad esempio le interleuchine che favoriscono la replicazione di *Coxiella* nei monociti, mentre interferone e TNF (*tumor necrosis factor*) ne provocano la morte (Ghigo et al., 2012).

La polarizzazione dei macrofagi è riorientata da *Coxiella*, che ne disattiva la risposta microbica favorendo l'attivazione macrofagica atipica M2, favorendo l'espressione dei geni correlati quali transforming growth factor-1, interleukin (IL)-1 receptor antagonist, Chemokine (C-C motif) ligand (CCL)18, mannose receptor, arginase-1. Di contro l'espressione di geni relativi alla polarizzazione di tipo 1 sono inibiti, come tumor necrosis factor, CD80, C-C chemokine receptor type (CCR)7.

Interessante notare come l'espressione dell'arginasi-1 è associata con l'assenza di produzione di ossido nitrico, mentre l'espressione di Interleuchina (IL)-6 e chemochina aumenta, sebbene poi debolmente secrete.

In più i monociti producono alti livelli di IL-10 in risposta a *Coxiella* e al suo LPS. IL-10 favorisce la persistenza di *Coxiella burnetii* tramite *down regulation* e l'espressione del TNF (Benoit et al., 2008).

Le cellule infette sono anche protette dall'apoptosi, preservando la replicazione batterica anche dopo lunghi periodi.

Di contro, nelle cellule non fagocitiche, l'internalizzazione è facilitata dall'invasina OmpA (outer membrane protein A) (Martinez et al., 2014).

Come il patogeno sfugga all'iniziale risposta cellulare e la successiva replicazione, non è ancora del tutto chiaro.

La risposta anticorpale per la fase I può giocare un ruolo importante nel debellare il batterio nella fase acuta, mentre ha limitata influenza nello stadio cronico. Alti titoli anticorpali possono risultare deleteri per sovrabbondanza di immunocomplessi circolanti, che possono provocare danni a livello di diversi organi.

La malattia conferisce immunità, ma l'organismo persiste nell'ospite e può causare recrudescenza della malattia.

La via di ingresso del patogeno, fattori legati all'ospite e il potenziale patogenico dei ceppi giocano un ruolo nelle presentazioni cliniche della febbre Q.

Le informazioni relative alla risposta immunitaria nei ruminanti domestici sono, invece, scarse. Roest et al (2013) hanno valutato nel tempo la risposta

anti-fase I e II e quella cellulo-mediata in animali (capre) sperimentalmente infetti. A due settimane dall'infezione si evidenzia una marcata risposta anti-fase II (sia IgM che IgG), mentre l'aumento di IgM nei confronti della fase I è meno pronunciata. Quest'ultima si osserva, infatti, solo a 6 settimane dall'infezione.

La risposta immunitaria cellulo-mediata nelle prime settimane di infezione è minima, mentre diventa evidente dopo il parto tramite l'aumento di citochine pro-infiammatorie (TNF- α e IL-1 β) e coincide con l'eliminazione massiva del microrganismo nei fluidi biologici.

Quando l'infezione assume una forma cronica, il livello di infiammazione diventa elevato, mentre l'immunità cellulo-mediata diventa difettiva. Infatti, è stato osservato che in pazienti affetti da endocardite cronica, aumenta la produzione delle citochine infiammatorie TNF e IL-6, mentre diminuisce la capacità dei linfociti di proliferare in risposta alla stimolazione con gli antigeni di *C. burnetii* (Roest et al., 2013).

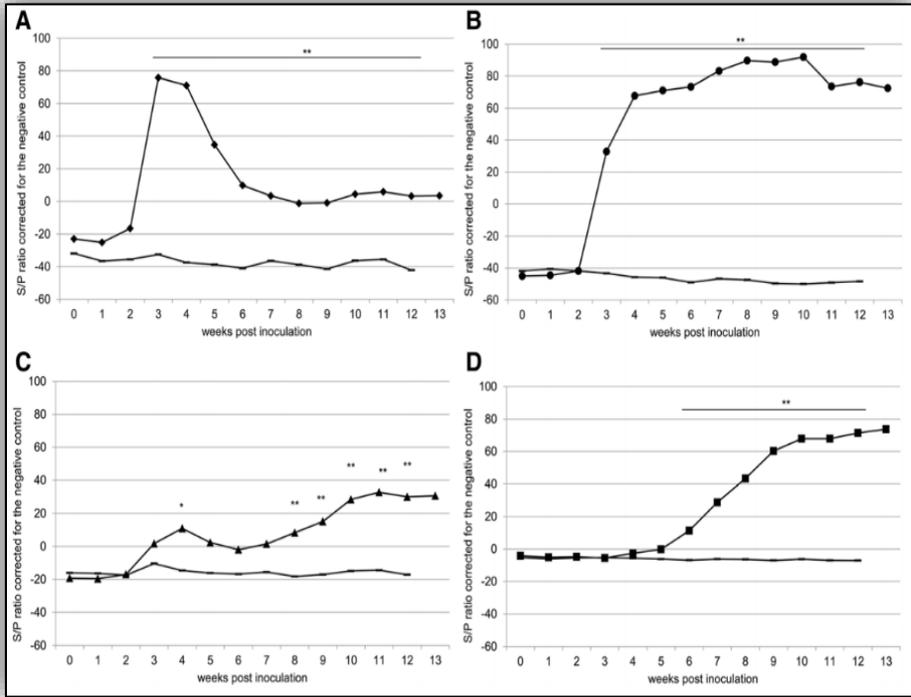


Fig. 15 Risultati della risposta anti-fase I e fase II in ELISA in capre infettate sperimentalmente: A) igM fase 2 C) IgM fase 1 B) igG fase 2 e D) igG fase 1 rispetto ai controlli non infetti. (Roest et al., 2013).

- Abnave P, Muracciole X, Ghigo E. Coxiella burnetii Lipopolysaccharide: What Do We Know? *Int J Mol Sci.* 2017 Nov 23;18(12):2509. doi: 10.3390/ijms18122509. PMID: 29168790; PMCID: PMC5751112.
- Anderson AD, Kruszon-Moran D, Loftis AD, McQuillan G, Nicholson WL, Priestley RA, Candee AJ, Patterson NE, Massung RF. Seroprevalence of Q fever in the United States, 2003-2004. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 Oct;81(4):691-4. doi: 10.4269/ajtmh.2009.09-0168. PMID: 19815888.
- Babudieri B. 1959. Q fever: a zoonosis. *Adv Vet Sci*:81–182
- Beare PA, Samuel JE, Howe D, Virtaneva K, Porcella SF, Heinzen RA. Genetic diversity of the Q fever agent, *Coxiella burnetii*, assessed by microarray-based whole-genome comparisons. *J Bacteriol.* 2006 Apr;188(7):2309-24. doi: 10.1128/JB.188.7.2309-2324.2006. PMID: 16547017; PMCID: PMC1428397.
- Beare PA, Unsworth N, Andoh M, Voth DE, Omsland A, Gilk SD, et al. Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus *Coxiella*. *Infect. Immun.* 2009;77:642–56.
- Benoit M, Barbarat B, Bernard A, Olive D, Mege JL. *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, stimulates an atypical M2 activation program in human macrophages. *Eur J Immunol.* 2008 Apr;38(4):1065-70. doi: 10.1002/eji.200738067. PMID: 18350541.
- Boschini A, Di Perri G, Legnani D, Fabbri P, Ballarini P, Zucconi R, Boros S, Rezza G. Consecutive epidemics of Q fever in a residential facility for drug abusers: impact on persons with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis.* 1999 Apr;28(4):866-72. doi: 10.1086/515192. PMID: 10825052.
- Capo C, Lindberg FP, Meconi S, Zaffran Y, Tardei G, Brown EJ, Raoult D, Mege JL. Subversion of monocyte functions by *Coxiella burnetii*: impairment of the cross-talk between α v β 3 integrin and CR3. *J Immunol.* 1999 Dec 1;163(11):6078-85. PMID: 10570297.
- Capuano F, Landolfi MC, Monetti DM. Influence of three types of farm management on the seroprevalence of Q fever as assessed by an indirect immunofluorescence assay. *Vet Rec.* 2001 Dec 1;149(22):669-71. doi: 10.1136/vr.149.22.669. PMID: 11765323.
- Chisu V, Loi F, Foxi C, Chessa G, Masu G, Rolesu S, Masala G. Coexistence of Tick-Borne Pathogens in Ticks Collected from their Hosts in Sardinia: an Update. *Acta Parasitol.* 2020 Dec;65(4):999-1004. doi: 10.1007/s11686-020-00240-z. Epub 2020 Jun 15. PMID: 32557083.

- Delsing CE, Kullberg BJ, Bleeker-Rovers CP. Q fever in the Netherlands from 2007 to 2010. *Neth J Med*. 2010 Dec;68(12):382-7. PMID: 21209463.
- Delsing CE, Warris A, Bleeker Rovers CP (2011) Q fever: still more queries than answers. In *Hot Topics in Infection and Immunity in Children VIII*. Springer New York, USA, pp. 133-143.
- Dijkstra F, van der Hoek W, Wijers N, Schimmer B, Rietveld A, Wijkmans CJ, Vellema P, Schneeberger PM. The 2007–2010 Q fever epidemic in The Netherlands: characteristics of notified acute Q fever patients and the association with dairy goat farming. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012 Feb;64(1):3-12. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00876.x. PMID: 22066649.
- Dragan AL, Voth DE. *Coxiella burnetii*: international pathogen of mystery. *Microbes Infect*. 2020 Apr;22(3):100-110. doi: 10.1016/j.micinf.2019.09.001. Epub 2019 Sep 28. PMID: 31574310; PMCID: PMC7101257.
- Eldin C, Mélenotte C, Mediannikov O, Ghigo E, Million M, Edouard S, Mege JL, Maurin M, Raoult D. From Q Fever to *Coxiella burnetii* Infection: a Paradigm Change. *Clin Microbiol Rev*. 2017 Jan;30(1):115-190. doi: 10.1128/CMR.00045-16. PMID: 27856520; PMCID: PMC5217791.
- Gache K, Rousset E, Perrin JB, DE Cremoux R, Hosteing S, Jourdain E, Guatteo R, Nicollet P, Touratier A, Calavas D, Sala C. Estimation of the frequency of Q fever in sheep, goat and cattle herds in France: results of a 3-year study of the seroprevalence of Q fever and excretion level of *Coxiella burnetii* in abortive episodes. *Epidemiol Infect*. 2017 Nov;145(15):3131-3142. doi: 10.1017/S0950268817002308. Epub 2017 Oct 17. PMID: 29039279.
- Galluzzo P, Villari S, Geraci F, Sciacca C, Grippi F, Currò V, Chiarenza G. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in dairy cattle from Sicily. *Vet Ital*. 2019 Sep 20;55(3):247-252. doi: 10.12834/VetIt.1391.7602.2. PMID: 31599549.
- Ghigo E, Colombo MI, Heinzen RA. The *Coxiella burnetii* parasitophorous vacuole. *Adv Exp Med Biol*. 2012;984:141-69. doi: 10.1007/978-94-007-4315-1_8. PMID: 22711631.
- Hackstadt T. Biosafety concerns and *Coxiella burnetii*. *Trends Microbiol*. 1996 Sep;4(9):341-2. doi: 10.1016/0966-842x(96)81555-1. PMID: 8885166.

- Hogerwerf L, van den Brom R, Roest HI, Bouma A, Vellema P, Pieterse M, Dercksen D, Nielen M. Reduction of *Coxiella burnetii* prevalence by vaccination of goats and sheep, The Netherlands. *Emerg Infect Dis*. 2011 Mar;17(3):379-86. doi: 10.3201/eid1703.101157. PMID: 21392427; PMCID: PMC3166012.
- Karagiannis I, Schimmer B, Van Lier A, Timen A, Schneeberger P, Van Rotterdam B, De Bruin A, Wijkmans C, Rietveld A, Van Duynhoven Y. Investigation of a Q fever outbreak in a rural area of The Netherlands. *Epidemiol Infect*. 2009 Sep;137(9):1283-94. doi: 10.1017/S0950268808001908. Epub 2009 Jan 23. PMID: 19161644.
- Kowalczywska M, Sekeyová Z, Raoult D. Proteomics paves the way for Q fever diagnostics. *Genome Med*. 2011 Jul 30;3(7):50. doi: 10.1186/gm266. PMID: 21801463; PMCID: PMC3221545.
- Langley JM, Marrie TJ, Covert A, Waag DM, Williams JC. Poker players' pneumonia. An urban outbreak of Q fever following exposure to a parturient cat. *N Engl J Med*. 1988 Aug 11;319(6):354-6. doi: 10.1056/NEJM198808113190607. PMID: 3393197.
- Madariaga MG, Rezai K, Trenholme GM, Weinstein RA. Q fever: a biological weapon in your backyard. *Lancet Infect Dis*. 2003 Nov;3(11):709-21. doi: 10.1016/s1473-3099(03)00804-1. PMID: 14592601.
- Magouras I, Hunninghaus J, Scherrer S, Wittenbrink MM, Hamburger A, Stärk KD, Schüpbach-Regula G. *Coxiella burnetii* Infections in Small Ruminants and Humans in Switzerland. *Transbound Emerg Dis*. 2017 Feb;64(1):204-212. doi: 10.1111/tbed.12362. Epub 2015 Apr 29. PMID: 25922932.
- Manfredi Selvaggi T, Rezza G, Scagnelli M, Rigoli R, Rassu M, De Lalla F, Pellizzer GP, Tramarin A, Bettini C, Zampieri L, Belloni M, Pozza ED, Marangon S, Marchioretto N, Togni G, Giacobbo M, Todescato A, Binkin N. Investigation of a Q-fever outbreak in northern Italy. *Eur J Epidemiol*. 1996 Aug;12(4):403-8. doi: 10.1007/BF00145305. PMID: 8891546.
- Martinez E, Cantet F, Fava L, Norville I, Bonazzi M. Identification of OmpA, a *Coxiella burnetii* protein involved in host cell invasion, by multi-phenotypic high-content screening. *PLoS Pathog*. 2014 Mar 20;10(3):e1004013. doi: 10.1371/journal.ppat.1004013. PMID: 24651569; PMCID: PMC3961360.
- Masala G, Porcu R, Sanna G, Chessa G, Cillara G, Chisu V, Tola S. Occurrence, distribution, and role in abortion of *Coxiella burnetii* in

- sheep and goats in Sardinia, Italy. *Vet Microbiol.* 2004 Apr 19;99(3-4):301-5. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.01.006. PMID: 15066733.
- Maurin M, Raoult D. Q fever. *Clin Microbiol Rev.* 1999 Oct;12(4):518-53. PMID: 10515901; PMCID: PMC88923.
- Meconi S, Capo C, Remacle-Bonnet M, Pommier G, Raoult D, Mege JL. Activation of protein tyrosine kinases by *Coxiella burnetii*: role in actin cytoskeleton reorganization and bacterial phagocytosis. *Infect Immun.* 2001 Apr;69(4):2520-6. doi: 10.1128/IAI.69.4.2520-2526.2001. PMID: 11254615; PMCID: PMC98187.
- Mertens K, Samuel JE. Defense mechanisms against oxidative stress in *Coxiella burnetii*: adaptation to a unique intracellular niche. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012;984:39–63.
- Moretti B. (1984) La febbre q nei bovini con particolare riguardo alla colonizzazione di *Coxiella burnetii* nella mammella. *Ann. Ist. Super. Sanità.* Vol. 20. N 4, pp 317-328.
- Perugini AG, Capuano F, Esposito A, Marianelli C, Martucciello A, Iovane G, Galiero G. Detection of *Coxiella burnetii* in buffaloes aborted fetuses by IS111 DNA amplification: a preliminary report. *Res Vet Sci.* 2009 Oct;87(2):189-91. doi: 10.1016/j.rvsc.2009.01.005. Epub 2009 Feb 15. PMID: 19232419.
- Rizzo F, Vitale N, Ballardini M, Borromeo V, Luzzago C, Chiavacci L, Mandola ML. Q fever seroprevalence and risk factors in sheep and goats in northwest Italy. *Prev Vet Med.* 2016 Aug 1;130:10-7. doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.05.014. Epub 2016 May 31. PMID: 27435642.
- Roest HI, Tilburg JJ, van der Hoek W, Vellema P, van Zijderveld FG, Klaassen CH, Raoult D. The Q fever epidemic in The Netherlands: history, onset, response and reflection. *Epidemiol Infect.* 2011 Jan;139(1):1-12. doi: 10.1017/S0950268810002268. Epub 2010 Oct 5. PMID: 20920383.
- Roest HJ, van Gelderen B, Dinkla A, Frangoulidis D, van Zijderveld F, Rebel J, van Keulen L. Q fever in pregnant goats: pathogenesis and excretion of *Coxiella burnetii*. *PLoS One.* 2012;7(11):e48949. doi: 10.1371/journal.pone.0048949. Epub 2012 Nov 9. PMID: 23152826; PMCID: PMC3494687.
- Roest HI, Post J, van Gelderen B, van Zijderveld FG, Rebel JM. Q fever in pregnant goats: humoral and cellular immune responses. *Vet Res.* 2013 Aug 1;44(1):67. doi: 10.1186/1297-9716-44-67. PMID: 23915213; PMCID: PMC3751198.

- Ruiz-Fons F, Rodríguez O, Torina A, Naranjo V, Gortázar C, de la Fuente J. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in wild and farmed ungulates. *Vet Microbiol.* 2008 Jan 1;126(1-3):282-6. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.06.020. Epub 2007 Jun 28. PMID: 17669603.
- Sivabalan P, Saboo A, Yew J, Norton R. Q fever in an endemic region of North Queensland, Australia: A 10 year review. *One Health.* 2017 Mar 4;3:51-55. doi: 10.1016/j.onehlt.2017.03.002. PMID: 28616504; PMCID: PMC5454161.
- Starnini G, Caccamo F, Farchi F, Babudieri S, Brunetti B, Rezza G. An outbreak of Q fever in a prison in Italy. *Epidemiol Infect.* 2005 Apr;133(2):377-80. doi: 10.1017/s0950268804003383. PMID: 15816166; PMCID: PMC2870260.
- Szymańska-Czerwińska M, Galińska EM, Niemczuk K, Knap JP. Prevalence of *Coxiella burnetii* Infection in Humans Occupationally Exposed to Animals in Poland. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2015 Apr;15(4):261-7. doi: 10.1089/vbz.2014.1716. PMID: 25897813; PMCID: PMC4410189.
- Tissot-Dupont H, Amadei MA, Nezri M, Raoult D. Wind in November, Q fever in December. *Emerg Infect Dis.* 2004 Jul;10(7):1264-9. doi: 10.3201/eid1007.030724. PMID: 15324547; PMCID: PMC3323349.
- Verso MG, Vesco G, Villari S, Galluzzo P, Gargano V, Matranga D, De Marchis P, Picciotto D. Analysis of seroprevalence against *Coxiella burnetii* in a sample of farm workers in Western Sicily. *Ann Agric Environ Med.* 2016;23(1):71-4. doi: 10.5604/12321966.1196855. PMID: 27007520.
- Vicari N, Faccini S, Ricchi M, Garbarino C, Decastelli L, Boldini M, Rosignoli C, Dalmaso A, Bronzo V, Fabbi M. Occurrence of *Coxiella burnetii* in bulk tank milk from northwestern Italy. *Vet Rec.* 2013 Jun 29;172(26):687. doi: 10.1136/vr.101423. Epub 2013 May 25. PMID: 23709093.
- Vigil A, Chen C, Jain A, Nakajima-Sasaki R, Jasinskas A, Pablo J, Hendrix LR, Samuel JE, Felgner PL. Profiling the humoral immune response of acute and chronic Q fever by protein microarray. *Mol Cell Proteomics.* 2011 Oct;10(10):M110.006304. doi: 10.1074/mcp.M110.006304. Epub 2011 Aug 4. PMID: 21817167; PMCID: PMC3205856.
- Whitney EA, Massung RF, Candee AJ, Ailes EC, Myers LM, Patterson NE, Berkelman RL. Seroepidemiologic and occupational risk survey for *Coxiella burnetii* antibodies among US veterinarians. *Clin Infect Dis.* 2009 Mar 1;48(5):550-7. doi: 10.1086/596705. PMID: 1919163.

Capitolo 3

Dalla diagnosi alla profilassi

3.1 Sintomatologia negli animali domestici

L'infezione da *C. burnetii* negli animali è principalmente subclinica e le manifestazioni più comuni riscontrate nei ruminanti domestici sono ascrivibili a disturbi della sfera riproduttiva, come aborto, natimortalità e infertilità.

Gran parte degli animali infetti risulta completamente asintomatico e persino privo di febbre, mentre solo raramente si possono riscontrare segni di polmonite (Berri et al., 2007).

Durante la forma acuta, la presenza del microrganismo può essere dimostrata nel sangue, nei polmoni, nella milza e nel fegato.

I siti primari dell'infezione cronica, invece, sono l'utero e la ghiandola mammaria. Quest'ultima viene colonizzata da *Coxiella*, provocando i disturbi prima descritti e, in rari casi, mastite. L'eliminazione del batterio ripercorre a pieno la patogenesi, infatti avviene principalmente con il prodotto del concepimento, o dell'aborto, e attraverso il latte (Maurin & Raoult; 1999).

L'evento aborto è influenzato da fattori intrinseci all'ospite oltre che individuali, tra cui, ad esempio, la specie animale (infatti risulta più frequente negli ovicaprini che nella specie bovina, in cui comunque è descritta riduzione della fertilità) (Lang et al., 1991).

C. burnetii sembrerebbe in grado di modificare i "patterns" endocrini durante la gestazione ed indurre in questo modo dei danni placentari ed una diminuzione dei livelli di "pregnancy associated glycoproteins" (PAG) nel sangue (Garcia-Isperto et al., 2010).

A differenza di quanto si verifica nell'uomo, la forma cronica non provoca l'instaurarsi di endocarditi, anche se è possibile riscontrare il DNA del patogeno in lesioni valvolari come reperti occasionali di macellazione, che indicherebbero comunque una colonizzazione del tessuto endocardico (Agerholm et al., 2017).

L'esame anatomopatologico effettuato su animali infetti non denota lesioni specifiche e lo stesso vale per i feti abortiti, che non presentano danni evidenti a livello macroscopico.

Questi ultimi, uniti alle placente, possono esibire svariati pattern istopatologici (Hansen et al., 2011).

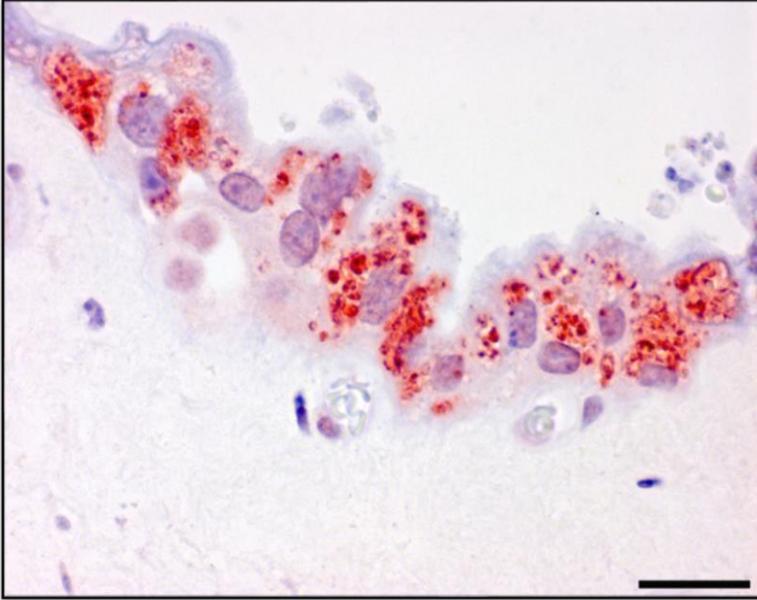


Fig. 16 Colorazione immunoistochimica di C. burnetii all'interno del citoplasma di trofoblasti cotiledonari bovini. Questi ultimi non presentano segni di infiammazione nello stroma adiacente o alterazioni nucleari (Hansen et al., 2011).

3.2 Sintomatologia nell'uomo

Le manifestazioni cliniche della malattia nell'uomo sono piuttosto variabili, al punto che il polimorfismo clinico rende la diagnosi difficoltosa. Il periodo di incubazione è stimato approssimativamente in 20 giorni (range da 14 a 39 giorni) e un individuo non immunizzato sviluppa la forma acuta nel 60% dei casi.

Essa si manifesta sottoforma di sindromi febbrili (brividi, cefalea, malessere, sudorazione intensa, febbre, tosse, dolori toracici) a carattere autolimitante (spesso si risolve spontaneamente dopo 2-6 settimane), ma in molti casi debilitante, e può includere segni di severa polmonite che, nel 27% dei pazienti affetti, sfocia in atipica, osservabile tramite esame radiologico del torace (Tissot-Dupont et al., 2007).

L'infezione cronica (2-5% dei pazienti affetti da infezione acuta) è caratterizzata da una grave endocardite, e si verifica con più facilità in individui predisposti (concomitanza di immunodepressione, tumori, valvulopatie ecc.) (Maurin & Raoult; 1999).

L'endocardite può essere fatale se non trattata, e richiede, oltre alla diagnosi tempestiva, trattamenti antibiotici specifici e di lunga durata (anche a vita). Le dinamiche coinvolte nella migrazione del patogeno dal polmone alle valvole cardiache, non sono state ancora definite.

Altri sintomi della forma cronica includono infezioni vascolari, ossee ed epatiti croniche (Tissot-Dupont et al., 2007).

Tab. 3 Principali sintomi e reperti di laboratorio osservabili in soggetti sintomatici (Maurin & Raoult; 1999).

Clinical findings	% of patients with indicated findings	Biological findings	% of patients with indicated findings
Fever	88-100	Normal leukocyte count	90
Fatigue	97-100	Thrombocytopenia	25
Chills	68-88	Increased transaminase levels	45-85
Headache	68-98	Increased bilirubin levels	9-14.3
Myalgia	47-69	Increased alkaline phosphatase levels	27.7-57
Sweats	31-98	Increased γ -glutamyl transferase levels	25-75
Cough	24-90	Increased creatine phosphokinase levels	29
Nausea	22-49	Increased lactate-dehydrogenase levels	33.3-40
Vomiting	13-42	Increased creatinine levels	29-40
Chest pain	10-45	Elevated erythrocyte sedimentation rate	43-87.5
Diarrhea	5-22	Smooth muscle antibodies	65
Skin rash	5-21	Antiphospholipase antibodies	50
Myocarditis	0.5-1		
Pericarditis	1		
Meningoencephalitis	1		
Death	1-2		

Il microrganismo può persistere nel midollo osseo e la malattia può riattivarsi in seguito a fattori predisponenti, come ad esempio stress prolungati.

Sesso ed età possono influenzare le caratteristiche delle infezioni: gli uomini presentano maggiore probabilità di contrarre forme sintomatiche rispetto alle donne a parità di esposizione (il numero dei casi nei soggetti di sesso maschile è 2.5 volte maggiore), e la suscettibilità all'infezione sembrerebbe aumentare con l'età (soggetti di età inferiore ai 15 anni sembrerebbero refrattari) (Angelakis & Raoult; 2010).

Nelle donne gestanti si assiste a più alta morbilità e mortalità rispetto a donne non partorienti, e sembrerebbero sottoposte anche a un rischio più elevato di sviluppare infezioni croniche.

3.3 Diagnosi in veterinaria

Nei ruminanti, trattandosi di una malattia con decorso principalmente asintomatico se non per l'evidenza di manifestazioni abortigene, la diagnosi su base esclusivamente clinica o anatomopatologica risulta impossibile, per questo motivo quando l'orientamento diagnostico permette di sospettarne la presenza, il veterinario si concentra sull'interpretazione dei risultati offerti dal laboratorio (Berri et al., 2007).

Come per tutte le malattie infettive, la diagnosi di laboratorio si divide in diretta e indiretta.

Tra le tecniche di tipo diretto vi sono le tecniche convenzionali di colorazione (Stamp, Gimenez, Macchiavello, Giemsa e Koster modificata), utilizzabili nel contesto della diagnosi di aborto infettivo, effettuabili con vetrini per impronta su feti, placente e tamponi vaginali, ma scarsamente sensibili e specifiche poiché *Coxiella* appare come una struttura bastoncellare rossastra, confondibile con altri agenti abortigeni come *Chlamydophila abortus* o *Brucella spp.* (EFSA; 2010). Decisamente più specifiche risultano le tecniche di colorazione immunoistochimica, anche se poco utilizzate ai fini della diagnosi eziologica.

L'isolamento può invece essere effettuato con l'ausilio di cellule epiteliali renali di cercopiteco grigioverde (VERO) o uova embrionate di pollo, metodi scarsamente utilizzati nella pratica clinica poiché richiedono specializzazione da parte dell'operatore, laboratori con requisiti di biosicurezza elevati "*biosafety level*" (BLS3) e soprattutto necessitano di tempi prolungati per i risultati (di solito anche più di due settimane). L'inoculo in animali da laboratorio (come topo e guinea pigs) e la successiva asportazione e colorazione della milza ha esclusivamente un'importanza storica (tramite queste metodiche è avvenuta la scoperta dell'agente eziologico) ed è di scarsa applicazione per gli stessi ostacoli sopra descritti, cui si aggiungono problemi di carattere etico (EFSA; 2010).

Ad oggi, tra le tecniche che si basano sulla determinazione diretta dell'agente patogeno, la PCR è decisamente la più utilizzata, in grado di coniugare rapidità e sensibilità nell'identificazione del patogeno negli animali eliminatori.

Sia nella versione qualitativa, che in quella quantitativa (real-time PCR), si parte da campioni e matrici di natura diversa: escreti vaginali, materiale abortito (i cotiledoni risultano il tessuto di elezione), organi fetali, latte (sia individuale che massale) e feci.

Quando non si hanno a disposizione né placenta, né il feto è possibile ovviare al problema effettuando un tampone vaginale, eseguito entro 7 giorni dal parto o dall'aborto per ottenere un risultato dotato di un'adeguata attendibilità (Sidi-Boumedine et al., 2010).

I tamponi vaginali possono essere effettuati anche in animali con sintomatologia clinica ascrivibile a metrite.

Le tecniche di biologia molecolare sono sensibili e piuttosto rapide, di utilizzo ormai comune anche per questa infezione, il cui target genetico più raccomandato ai fini dell'amplificazione è la sequenza multicopia d'inserzione IS1111 (Berri et al., 2000).

La Real-time PCR è addirittura considerata la più sensibile e rapida metodica per l'identificazione degli animali eliminatori, e i recenti progressi relativi a queste tecniche diagnostiche hanno permesso di quantificare il microrganismo in matrici di varia natura, utilizzando scale logaritmiche che offrono ulteriori informazioni circa l'infezione.

Attualmente, non esiste ancora una soglia standardizzata ufficialmente a livello internazionale per la Real-time PCR quantitativa, anche se in uno studio francese si è proposto il valore soglia di 10^4 per l'identificazione da placenta o tampone vaginale, e 10^3 per i tessuti e il contenuto abomasale del feto (de Cremoux et al., 2012).

Anche l'applicazione della Real time-PCR al latte di massa ha riscosso negli anni un discreto successo, legato soprattutto alla praticità e alla semplicità del campionamento, ma anche alla rapidità con cui è possibile constatare la presenza di eliminatori in azienda. Questa metodica è stata utilizzata, tra l'altro, come test ufficiale nell'estinzione del focolaio olandese.

Sebbene la PCR presenti numerosi vantaggi, è una metodica costosa e basata sull'effettiva presenza del DNA batterico nei campioni analizzati. Ciò può rappresentare in alcuni casi un limite, se si considera l'eliminazione incostante del batterio (Rousset et al., 2009).

Infatti, l'eliminazione avviene attraverso numerose vie, in maniera differente nelle diverse specie ed è, in alcuni casi, intermittente (Natale et al., 2012).

Per questo motivo le tecniche di diagnosi indiretta sono largamente utilizzate come test di screening, specie se effettuati su larga scala e/o in studi epidemiologici.

A causa della natura della metodica, i test sierologici individuano solo la risposta immunitaria all'infezione e per questo motivo tali metodi si dimostrano estremamente utili per lo screening su larga scala, mentre possiedono scarsa affidabilità a livello individuale (Paul et al., 2013).

Tra i test sierologici maggiormente utilizzati troviamo l'immunofluorescenza indiretta (IFA), la fissazione del complemento (FDC), e l'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

La fissazione del complemento, test ampiamente utilizzato in passato come test sierologico di elezione in situazioni endemiche, è oggi passato in secondo piano poiché numerosi studi ne hanno evidenziato le ridotte performances diagnostiche comparate agli altri test sierologici, specie negli ovicapri (Rousset et al., 2009).

Il test, eseguibile esclusivamente su siero di sangue, utilizza antigeni derivanti sia da un ceppo umano (*Henzerling*) che da un ceppo isolato dalle zecche (*Nine Mile*) (OIE, 2008). La prova viene considerata positiva con un titolo di 1/10, anche se i titoli compresi fra 1/10 e 1/40 possono rappresentare infezioni latenti, mentre nel caso di titoli pari o superiori a 1/80 in un gruppo di animali si ha l'evidenza di circolazione attiva dell'agente eziologico nella mandria (OIE; 2008).

Numerosi studi hanno evidenziato come la sensibilità di questo test sia bassa mentre la specificità è abbastanza elevata grazie al cospicuo numero di anticorpi anti-*C. burnetii* che compaiono negli animali che hanno abortito, in particolare nei bovini (Rousset et al., 2007; Kittelberger et al., 2009; Horigan et al., 2011; Natale et al., 2012; Emery et al., 2014).

L'immunofluorescenza (IFA) è un test dotato di buone performances, ampiamente utilizzato, anche se non esistono kit in commercio destinati ad uso veterinario (vengono adattati kit ad uso umano), e per questo motivo necessita di adeguamenti durante l'allestimento. Rispetto agli altri test sierologici è più costoso, e necessita di esperienza ed interpretazione da parte dell'operatore (EFSA; 2010).

L'ELISA è decisamente il test sierologico più utilizzato, grazie alla versatilità e ripetibilità, è, difatti, il test di scelta raccomandato per la diagnosi di febbre Q in Unione Europea (EFSA; 2010).

Il principale limite diagnostico del test ELISA è conseguente alla lunga persistenza degli anticorpi prodotti contro *C. burnetii*, per cui la positività al test non permette di definire lo stato sanitario dell'animale, ma solo che il soggetto è venuto precedentemente a contatto con il batterio.

In conclusione, nessuna di queste metodiche è stata riconosciuta come test ufficiale dall'OIE, pertanto una diagnosi accurata non può prescindere dalla combinazione di metodologie di natura differente e da una interpretazione meticolosa.

3.4 Diagnosi nell'uomo

Anche nell'uomo, visti i sintomi estremamente aspecifici e mai patognomonicamente, la diagnosi eziologica si basa necessariamente sul supporto del laboratorio, fondamentale anche ai fini di una diagnosi differenziale.

Le metodiche utilizzate sono le stesse descritte per gli animali (ELISA, FDC, IFA), anche se in umana i progressi raggiunti sono tali da poter differenziare i soggetti infetti in forma acuta da quelli affetti dalla forma cronica (specie per l'immunofluorescenza) (Tissot-Dupont and Raoult; 2007). Questo perché la risposta nei confronti degli antigeni di fase I e II varia con l'andamento dell'infezione.

La naturale risposta anticorpale nelle prime fasi di infezioni è, infatti, principalmente diretta alle componenti proteiche della fase II, mentre successivamente e nelle fasi croniche è diretta principalmente verso l'antigene O del LPS (fase I).

Utilizzando antigeni di fase I e II del ceppo *Nine Mile* in parallelo è possibile anche determinare le sottoclassi interessate, ciò viene sfruttato soprattutto in IFA.

Nella fase acuta la risposta immunitaria è caratterizzata da IgM e IgG indirizzate verso la fase II, generalmente identificabili solo nella seconda settimana di malattia. Nella forma cronica, invece, predominano le IgG e IgA dirette verso entrambe le fasi, con crescita esponenziale degli anticorpi nei confronti della fase I (Kowalczywska et al., 2011).

Questo avviene perché l'esposizione degli antigeni di fase I avviene gradualmente, a causa dei meccanismi di immunoevasione messi in atto dal patogeno e, di conseguenza, il raggiungimento di un titolo anticorpale quantificabile con un test di laboratorio, richiede tempo.

I *cut-off* di riferimento per l'IFA sono minuziosamente standardizzati in modo da poter interpretare i diversi pattern anticorpali: i sieri sono considerati positivi alla diluizione 1:50 per le IgM e 1:200 per le IgG anti-fase II (Maurin e Raoult, 1999), mentre positività per sieri diluiti 1:800 per IgG anti-fase I sono indicative di infezione cronica (Fournier et al., 1998). Nelle forme croniche vi è anche un aumento delle IgA nei confronti della fase I (Kowalczywska et al., 2011).

In un paziente con anamnesi di febbre Q acuta, se si assiste ad aumento di anticorpi nei confronti della fase I, con annessa riduzione di quelli diretti verso la fase II, si deve sospettare l'evoluzione in una forma cronica, specie in assenza dei sintomi tipici di infiammazione (Maurin e Raoult; 1999).

Entrambi gli anticorpi possono persistere per mesi o anni dopo l'esposizione (Maurin and Raoult; 1999).

3.5 Limiti e problematiche della diagnostica sierologica

Non esiste ufficialmente un test *gold standard* per la diagnosi sierologica di febbre Q nei ruminanti domestici (OIE; 2008).

Attualmente i test che costituiscono la routine diagnostica veterinaria sono dei kit ELISA contenenti antigeni corpuscolari (*whole cell antigen*) di entrambe le fasi, scarsamente standardizzati e che spesso offrono risultati discordanti (specialmente quelli in campo) (Rousset et al., 2007).

Tali antigeni non sono mai stati completamente definiti e sono costituiti da numerose proteine che potrebbero inficiare la specificità del test, provocando cross reazioni con altri batteri come *Bartonella spp.*, *Legionella spp.*, *Chlamydia spp.*, *Rickettsia* ecc. (La Scola & Raoult; 1996; Musso & Raoult; 1997; Lukacova et al., 1999).

Anche la varianza antigenica tra i ceppi di *Coxiella* circolanti sui territori concorre nel ridurre le performances del test (Beare et al., 2009).

La produzione di questi antigeni è, inoltre, strettamente legata alla coltivazione del patogeno (in particolare dei ceppi di riferimento), per cui risulta costosa, richiede laboratori con elevati requisiti di biosicurezza e personale specializzato.

Anche residui di sacco vitellino o di colture cellulari utilizzate per la preparazione dell'antigene possono limitare le performances dei futuri test (Beare et al., 2009).

Diversi studi hanno evidenziato i numerosi limiti dei test sierologici utilizzati in veterinaria, descrivendo notevoli differenze in termini di performances a seconda del kit utilizzato, della specie e della matrice presa in considerazione (Horigan et al., 2011).

Ad esempio, sono state evidenziate sensibilità del 86% per campioni di latte e 84% per campioni di sangue nel bovino (Paul et al., 2013), e meno del 58% nella capra indipendentemente dalla matrice utilizzata (Hogerwerf et al., 2014).

A fronte di queste limitazioni, non sorprende che un significativo numero di animali venga riscontrato sieronegativo ed eliminatore allo stesso tempo (Natale et al., 2012).

Poiché non è possibile ottenere informazioni circa lo stadio di infezione, ne consegue che non è possibile differenziare gli animali affetti da forma acuta

e quelli con forma cronica, né tanto meno sono disponibili protocolli DIVA (*Differentiate Infected from Vaccinated Animals*) tali da consentire di differenziare gli animali infetti da quelli vaccinati (Fernandes et al., 2009; Horigan et al., 2011; Gerlach et al., 2017).

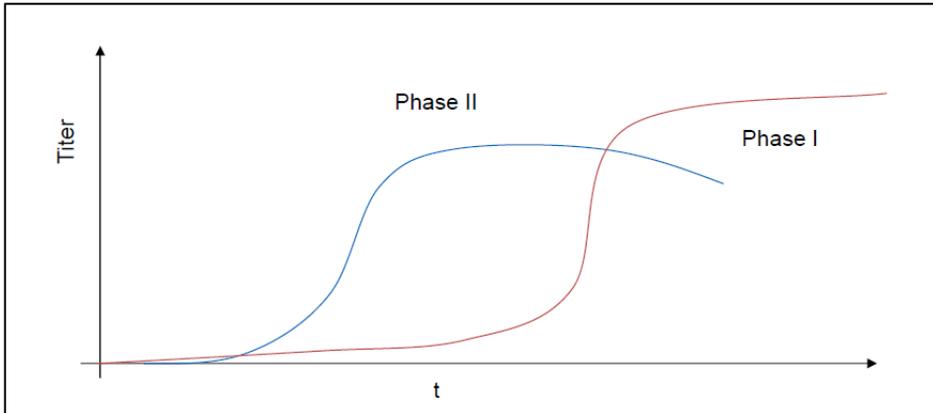


Fig .17 Rappresentazione schematica della comparsa di anticorpi anti-phase II e anti-phase I nel tempo. Si nota che nelle prime fasi di infezione non si assiste a sieroconversione. (Janowitz et al., 2017)

3.6 Profilassi

La profilassi nei confronti della febbre Q verte su tre capisaldi fondamentali: limitare la trasmissione dell'infezione da soggetti infetti a quelli sani; limitare l'eliminazione dell'agente eziologico negli animali infetti; ridurre la percentuale di soggetti sensibili nella popolazione. Se queste misure vengono implementate contemporaneamente e in maniera efficace, è possibile controllare la diffusione di *C. burnetii* nel proprio allevamento, e di conseguenza, nei confronti della popolazione umana. Le prime due misure possono essere ottenute con l'applicazione di misure di profilassi sanitaria, mentre per soddisfare il terzo cardine è necessario ricorrere risolutamente alla vaccinazione degli animali (Guatteo et al., 2008).

Immunizzante:

La vaccinazione è una strategia logica ed efficace per la prevenzione della febbre Q nei ruminanti domestici.

L'unico vaccino disponibile in Europa è il Coxevac (CEVA, Santé animal, France), costituito dal ceppo *Nine Mile* di fase I inattivato, privo di adiuvanti e fruibile per bovini e caprini. Tale vaccino è stato registrato e autorizzato all'uso in Italia solo nel 2013.

I vaccini di fase II, ottenuti a partire dalla fase I dopo diversi passaggi in uova embrionate, si sono invece dimostrati completamente impotenti nell'offrire protezione agli animali, in quanto, anche se più maneggevoli, apparivano meno immunogeni (Arricau-Bouvery et al., 2005). Tali vaccini risultavano dalle 100 alle 300 volte meno efficaci rispetto al relativo vaccino di fase I (Beare et al., 2018).

La vaccinazione riduce fortemente la colonizzazione della placenta, riducendo la disseminazione attraverso le consuete vie (fluidi vaginali, latte e feci) e previene il fenomeno dell'aborto (limitando, dunque, le perdite economiche da esso scaturite) (EMA; 2010).

Hogerwerf *et al* (2011) confermano la riduzione della carica batterica nei fluidi uterini, nei tamponi vaginali e nel latte in seguito a vaccinazione con Coxevac in vacche da latte, dimostrando come la vaccinazione riduca la contaminazione ambientale e, di conseguenza, moderi l'eventuale esposizione degli animali e dell'uomo al patogeno. Un animale vaccinato esposto ad infezione sperimentale ha una probabilità cinque volte inferiore di infettarsi e diventare eliminatore rispetto a un animale non immunizzato (EMA; 2010).

Il target della vaccinazione è rappresentato da animali di età superiore a 3 mesi, cui è necessario somministrare 2 dosi (4 mL nelle vacche e 2 mL nelle capre) per via sottocutanea e a tre settimane di distanza, garantendo il completamento del protocollo vaccinale tre settimane prima dell'inseminazione artificiale o dell'accoppiamento (EMA; 2010). Infatti, le vacche vaccinate durante la gravidanza mantengono inalterata la probabilità di diventare eliminatori, qualora esposte al microrganismo, probabilmente per l'effetto negativo che la gravidanza espleta sulla risposta immunitaria cellulo-mediata (EMA; 2010).

Nonostante la vaccinazione sia sconsigliata negli animali gravidi, non sono stati evidenziati effetti teratogeni o abortigeni conseguenti alla somministrazione del vaccino (Guatteo et al., 2008).

Il richiamo è raccomandato a 280 giorni dall'ultima vaccinazione, mentre non sono state evidenziate reazioni avverse in animali che in precedenza hanno contratto l'infezione. Tuttavia, durante le sperimentazioni non è stato possibile stabilire l'inizio dell'immunità, né tanto meno esistono informazioni sulle dinamiche relative al calo del livello di protezione.

Nella specie ovina la sperimentazione non ha fornito dati tali da giustificare l'utilizzo, così come non si hanno evidenze sull'efficacia e sui benefici nei soggetti di sesso maschile (nonostante ne sia stata appurata l'innocuità) (EMA; 2010).

Durante le campagne di vaccinazione è necessario considerare che il materiale genetico del ceppo vaccinale può falsare eventuali prove diagnostiche dirette (Hermans et al., 2011).

Nel dicembre del 2009, nei Paesi Bassi, fu indetta la vaccinazione obbligatoria per tutti gli allevamenti localizzati in prossimità del focolaio e, in parallelo, le aziende venivano monitorate tramite Real time PCR su latte di massa, allo scopo di identificare gli animali eliminatori e le aziende positive, destinatarie delle misure di contenimento.

Hermans *et al* (2011) dimostrarono come fosse possibile individuare il DNA del ceppo vaccinale nel latte fino a 9 giorni dopo la vaccinazione. Le autorità olandesi reagirono a tale evidenza modificando il protocollo di monitoraggio e impostando un intervallo di attesa di due settimane tra l'avvenuta vaccinazione e il prelievo di latte per il test ufficiale.

Anche in medicina umana esiste un vaccino, chiamato Q vax (CSL Limited, Parkville, Victoria, Australia), derivato da un ceppo *Henzerling* di fase I (RSA 334) inattivato tramite formaldeide, disponibile e utilizzato dal 1989 in Australia (Arricau-Bouvery & Rodolakis; 2005), dove viene somministrato per proteggere figure professionali particolarmente esposte al

rischio di infezione come veterinari, abbattitori, laboratoristi. Il suo utilizzo è limitato all'Australia, anche se è stato utilizzato in Olanda durante l'epidemia del 2007-2011 per immunizzare passivamente la popolazione. Ad oggi, risulta l'unico presidio vaccinale disponibile a livello commerciale, estremamente efficace e non necessita di ulteriori richiami (Arricau-Bouvery & Rodolakis; 2005).

La diffusione a livello mondiale, invece, non ha riscosso grande successo per la necessità di screening pre-somministrazione: una precedente esposizione al patogeno potrebbe provocare delle reazioni sistemiche e locali anche molto gravi. In più durante i primi 15 giorni post vaccinazione, la protezione è fallace (Arricau-Bouvery & Rodolakis; 2005).

Date le numerose criticità, sarebbe auspicabile la ricerca di altri vaccini, sia negli animali che nell'uomo, che non comportino ulteriori complicazioni conservando efficacia ed immunogenicità (Dragan et al., 2020).

Sanitaria:

La profilassi diretta è basata su tutte le misure preventive e le comuni buone pratiche di igiene e biosicurezza, in grado di ridurre potenzialmente la trasmissione di qualsiasi infezione in allevamento e, di conseguenza, rappresentare rischi inferiori per l'uomo.

A tal proposito, meritano particolare attenzione i materiali maggiormente infettivi, quali placente e feti abortiti, la cui corretta gestione rappresenta un punto cruciale (EFSA; 2010).

I principali fattori di rischio per la diffusione dell'infezione sono l'acquisto di nuovi capi e la dimensione dell'allevamento (EFSA; 2010; Paul et al., 2014; Schimmer et al., 2014). Pertanto, le aziende che rientrano in queste caratteristiche necessitano l'applicazione di misure di prevenzione più incisive per impedire l'ingresso di *C. burnetii*.

Gli altri fattori di rischio individuati sono relativi alla corretta igiene dei box parto (Taurel et al., 2011), alla presenza di ovicaprini (van Engelen et al., 2014), alla mancata applicazione della quarantena per animali neo-introdotti (Paul et al., 2014) e delle misure di biosicurezza da parte dei veterinari designati alla gestione dell'azienda (Taurel et al., 2011).

Di conseguenza, le buone pratiche atte a ridurre le possibilità di contagio sono: regolari pulizie e disinfezioni, determinazione ed isolamento degli animali infetti ed eliminatori, suddivisione dell'allevamento in aree, rimozione e corretta gestione dei prodotti, controllo degli ectoparassiti e dei roditori, creazione di barriere per uccelli ed animali selvatici.

A differenza di tante altre epizootie presenti nella ex lista B dell'OIE, non esistono regole o raccomandazioni armonizzate per il monitoraggio e la denuncia della malattia negli animali a livello europeo, per cui le misure da intraprendere variano di paese in paese. In Italia la febbre Q è sottoposta a denuncia obbligatoria, ed è contemplata dal regolamento di polizia veterinaria, in particolare, dal D.P.R. n 320 del 1954:

D.P.R. 320/1954

Capo XXIV - Rickettsiosi (febbre Q)

Articolo 142

Accertati casi di febbre Q nell'uomo, il sindaco, ai sensi dell'art. 10 del presente

regolamento, adotta in tutto o in parte, i seguenti provvedimenti nei riguardi degli animali che, direttamente o indirettamente, hanno avuto contatto con le persone ammalate:

a) identificazione dei soggetti infetti mediante prove sierologiche o allergiche;

b) isolamento degli animali che dagli accertamenti risultano infetti;

c) distruzione dei feti e degli involucri fetali;

d) accurate disinfezioni dei ricoveri;

e) divieto di destinare all'alimentazione umana ed all'allattamento degli animali il latte

proveniente dai soggetti infetti, se non previo trattamento risanatore;

f) divieto dell'ammissione al consumo dei latticini, anche se confezionati primi

dell'accertamento della malattia, se non preparati con latte risanato o sottoposti a

stagionatura per almeno 30 giorni;

g) isolamento e cura oppure uccisione dei cani infetti;

h) trattamenti idonei per la lotta contro le zecche o altri vettori della malattia riscontrati

nelle località infette

Articolo 143

I provvedimenti sanitari disposti dal sindaco sono revocati, con le modalità stabilite dal

primo comma dell'art. 16 del presente regolamento, quando successivi esami sierologici o allergici, da ripetersi a conveniente intervallo dagli ultimi risultati negativi, comprovano l'avvenuta estinzione della malattia.

Per quanto riguarda il rischio, da parte dell'uomo, di contrarre l'infezione tramite assunzione di latte o prodotti caseari, la normativa vigente (Reg. CE 853/04, Reg. CE 2073/05 e suoi aggiornamenti) non impone nessun tipo di controllo per la ricerca di *C. burnetii* nella matrice latte e nei suoi derivati.

3.7 Terapia

Il trattamento degli animali infetti non è contemplato e sarebbe persino pericoloso per gli altri animali presenti in azienda, nonché per l'uomo, in quanto favorirebbe la figura dell'eliminatore silente cronico. L'utilizzo di antibiotici, inoltre, non si è rivelato efficace né nella prevenzione dell'infezione, né nel ridurre l'eliminazione in soggetti infetti (sia in termini quantitativi che di durata di escrezione). Siccome il trattamento antibiotico non si è dimostrato efficace nell'influenzare positivamente l'epidemiologia dell'infezione, non può erigersi a trattamento raccomandato, soprattutto in un periodo storico in cui è necessario evitare abusi di chemioterapici per ridurre fenomeni di antibiotico-resistenza (Berri et al., 2005).

In passato il trattamento terapeutico prevedeva l'utilizzo di tetracicline *long-acting* (ossitetraciclina) al dosaggio di 20mg/Kg, effettuando due trattamenti nell'ultimo mese di gravidanza. Tale terapia consentiva solo la riduzione del numero degli aborti, risultando non risolutiva. Pertanto, poiché il trattamento non permetteva l'eradicazione della malattia, gli animali, seppur dichiarati clinicamente guariti, continuavano ad eliminare il microrganismo. In umana il trattamento più utilizzato resta l'associazione doxiciclina /idrossiclorochina, utile a ridurre i segni clinici e i sintomi della malattia, in un regime posologico di 7-14 giorni, o continuata per almeno 3 giorni dopo la remissione dei sintomi. In particolare, la cloroquina agisce sinergicamente con la doxiciclina inducendo un aumento del pH del fagolisosoma e limitando la capacità replicativa di *C. burnetii*.

Nelle forme endocardiche sono utilizzate diverse combinazioni di antibiotici per lunghi periodi di tempo (anche un anno e mezzo), e sembrerebbe che l'interruzione del trattamento comporterebbe esacerbazione dell'infezione. Esistono evidenze in letteratura di identificazione del batterio nelle valvole cardiache dopo anni di trattamenti con tetracicline (Madiaraga et al., 2003). La necessità di nuovi approcci terapeutici appare dunque chiara ed è acuita dall'isolamento di una variante doxiciclina-resistente nel 2005 (Rolainet al., 2005).

- Agerholm JS, Jensen TK, Agger JF, Engelsma MY, Roest HI. Presence of *Coxiella burnetii* DNA in inflamed bovine cardiac valves. *BMC Vet Res*. 2017 Mar 9;13(1):69. doi: 10.1186/s12917-017-0988-5. PMID: 28274243; PMCID: PMC5343293.
- Angelakis E, Raoult D. Q Fever. *Vet Microbiol*. 2010 Jan 27;140(3-4):297-309. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.07.016. Epub 2009 Aug 8. PMID: 19875249.
- Arricau-Bouvery N, Rodolakis A. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet Res*. 2005 May-Jun;36(3):327-49. doi: 10.1051/vetres:2005010. PMID: 15845229.
- Arricau-Bouvery N, Souriau A, Bodier C, Dufour P, Rousset E, Rodolakis A. Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats. *Vaccine*. 2005 Aug 15;23(35):4392-402. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.04.010. PMID: 16005747.
- Beare PA, Unsworth N, Andoh M, Voth DE, Omsland A, Gilk SD, et al. Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus *Coxiella*. *Infect. Immun*. 2009; 77:642–56.
- Beare PA, Jeffrey BM, Long CM, Martens CM, Heinzen RA. Genetic mechanisms of *Coxiella burnetii* lipopolysaccharide phase variation. *PLoS Pathog*. 2018 Feb 26;14(3): e1006922. doi: 10.1371/journal.ppat.1006922. PMID: 29481553; PMCID: PMC5843353.
- Benazzi P. Regolamento di polizia veterinaria. Esculapio.
- Berri M, Crochet D, Santiago S, Rodolakis A. Spread of *Coxiella burnetii* infection in a flock of sheep after an episode of Q fever. *Vet Rec*. 2005 Dec 3;157(23):737-40. doi: 10.1136/vr.157.23.737. PMID: 16326967.
- Berri M, Laroucau K, Rodolakis A. The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*. 2000 Mar 15;72(3-4):285-93. doi: 10.1016/s0378-1135(99)00178-9. PMID: 10727838.
- Berri M, Rousset E, Champion JL, Russo P, Rodolakis A. Goats may experience reproductive failures and shed *Coxiella burnetii* at two successive parturitions after a Q fever infection. *Res Vet Sci*. 2007 Aug;83(1):47-52. doi: 10.1016/j.rvsc.2006.11.001. Epub 2006 Dec 21. PMID: 17187835.
- de Cremoux R, Rousset E, Touratier A, Audusseau G, Nicollet P, Ribaud D, David V, Le Pape M. *Coxiella burnetii* vaginal shedding and antibody responses in dairy goat herds in a context of clinical Q fever outbreaks.

- FEMS Immunol Med Microbiol. 2012 Feb;64(1):120-2. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00893.x. PMID: 22066517.
- Dragan AL, Voth DE. Coxiella burnetii: international pathogen of mystery. Microbes Infect. 2020 Apr;22(3):100-110. doi: 10.1016/j.micinf.2019.09.001. Epub 2019 Sep 28. PMID: 31574310; PMCID: PMC7101257.
- EFSA, 2010. Panel on animal health and welfare (AHAW), scientific opinion on Q fever. EFSA J. 8 (5), 1595.
- EMA 2010. Scientific discussion for the approval of Coxevac. 2 August 2010 EMA/CVMP/493574/2010 Veterinary Medicines and Product Data Management.
- Emery MP, Ostlund EN, Ait Ichou M, Ballin JD, McFarling D, McGonigle L. Coxiella burnetii serology assays in goat abortion storm. J Vet Diagn Invest. 2014 Jan;26(1):141-5. doi: 10.1177/1040638713517233. PMID: 24532695.
- Fernandes I, Rousset E, Dufour P, Sidi-Boumedine K, Cupo A, Thiéry R, Duquesne V. Evaluation of the recombinant Heat shock protein B (HspB) of Coxiella burnetii as a potential antigen for immunodiagnostic of Q fever in goats. Vet Microbiol. 2009 Mar 2;134(3-4):300-4. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.08.024. Epub 2008 Aug 29. PMID: 18835111.
- Fournier PE, Marrie TJ, Raoult D. Diagnosis of Q fever. J Clin Microbiol. 1998 Jul;36(7):1823-34. doi: 10.1128/JCM.36.7.1823-1834.1998. PMID: 9650920; PMCID: PMC104936.
- García-Ispierto I, Nogareda C, Yáñez JL, Almería S, Martínez-Bello D, de Sousa NM, Beckers JF, López-Gatius F. Neospora caninum and coxiella burnetii seropositivity are related to endocrine pattern changes during gestation in lactating dairy cows. Theriogenology. 2010 Jul 15;74(2):212-20. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.02.004. Epub 2010 Apr 22. PMID: 20416940.
- Gerlach C, Škultéty L, Henning K, Neubauer H, Mertens K. Coxiella burnetii immunogenic proteins as a basis for new Q fever diagnostic and vaccine development. Acta Virol. 2017;61(3):377-390. doi: 10.4149/av_2017_320. PMID: 28854806.
- Guatteo R, Seegers H, Joly A, Beaudreau F. Prevention of Coxiella burnetii shedding in infected dairy herds using a phase I C. burnetii inactivated vaccine. Vaccine. 2008 Aug 12;26(34):4320-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.06.023. Epub 2008 Jun 30. PMID: 18586060.
- Hansen MS, Rodolakis A, Cochonneau D, Agger JF, Christoffersen AB, Jensen TK, Agerholm JS. Coxiella burnetii associated placental lesions and

- infection level in parturient cows. *Vet J.* 2011 Nov;190(2):e135-e139. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.12.021. Epub 2011 Feb 2. PMID: 21292521.
- Hermans MH, Huijsmans CR, Schellekens JJ, Savelkoul PH, Wever PC. *Coxiella burnetii* DNA in goat milk after vaccination with Coxevac (®). *Vaccine.* 2011 Mar 24;29(15):2653-6. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.01.111. Epub 2011 Feb 12. PMID: 21320538.
- Hogerwerf L, van den Brom R, Roest HI, Bouma A, Vellema P, Pieterse M, Dercksen D, Nielen M. Reduction of *Coxiella burnetii* prevalence by vaccination of goats and sheep, The Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2011 Mar;17(3):379-86. doi: 10.3201/eid1703.101157. PMID: 21392427; PMCID: PMC3166012.
- Horigan MW, Bell MM, Pollard TR, Sayers AR, Pritchard GC. Q fever diagnosis in domestic ruminants: comparison between complement fixation and commercial enzyme-linked immunosorbent assays. *J Vet Diagn Invest.* 2011 Sep;23(5):924-31. doi: 10.1177/1040638711416971. PMID: 21908348.
- Janowetz B, Motsch B, Turowski V, Domes U, Bauer B, Böttcher J. Was leisten *Coxiella burnetii*-phasen-spezifische und kommerzielle Antikörpertests? Stendaler Symposium, 2017 May 5.
- Kittelberger R, Mars J, Wibberley G, Sting R, Henning K, Horner GW, Garnett KM, Hannah MJ, Jenner JA, Piggott CJ, O'Keefe JS. Comparison of the Q-fever complement fixation test and two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies against *Coxiella burnetii* (Q-fever) in ruminants: recommendations for use of serological tests on imported animals in New Zealand. *N Z Vet J.* 2009 Oct;57(5):262-8. doi: 10.1080/00480169.2009.58619. PMID: 19802039.
- Kowalczywska M, Sekeyová Z, Raoult D. Proteomics paves the way for Q fever diagnostics. *Genome Med.* 2011 Jul 30;3(7):50. doi: 10.1186/gm266. PMID: 21801463; PMCID: PMC3221545
- Lang G, Waltner-Toews D, Menzies P. The seroprevalence of Coxiellosis (Q fever) in Ontario sheep flocks. *Can J Vet Res.* 1991 Apr;55(2):139-42. PMID: 1884293; PMCID: PMC1263433.
- La Scola B, Raoult D. Serological cross-reactions between *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae*, and *Coxiella burnetii*. *J Clin Microbiol.* 1996 Sep;34(9):2270-4. doi: 10.1128/JCM.34.9.2270-2274.1996. PMID: 8862597; PMCID: PMC229230.
- Lukáčová M, Melnicáková J, Kazár J. Cross-reactivity between *Coxiella burnetii* and *Chlamydiae*. *Folia Microbiol (Praha).* 1999;44(5):579-84. doi: 10.1007/BF02816263. PMID: 10997139.

- Madariaga MG, Rezai K, Trenholme GM, Weinstein RA. Q fever: a biological weapon in your backyard. *Lancet Infect Dis.* 2003 Nov;3(11):709-21. doi: 10.1016/s1473-3099(03)00804-1. PMID: 14592601.
- Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees), OIE. Sixth edition, Volume 1, 2008.
- Maurin M, Raoult D. Q fever. *Clin Microbiol Rev.* 1999 Oct;12(4):518-53. PMID: 10515901; PMCID: PMC88923.
- Musso D, Raoult D. Serological cross-reactions between *Coxiella burnetii* and *Legionella micdadei*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1997 Mar;4(2):208-12. PMID: 9067657; PMCID: PMC170503.
- Natale A, Bucci G, Capello K, Barberio A, Tavella A, Nardelli S, Marangon S, Ceglie L. Old and new diagnostic approaches for Q fever diagnosis: correlation among serological (CFT, ELISA) and molecular analyses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2012 Jul;35(4):375-9. doi: 10.1016/j.cimid.2012.03.002. Epub 2012 Mar 30. PMID: 22463984.
- Paul S, Toft N, Agerholm JS, Christoffersen AB, Agger JF. Bayesian estimation of sensitivity and specificity of *Coxiella burnetii* antibody ELISA tests in bovine blood and milk. *Prev Vet Med.* 2013 May 1;109(3-4):258-63. doi: 10.1016/j.prevetmed.2012.10.007. Epub 2012 Nov 22. PMID: 23182027.
- Paul S, Agger JF, Agerholm JS, Markussen B. Prevalence and risk factors of *Coxiella burnetii* seropositivity in Danish beef and dairy cattle at slaughter adjusted for test uncertainty. *Prev Vet Med.* 2014 Mar 1;113(4):504-11. doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.01.018. Epub 2014 Jan 21. PMID: 24485706.
- Rolain JM, Lambert F, Raoult D. Activity of telithromycin against thirteen new isolates of *C. burnetii* including three resistant to doxycycline. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Dec;1063:252-6. doi: 10.1196/annals.1355.039. PMID: 16481522.
- Rousset E, Durand B, Berri M, Dufour P, Prigent M, Russo P, Delcroix T, Touratier A, Rodolakis A, Aubert M. Comparative diagnostic potential of three serological tests for abortive Q fever in goat herds. *Vet Microbiol.* 2007 Oct 6;124(3-4):286-97. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.04.033. Epub 2007 Apr 27. PMID: 17532581.
- Rousset E, Berri M, Durand B, Dufour P, Prigent M, Delcroix T, Touratier A, Rodolakis A. *Coxiella burnetii* shedding routes and antibody response after outbreaks of Q fever-induced abortion in dairy goat herds. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Jan;75(2):428-33. doi: 10.1128/AEM.00690-08. Epub 2008 Nov 14. PMID: 19011054; PMCID: PMC2620711.

- Schimmer B, de Lange MM, Hautvast JL, Vellema P, van Duynhoven YT. *Coxiella burnetii* seroprevalence and risk factors on commercial sheep farms in The Netherlands. *Vet Rec.* 2014 Jul 5;175(1):17. doi: 10.1136/vr.102155. Epub 2014 Apr 29. PMID: 24789854.
- Taurel AF, Guatteo R, Joly A, Seegers H, Beaudeau F. Seroprevalence of Q fever in naturally infected dairy cattle herds. *Prev Vet Med.* 2011 Aug 1;101(1-2):51-7. doi: 10.1016/j.prevetmed.2011.05.005. Epub 2011 Jun 8. PMID: 21645936.
- Tissot-Dupont H, Vaillant V, Rey S, Raoult D. Role of sex, age, previous valve lesion, and pregnancy in the clinical expression and outcome of Q fever after a large outbreak. *Clin Infect Dis.* 2007 Jan 15;44(2):232-7. doi: 10.1086/510389. Epub 2006 Dec 6. PMID: 17173223.
- van Engelen E, Schotten N, Schimmer B, Hautvast JL, van Schaik G, van Duijnhoven YT. Prevalence and risk factors for *Coxiella burnetii* (Q fever) in Dutch dairy cattle herds based on bulk tank milk testing. *Prev Vet Med.* 2014 Nov 1;117(1):103-9. doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.08.016. Epub 2014 Sep 8. PMID: 25239684.

Capitolo 4

Produzione di antigeni ricombinanti e loro utilizzo in Medicina
Veterinaria

4.1 Gli antigeni ricombinanti

La tecnologia del DNA ricombinante ha reso possibile l'isolamento e l'espressione di geni in cellule diverse da quelle di origine. In ambito diagnostico questa tecnologia ha consentito la produzione su larga scala di antigeni derivati da agenti patogeni, che possono sostituire gli agenti naturali in numerosi saggi (Gallina e Milanese, 1992). Gli antigeni ricombinanti, rispetto a quelli naturali, presentano maggiore maneggevolezza, omogeneità ed economicità.

In particolare, i vantaggi di questa tecnologia sono molteplici: 1) evita la manipolazione dell'agente infettivo nel corso del processo produttivo, riducendo il rischio per gli addetti alla produzione; 2) consente, mediante l'espressione in cellule eterologhe, la produzione di grandi quantità di un dato antigene, anche quando l'agente patogeno che lo possiede è di difficile o impossibile coltivazione; 3) permette di "adattare" l'antigene alle necessità del saggio diagnostico. A tal proposito è possibile intervenire sulle dimensioni dell'antigene, sulla scelta di determinati epitopi, l'aggiunta di sequenze amminoacidiche in grado di migliorare le performances diagnostiche o la praticità del saggio. Nella progettazione dell'insero è necessario tener presente di una serie di fattori, quali: a) la specificità: è necessario assicurarsi che l'antigene non contenga regioni di omologia con proteine di altri patogeni, che potrebbero essere fonte di false reattività; b) la sensibilità: è necessario che la conformazione del determinante antigenico sia il più possibile identica a quella riconosciuta dagli anticorpi specifici; c) l'efficienza di espressione: occorre valutare questo aspetto critico in termini di produttività del polipeptide ricombinante e di riproducibilità del processo. E' necessario scegliere il sistema di espressione più adatto ed, eventualmente, rimuovere i segmenti genici che non sono importanti ai fini dell'immunoreattività e che potrebbero essere causa di problemi di espressione (Marin et al, 1995).

Storicamente, le proteine ricombinanti venivano prodotte con diversi approcci: quelle provviste di modificazioni post-traduzionali venivano espresse in cellule di roditore (generalmente CHO, cellule di ovaio di criceto cinese) o in lieviti (*Saccharomyces cerevisiae*), mentre l'ospite di elezione per le proteine di piccole dimensioni, semplici e non modificate a livello post-traduzionale, era *Escherichia coli*.

I progressi biotecnologici hanno gradualmente ampliato le possibilità di scelta tra i vari sistemi di espressione. La scelta del sistema ottimale può

estendersi su organismi molto diversi (batteri, funghi, mammiferi, insetti e piante) e i principali parametri che la orientano sono basati su criteri di ordine bio-molecolare e bio-cellulare, oltre alla facilità di purificazione.

Uno dei sistemi di espressione tuttora più utilizzati è rappresentato da *Escherichia Coli* (Fig. x), che offre numerosi vantaggi:

- la possibilità di regolare l'espressione delle proteine eterologhe: il promotore ibrido *trp-lac* è sottoposto al controllo negativo del repressore *lac*, prodotto costitutivamente da alcuni ceppi di *E. Coli*. L'isopropiltio-b-D-galattoside (IPTG) è tuttavia in grado di legare il repressore e di indurre la trascrizione, permettendo l'espressione di geni esogeni sotto il controllo del promotore *trp-lac*
- cresce facilmente in terreni di semplice formulazione e non ha particolari necessità di ossigenazione, pertanto si possono raggiungere elevate densità cellulari (fino a 100 g in peso umido/L di coltura cellulare)
- l'ambiente di *E. Coli* è riducente: questo rappresenta un vantaggio per l'espressione di epitopi immunodominanti contenenti legami disolfuro in quanto promuove la formazione di tali legami solamente dopo la purificazione, ossia durante la procedura di *refolding* finale che precede l'immobilizzazione su fase solida.

I maggiori svantaggi degli antigeni ricombinanti espressi in *E. Coli* sono ascrivibili a vari fattori:

- la necessità di ottenere un elevato grado di purificazione, oltre alla eliminazione della parte non antigenica del prodotto di sintesi (generalmente una proteina di fusione), che può dare origine a reazioni aspecifiche;
- la possibile instabilità dell'elemento genetico ricombinante che codifica l'antigene;
- la possibile tossicità del prodotto per il microrganismo produttore;
- la possibilità che gli antigeni ricombinanti assumano una conformazione diversa rispetto agli antigeni naturali, comportando una alterata o diminuita reattività immunologica. Questa situazione può verificarsi frequentemente quando il polipeptide ricombinante viene prodotto in cellule batteriche. La proteina eterologa, infatti, si trova spesso aggregata in microcorpi di inclusione nel citoplasma della cellula produttrice e deve essere solubilizzata con agenti caotropici e

successivamente rinaturata ai fini del saggio (Marin et al, 1995). Il passaggio di rinaturazione è naturalmente critico perché il polipeptide possa riacquistare la sua corretta reattività immunologica e non sempre può essere eseguito in modo soddisfacente. Come è noto, molti antigeni, dopo la sintesi primaria, vengono modificati nella cellula produttrice naturale mediante tagli proteolitici, glicosilazioni, fosforilazioni, miristilazioni ecc. Generalmente i batteri non sono in grado di eseguire correttamente questi interventi, e ciò può determinare una alterazione della reattività immunologica del polipeptide. In alcuni casi è possibile ovviare a questo problema esprimendo il gene che codifica l'antigene in cellule di lievito o di mammifero.

In questo modo si ottengono antigeni correttamente modificati e generalmente indistinguibili dai corrispondenti antigeni naturali. I costi di produzione degli antigeni prodotti mediante espressione in cellule di mammifero sono, però, notevolmente più elevati di quelli prodotti in batterio o in lievito.

Nel corso degli anni gli antigeni ricombinanti sono stati utilizzati anche per la produzione di anticorpi monoclonali oppure a fini di ricerca per studiare la risposta immunitaria dell'ospite verso il patogeno di interesse (Marin et al, 1995).

L'applicazione della tecnologia del DNA ricombinante in ambito veterinario è avvenuta con significativo ritardo rispetto a quanto verificatosi in umana. Nonostante ciò, l'impiego di tali antigeni, sia a scopi diagnostici che per ricerca, ha prodotto risultati eccellenti, sono numerosissimi, infatti i test *in-house* e kit commerciali messi a punto per le più svariate infezioni degli animali domestici, includendo malattie virali, batteriche e persino parassitarie.

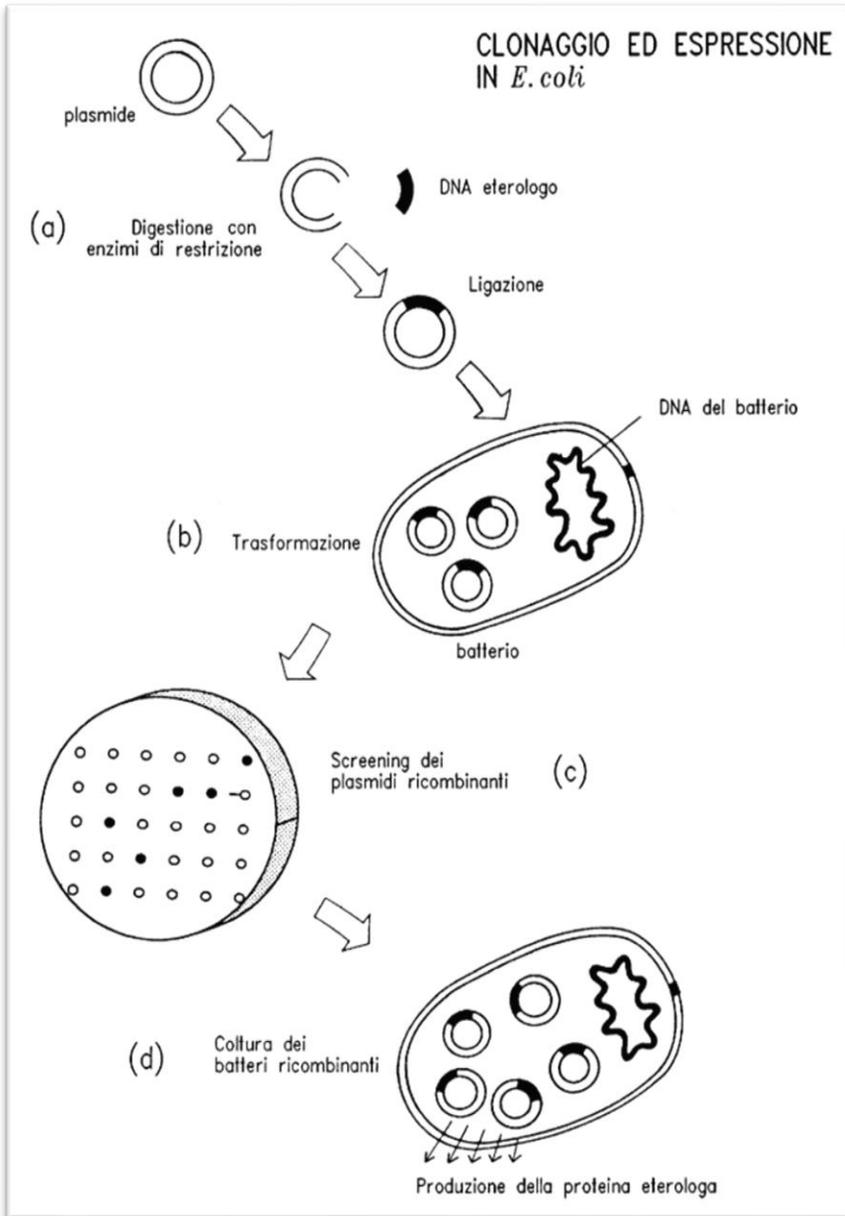


Fig. 18 Rappresentazione schematica dell'espressione di geni in Escherichia Coli. (a) Il gene eterologo di interesse viene inserito in un plasmide; (b) il plasmide ricombinante viene introdotto nel batterio (trasformazione); i batteri ricombinanti vengono selezionati su piastra (screening) (c), e vengono coltivati in opportune condizioni producendo la proteina eterologa (d) (Marin et al., 1995).

4.2 Principali proteine immunodominanti:

Viste le problematiche concernenti la produzione, cui si aggiunge la complessità degli antigeni nativi di fase I e II che caratterizzano i kit ELISA commerciali odieramente utilizzati nella routine diagnostica, numerosi lavori si sono concentrati sullo studio degli antigeni maggiormente coinvolti durante il processo di risposta immunitaria, in modo da individuarne i principali (Gerlach et al., 2017).

Al giorno d'oggi sono state individuate 169 proteine, suddivise in 19 studi pubblicati negli ultimi venti anni, effettuati nell'uomo e in animali da laboratorio.

La maggior parte degli antigeni immunoreattivi sembrerebbe essere localizzata nel citoplasma (27%), mentre solo il 7% rientra nella costituzione della membrana esterna.

Per quanto riguarda la funzione, invece, il 13.6% delle proteine reattive sono coinvolte nel metabolismo e nelle vie di produzione/conversione di energia. La seconda classe maggiormente rappresentata è quella degli enzimi coinvolti nel processo di espressione genica (9.5%), substrati (7%) e sistemi di secrezione (Gerlach et al., 2017). Per diverse proteine immunodominanti, la funzione resta ancora sconosciuta.

In alcuni casi i principali antigeni coincidono con importanti fattori di virulenza, come ad esempio CBU0630 (MIP), che svolge un ruolo importante nella sopravvivenza e nella moltiplicazione nelle cellule ospiti e nell'infezione delle cellule macrofagiche (Ihnatko et al., 2012), o ad esempio CBU1269 (OmpA), che è coinvolto nel processo di invasione e di adesione (Sekeyova et al., 2009).

Vista l'assenza di uniformità e di standardizzazione di pattern di antigeni, non sorprende che sono poche le proteine descritte come immunodominanti in più di due pubblicazioni, considerando anche le variazioni dovute al ceppo di *Coxiella* e alla specie oggetto di studio. Solo 20 proteine sono, invece, descritte in almeno quattro lavori (Gerlach et al., 2017).

Le principali sono CBU0612 (OmpH), CBU0092 (YbgF), CBU0236 (Tuf-2), CBU1718 (GroEL) e CBU1910 (Com1) che sono menzionate rispettivamente in 9, 10, 11, 16, and 17 pubblicazioni e rappresentano le basi per l'innovazione nel campo della diagnostica e della vaccinologia (Gerlach et al., 2017).

Tra queste, Ybgf è una componente del Tol/Pal system, un complesso multiproteico, codificato da un cluster di geni organizzati in due operoni. Il

primo codifica per YbgC, TolQ, TolR, TolA, TolB, Pal e YbgF, il secondo funge da promotore interno codificante TolB, Pal e YbgF. Ybgf è una proteina periplasmatica (Qi et al., 2013), avente lo scopo di preservare l'integrità della membrana esterna e di interagire con alcune alcune proteine (Walburger et al., 2002).

Identificata tra i migliori marker in alcuni studi, e il migliore di forma acuta (Vigil et al., 2010; Papadioti et al., 2011).

CBU1910 (Com1) è una proteina della membrana esterna (disulfide-ossidoreduttasi), che catalizza la formazione di ponti disolfuro nelle proteine extra-citosoliche. Nonostante venga considerato il principale target della risposta immunitaria, il ruolo patogenetico resta sconosciuto. Sono numerosi, infatti, i tentativi effettuati volti all'ottenimento di un test (ELISA) basato su un unico antigene. Le performances riscontrate non state però confortanti, poiché a fronte di un'elevata specificità (vicina al 99%), la sensibilità era scarsa (Sekeyova et al., 2010; Xiong et al., 2012). Performances migliori sono state ottenute recentemente nel tentativo di diagnosticare esclusivamente le forme croniche anche se al momento l'eventuale applicazione clinica è da escludere (Vranakis et al., 2019).

Anche le funzioni della proteina di membrana CBU0937 (OM) è sconosciuta pur essendo tra i maggiori antigeni nei confronti dei quale è indirizzata la reazione immune (Gerlach et al., 2017).

CBU1398, (SucB), è, invece un enzima coinvolto nel metabolismo del carbonio (dihydrolipoamide succinyltransferase) che catalizza reazioni concernenti il processo di formazione di ossalato a partire dalla succinil-CoA. Rientra, inoltre, nel ciclo del TCA e nei processi di degradazione della lisina e di produzione e conversione di energia. Numerosi studi di microprotein array (Deringer et al., 2010; Vigil et al., 2010; Beare et al., 2006) ne hanno stabilito le spiccate proprietà reattive.

- Beare PA, Samuel JE, Howe D, Virtaneva K, Porcella SF, Heinzen RA. Genetic diversity of the Q fever agent, *Coxiella burnetii*, assessed by microarray-based whole-genome comparisons. *J Bacteriol.* 2006 Apr;188(7):2309-24. doi: 10.1128/JB.188.7.2309-2324.2006. PMID: 16547017; PMCID: PMC1428397.
- Deringer JR, Chen C, Samuel JE, Brown WC. Immunoreactive *Coxiella burnetii* Nine Mile proteins separated by 2D electrophoresis and identified by tandem mass spectrometry. *Microbiology (Reading).* 2011 Feb;157(Pt 2):526-542. doi: 10.1099/mic.0.043513-0. Epub 2010 Oct 28. PMID: 21030434; PMCID: PMC3090129.
- Gallina, A., Milanesi, G.: Gli antigeni ricombinanti come strumenti diagnostici. In "Le biotecnologie nella microbiologia medica". Esculapio edit., Bologna, 1992.
- Gerlach C, Škultéty L, Henning K, Neubauer H, Mertens K. *Coxiella burnetii* immunogenic proteins as a basis for new Q fever diagnostic and vaccine development. *Acta Virol.* 2017;61(3):377-390. doi: 10.4149/av_2017_320. PMID: 28854806.
- Ihnatko R, Shaw E, Toman R. Proteome of *Coxiella burnetii*. *Adv Exp Med Biol.* 2012;984:105-30. doi: 10.1007/978-94-007-4315-1_6. PMID: 22711629.
- Marin M, Bresciani S, Mazza C, Albertini A, Cariani E. Le biotecnologie nella diagnosi delle infezioni da retrovirus umani. 1995, *Caleidoscopio italiano*, Anno 13 n° 97.
- Papadioti A, Markoutsas S, Vranakis I, Tselentis Y, Karas M, Psaroulaki A, Tsiotis G. A proteomic approach to investigate the differential antigenic profile of two *Coxiella burnetii* strains. *J Proteomics.* 2011 Jun 10;74(7):1150-9. doi: 10.1016/j.jprot.2011.04.016. Epub 2011 Apr 30. PMID: 21565289.
- Qi Y, Xiong X, Duan C, Jiao J, Gong W, Wen B. Recombinant protein YbgF induces protective immunity against *Rickettsia heilongjiangensis* infection in C3H/HeN mice. *Vaccine.* 2013 Nov 19;31(48):5643-50. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.09.064. Epub 2013 Oct 8. PMID: 24113261.
- Sekeyová Z, Kowalczywska M, Vincentelli R, Decloquement P, Flores-Ramírez G, Škultéty L, Raoult D. Characterization of antigens for Q fever serodiagnostics. *Acta Virol.* 2010;54(3):173-80. doi: 10.4149/av_2010_03_173. PMID: 20822309.

- Vigil A, Chen C, Jain A, Nakajima-Sasaki R, Jasinskas A, Pablo J, Hendrix LR, Samuel JE, Felgner PL. Profiling the humoral immune response of acute and chronic Q fever by protein microarray. *Mol Cell Proteomics*. 2011 Oct;10(10):M110.006304. doi: 10.1074/mcp.M110.006304. Epub 2011 Aug 4. PMID: 21817167; PMCID: PMC3205856.
- Vranakis I, Mathioudaki E, Kokkini S, Psaroulaki A. Com1 as a Promising Protein for the Differential Diagnosis of the Two Forms of Q Fever. *Pathogens*. 2019 Nov 18;8(4):242. doi: 10.3390/pathogens8040242. PMID: 31752191; PMCID: PMC6963606.
- Walburger A, Lazdunski C, Corda Y. The Tol/Pal system function requires an interaction between the C-terminal domain of TolA and the N-terminal domain of TolB. *Mol Microbiol*. 2002 May;44(3):695-708. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02895.x. PMID: 11994151.
- Xiong X, Wang X, Wen B, Graves S, Stenos J. Potential serodiagnostic markers for Q fever identified in *Coxiella burnetii* by immunoproteomic and protein microarray approaches. *BMC Microbiol*. 2012 Mar 16;12:35. doi: 10.1186/1471-2180-12-35. PMID: 22420424; PMCID: PMC3386016.

Capitolo 5

Scopo del lavoro

La febbre Q è una zoonosi emergente o riemergente per molto tempo trascurata che, nell'ultimo decennio, ha riaccessato l'interesse delle autorità sanitarie e della comunità scientifica internazionale a causa di numerosi focolai rinvenuti negli allevamenti e di periodici episodi epidemici nell'uomo.

La segnalazione della presenza di tale patologia, anche in Italia, è sporadica e frutto di indagini epidemiologiche estemporanee, pertanto necessiterebbe di specifici approfondimenti al fine di stilare opportuni piani di monitoraggio ed eseguire un'attenta valutazione della prevalenza del morbo in questione. Mettere in pratica tale approccio è auspicabile ai fini di un controllo più efficiente dell'infezione negli animali da reddito e per l'effettiva realizzazione del concetto di *One Health*.

Il patrimonio di conoscenze scientifiche relativo a questa malattia si è notevolmente ampliato e, ad oggi, sono stati chiariti molti aspetti, fra cui i fattori che ne influenzano la trasmissione e la diffusione dai ruminanti all'uomo. Inoltre, gli approcci diagnostici innovativi offerti dallo sviluppo tecnologico hanno trovato scarsa applicazione nella sierodiagnosi nei ruminanti, nonostante essi rappresentino i principali serbatoi e i destinatari di eventuali provvedimenti sanitari e piani di monitoraggio.

I test sierologici utilizzati nella routine presentano diverse problematiche legate alla produzione e numerosi limiti connessi alle performances analitiche.

Numerosi studi evidenziano la variabilità della sensibilità dei test in base alla matrice e alla specie presa in considerazione.

Tali test, infatti, non sono in grado offrire informazioni circa lo stadio di infezione, né tanto meno di distinguere i soggetti vaccinati da quelli infetti. Inoltre, la produzione degli antigeni utilizzati per l'allestimento di tali test è strettamente correlata alla presenza del batterio in laboratorio e, quindi, risulta costosa in quanto richiede personale specializzato e requisiti di biosicurezza elevati.

Pertanto, è importante individuare nuovi metodi di *screening* e tecniche strumentali da applicare a scopo diagnostico nonché epidemiologico.

In tal senso il ricorso all'utilizzo di antigeni ricombinanti potrebbe rivelarsi uno strumento utile in quanto andrebbe potenzialmente a risolvere gran parte delle problematiche sopra elencate, fornendo una valida alternativa ai test presenti oggi in commercio.

L'unica applicazione di questa tecnologia alla diagnostica veterinaria risulta quella relativa alla *heat shock protein B* (HspB), dimostratasi una buona candidata.

Il seguente lavoro si prefigge di valutare l'applicazione di quattro dei principali antigeni immunodominanti di *C. burnetii* prodotti in forma ricombinante nella sierodiagnosi di tale malattia infettiva nei ruminanti domestici, ponendo le basi alla realizzazione di un test ELISA utile a definire la prevalenza dell'infezione negli allevamenti italiani ed in grado non solo di snellire i costi e i tempi di produzione, ma anche di differenziare la fase di infezione.

I risultati di tale studio, uniti a maggiori informazioni circa la circolazione del patogeno sul territorio, potrebbero favorire lo sviluppo e l'attuazione di strategie concrete per la prevenzione e il controllo delle infezioni da *C. burnetii* negli allevamenti di ruminanti della regione Campania, ponendo così le basi per la pianificazione di attività di controllo mirate a contenere l'impatto economico e sanitario che la malattia determinerebbe qualora dovesse diffondersi in maniera incontrollata sul territorio.

Capitolo 6

Materiali e Metodi

6.1 Selezione degli antigeni

Lo studio in oggetto si è focalizzato su antigeni selezionati da una lista di proteine, la cui immunoreattività era già stata valutata nell'uomo o in animali da laboratorio attraverso approcci di immunoproteomica (immunoblot bidimensionali e spettrometria di massa) e/o *microarray protein assay*. Sono stati scelti antigeni identificati come immunodominanti in più di cinque lavori presenti in bibliografia, la cui sieroreattività non era mai stata esaminata nei ruminanti, conferendo notevole rilevanza alle proprietà fisico-chimiche delle proteine in questione (in particolare alla idrofilicità) in modo da poter delineare la strategia di espressione e di purificazione.

Tramite supporti informatici è stato possibile escludere eventuali cross-reazioni con altri patogeni per le proteine in esame (BLAST, NCBI National Center for Biotechnology Information, U.S National Library of Medicine) ed evidenziare per tutte le proteine, bassi gradi di omologia ed elevati criteri di esclusività.

La ricerca si è, dunque, concentrata su Ybgf (CBU 0092), Com1 (CBU 1910), Om (CBU O937), SucB (CBU 1398), le cui caratteristiche e proprietà sono riassunte nella tabella x.

Tab. 4 Caratteristiche fisico- funzionali delle proteine candidate e numero di lavori in cui è dimostrata la sieroreattività nell'uomo o in animali da laboratorio (Gerlach et al).

Nome	Peso molecolare	Localizzazione/specificità di fase	Funzioni	Citazioni
Ybgf	35 kDa	Transmembrana. Fase II	Coordinatore della divisione cellulare, trasporto di proteine attraverso il sistema "tol-pal".	10
Com1	27 kDa	Membrana esterna. Fase I	Coinvolta in processi di modifiche post-traslazionali e di turnover proteico.	17
OM	51 kDa	Membrana esterna. Entrambe le fasi	Coinvolta nel sistema di secrezione	6
SucB	46 kDa	Citoplasma. Fase I	Coinvolta nel processo di deidrogenazione, nel ciclo Tca e degradazione della lisina, produzione e conversione di energia.	7

6.2 Amplificazione

Dopo aver ottenuto le sequenze di interesse delle specifiche proteine (prevelate da NCBI, *GenBank National Center for Biotechnology Information*) si è proceduto, seguendo le indicazioni della ditta produttrice, all'estrazione del DNA genomico di *Coxiella Nine Mile RSA 493* utilizzando un kit commerciale (Dneasy kit, Qiagen).

Quindi sono stati disegnati primers specifici (descritti successivamente) contenenti siti di restrizione al 5' terminale. In particolare, un sito per

BamHi nel *forward* primer, e un sito EcoRI nel *reverse* primer. Dato che la sequenza codificante per la proteina Com1 conteneva originariamente un sito per EcoRI, sono stati progettati primers contenenti siti differenti (BamHi nel *forward* primer e XhoI nel *reverse* primer).

Il DNA estratto è stato, quindi, utilizzato come template per l'amplificazione.

Tab. 5 Caratteristiche dei forward e reverse primers utilizzati per l'amplificazione delle sequenze di interesse. In rosso i siti di restrizione

Primer	Sequenza	Lungh ezza	T m°	GC %
Ybfg_f	tt ggatcc CCAGTGGAAAGATATTTTCGGCGC AAC	33	81.7	51.5 %
Ybfg_r	tt gaattc AGGCGTTGTTGTTGCTGAATCG AC	32	78.4	43.7 %
Com1_f	tt ggatcc CAAGTCAAAGACATACAAAGC ATCG	33	76.4	42.4 %
Com1_r	tt ctcgag CTTTTCTACCCGGTCGATTTC	29	74.6	48.2 %
Om_f	tt ggatcc CCCGCTACCACTAATCAACAAA TCAC	34	78.3	47%
Om_r	tt gaattc ATAAAGATCGAACTGTGCCGTT ACCAC	34	75.7	40%
Sucb_f	tt ggatcc ATGGCTATAGAAATTAAGTAC CTAC	34	68.1	35.2 %
Sucb_r	tt gaattc ACACTCCAAAATCATTTCGAGCT G	31	74.4	38.7 %

Tm°= Temperatura di Melting

Gc%= Rapporto Guanina/Citosina

L'amplificazione è stata espletata in un volume di reazione di 50 µl:

- 34.3 µl acqua
- 5 µl Coral buffer 10X
- 1.5 µl 50 mM MgCl₂
- 1 µl DNTPS (10 mM)
- 2,5 µl di *reverse* e *forward* primer (10 µM)
- 3 µl gDNA (precedentemente quantificato in 50 ng/µl)
- 0.2 µl Taq Polymerase

Tab. 6 Protocollo termico utilizzato per l'amplificazione dei geni di interesse

<i>Gene</i>	<i>Denaturation</i>	<i>Annealing (X35cicli)</i>	<i>Elongation</i>
<i>YBGF</i>	94° X 3 min	(94° X 45 s) (60° X 30s) (72° X 90 s)	72° x 10 min
<i>COMI</i>	94° X 3 min	(94° X 1 min) (52° X 30s) (72° X 1 min)	72° x 10 min
<i>OM</i>	94° X 3 min	(94° X 45 s) (60° X 30s) (72° X 2 min)	72° x 10 min
<i>SUC-B</i>	94° X 3 min	(94° X 45 s) (50° X 30s) (72° X 2 min)	72° x 10 min

Quindi i prodotti di amplificazione sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di agarosio all'1,5% per la visualizzazione delle bande attese.

6.3 Digestione e ligasi

Dopo una purificazione in colonna effettuata con il NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey-Nagel, Germany), i geni amplificati sono stati sottoposti a digestione con l'ausilio dei corrispettivi enzimi di restrizione. E' stato scelto un volume di digestione di 50 µl: 1µl BamHi, 2 µl EcoRI, 10 µl Tango

buffer, 28 μl di inserto e 9 μl di acqua. Nel caso dell'amplificato relativo a Com1: 2 μl BamHI, 1 μl XhoI, 10 μl Tango buffer, 28 μl insert, 9 μl di acqua. La digestione è avvenuta a 37°C per 3 h.

Dopo un ulteriore *step* di purificazione (utilizzando il kit descritto in precedenza) i prodotti di digestione sono stati quantificati tramite NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers e, quindi, inseriti all'interno di plasmidi precedentemente trattati con gli stessi enzimi.

La *ligation* è avvenuta in volumi di reazione di 20 μl (2 μl di buffer T4 10X, 1 μl T4, 1 μl di inserto, 1 μl di plasmide digerito e 15 μl di acqua), alla temperatura di 4 °C, *overnight*.

6.4 Transforming

L'utilizzo dei prodotti di ligasi ha consentito il *transforming* delle cellule competenti di *E. coli* BL21 C43 ponendo 10 μl di prodotto e 50 μl di cellule competenti in un tubo da 15 ml, in ghiaccio, per 10 minuti. Dopo 2 minuti a 37°C è stato aggiunto 1 ml di terreno Luria-Bertani (LB). Quindi ciascun tubo è stato posto in un termoshaker orbitale (240 rpm) per 1 h. Le colture sature sono state piastrate con volumi di 100 μl e 400 μl in piastre Petri contenenti terreno Luria-bertani agar, in presenza e in assenza di ampicillina (1:1000 di soluzione di ampicillina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), *overnight* a 37°C. Il giorno successivo ne è stata valutata la crescita.

6.5 Espressione in *E.coli*

Alcune colonie ricombinanti di *E. coli* BL 21 C43 cresciute in terreno Luria-Bertani agar sono state selezionate, picchiettate e sottoposte a PCR da colonia per valutare l'effettiva espressione del plasmide desiderato.

- Buffer Coral 10X: 2 μl
- DNTPS (10 mM): 0,5 μl
- Taq: 0,2 μl
- Plasmid primer R: 1 μl
- Plasmid primer F: 1 μl
- Acqua: 14,7 μl

Tab. 7 Ciclo termico utilizzato per la realizzazione della PCR da colonia

Denaturation	Annealing (X 35 cicli)	Elongation
94° X 3 min	(94° X 45 s) (50° X 30s)	72° x 10 min
	(72° X 150 s)	

I cloni positivi sono stati prelevati e immessi in tubi da 50 ml contenenti 5 ml di terreno LB liquido con ampicillina (1:1000 di soluzione di ampicillina 100 µg/ml), in un termoshaker orbitale, a 37° C *overnight*.

Quindi sono stati dispensati 5 ml della pre-coltura satura in 500 ml di LB (1:500 di soluzione di ampicillina 100 µg/ml), posti in termoshaker con i parametri precedenti, e, tramite spettrofotometro e ad intervalli di 30 minuti, è stata misurata la densità ottica (OD) della coltura batterica a 600 nm, utilizzando il terreno Luria-Bertani come “bianco”.

Quando l'OD ha raggiunto valori compresi tra 0.4- 0.6, si è provveduto all'aggiunta di isopropyl-β-thio galactopyranoside (IPTG) 1M (1µl/ml coltura), con incubazione di 4 h. Terminata l'induzione, le colture batteriche sono state raccolte tramite centrifugazione (7000 rpm X 20 minuti) e lisate con metodi fisico-chimici: dopo un lavaggio in PBS 1X, il pellet ottenuto dopo centrifugazione è stato risospeso in buffer STE (Sodium Chloride-Tris-EDTA) con aggiunta di 500 µl di lisozima (50 mg/ml) e posto a -20°C *overnight*.

Dopo lo scongelamento e l'aggiunta di Triton 1X, è stato possibile sonicare il lisato per 30 secondi e, una volta centrifugato, si sono ottenute le diverse frazioni. Queste ultime sono state valutate tramite elettroforesi su gel di acrilammide colorati con *Comassie staining*. Per le proteine scarsamente solubili (SucB e OM) è stato utilizzato un buffer START 10mM di imidazolo, compatibile con l'estrazione in Urea.

6.6 Purificazione tramite cromatografia d'affinità:

Le proteine di fusione sono state purificate in condizioni native (Ybgf, Com1) oppure in condizioni denaturanti per mezzo di Urea 1M (SucB, OM). Tutte le proteine sono state sottoposte a tre steps di purificazione su colonna cromatografica per gravità ottenendo, quindi, tre eluati (E1, E2, E3).

La purificazione delle proteine espresse con tag di istidine (Om e SucB) è avvenuta in buffer contenenti Urea 1M e Imidazolo 500mM, sfruttando la selettività di legame tra gli ioni di Nichel esposti su una resina silicea (Ni-NTA Agarose, Qiagen) e la coda di 6 residui di istidina (6His tag) legati alla proteina ricombinante d'interesse.

La purificazione delle proteine espresse in fusione con la Glutathion-S Transferasi (GST) (Ybgf e Com1) è avvenuta, invece, con l'utilizzo di una resina glutatione-sefariosio (Glutathione Sepharose™ 4B), allo scopo di sfruttare la selettività di legame che si instaura tra il glutatione presente nella resina e la GST legata alla proteina.

In questo ultimo caso durante la fase di eluizione si è provveduto al clivaggio della proteina di fusione attraverso l'utilizzo di PreScission Protease (2U/mg), che ha permesso di allontanare la GST e ottenere esclusivamente la proteina di interesse, evitando che l'effettiva sieroreattività possa essere influenzata dal *carrier*.

Il protocollo utilizzato per la purificazione consta di 3 fasi: *binding* (30 minuti in agitazione), lavaggi con apposito *washing* buffer (3 X 5 min.) ed eluizione (3 eluati per ogni proteina).

L'analisi dei prodotti di purificazione è avvenuta tramite elettroforesi su gel di acrilammide (*SDS page*) al 12%, in particolare sono stati analizzati:

- Pellet di *E. coli* pre-induzione
- Pellet di *E. coli* post-induzione
- Surnatante (S0)
- Surnatante post-adsorbimento (S1)
- Eluati (E1, E2, E3)

Un' aliquota di ciascuna frazione (20 µl) e una stessa quantità di *loading* buffer 2X, sono stati posti a 95 °C per 5 minuti e, successivamente, centrifugati a 10.000 rpm per 1 minuto. Insieme ai campioni sono stati caricati 10 µl di ladder standard (Page Ruler™ Unstained Broad Range

Protein Ladder, Fermentas). La corsa elettroforetica è stata effettuata in *Running* buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS) a 170 V per circa 30 minuti. Al termine della corsa, ciascun gel è stato immerso in colorante blu di Coomassie (200 mg di *Brilliant Blu*, 200 ml di metanolo, 200 ml di acido acetico al 10%), *overnight* in oscillazione continua. Dopo una serie di lavaggi con soluzioni di etanolo e acido acetico, si è provveduto alla visualizzazione delle bande.

6.7 Spettrometria di massa

Tramite una lama da bisturi si è provveduto all'escissione delle bande di interesse dai corrispettivi gel da elettroforesi, ottenendo frammenti di circa 1 mm x 1 mm che sono stati posti in Eppendorf da 1,5 ml. Per decolorare i frammenti in questione sono stati effettuati tre lavaggi aggiungendo alternativamente acetonitrile (ACN) e ammonio bicarbonato (NH₄HCO₃) 100mM pH 8,0, fino a ricoprire i frammenti. Dopo l'ultimo lavaggio, i campioni sono stati completamente disidratati in acetonitrile, eliminando, quindi, il surnatante.

Successivamente i frammenti di gel, a questo punto opachi, sono stati sottoposti a riduzione ed alchilazione delle cisteine. La riduzione è avvenuta grazie all'aggiunta di ditiotreitolo (DTT) 10mM in NH₄HCO₃ 100mM pH 8,0 per 30 min a 50 °C e 500 rpm.

Per l'alchilazione è stata aggiunta iodoacetammide 50mM in NH₄HCO₃ 100mM pH 8,0, incubando i campioni per 30 min al buio a 500 rpm. Sono stati effettuati ulteriori lavaggi con acetonitrile e NH₄HCO₃, come descritto in precedenza.

A questo punto è stata aggiunta una soluzione di tripsina e NH₄HCO₃ 10mM pH 8,0, avente una concentrazione 10 ng/μl (10 μl per frammento), e sono state poste dapprima in ghiaccio per 30 min e poi a 37 °C, *overnight*. Successivamente i campioni sono stati centrifugati, in modo da recuperare i surnatanti.

Addizionando un volume di acetonitrile, vortexando e incubando per alcuni minuti, è stato possibile ottenere un'ulteriore estrazione.

Ogni frazione è stata, quindi, analizzata tramite cromatografia di ripartizione in fase inversa, utilizzando un sistema UPLC nanoAcquity associato a un Q-ToF Premier (Waters, Milford, MA, USA) per la spettrometria di massa (LC-MS/MS).

L'eluizione dei peptidi ha previsto l'utilizzo di uno spettrometro con un gradiente di acetonitrile pari a 350 nL/min, un voltaggio nell'elettro-spray di 3.5 kV e una temperatura di 80 °C.

L'analisi dei peptidi è stata effettuata usando il metodo MSE, in cui molteplici precursori ionici sono frammentati contemporaneamente da scansioni a bassa ed elevata energia. Lo spettro di acquisizione per la scansione è stato impostato a 0.6 s, con interscan di 0.1 s.

I dati ottenuti sono stati processati con l'ausilio del server ProteinLynx Global Server v. 2.3 e confrontati con quelli presenti in un database di proteine specie-specifiche (*C. burnetii* RSA 493 database, UniProt Consortium, 9.10.2008 download, 1,824 entries).

E' stato stabilito un *rate* di errore del 4% e limite di *coverage* del 15%.

Questa parte del lavoro è stata realizzata presso il laboratorio dell'*Institute of Virology, Biomedical Research Center, Slovak Academy of Science* (Bratislava, Slovacchia).

6.8 Western blot

L'eluato E1 di ciascuna proteina, diluito 1:2 con *loading buffer* 2X, è stato sottoposto a corsa elettroforetica in gel di poliacrilammide al 12% (*SDS page*). Terminata la corsa, il gel è stato trasferito in una membrana di nitrocellulosa utilizzando l'apparato Mini Transblot cell (Biorad). Il trasferimento, della durata di 1 h, effettuato a 80V e 50 mA, è avvenuto in *transfer buffer* (Tris base 3.03 g, glicina 14.4 g, H₂O 500 ml, metanolo 200 ml, SDS 0.1%). Dopo aver verificato l'avvenuto trasferimento delle proteine con l'ausilio del Ponceau S *staining*, la membrana è stata bloccata con caseina al 2.5% per 3 h e divisa in *strips* con l'aiuto di una lama chirurgica. Dopo 3 lavaggi con tween-Tris Buffered Saline (t-TBS), ciascuna *strip* è stata incubata con un siero bovino precedentemente caratterizzato come positivo o negativo, per 1h a 4°C.

Dopo 3 ulteriori lavaggi, è stato aggiunto un anticorpo monoclonale anti-IgG bovine, per 1 h. Al termine di questa fase, è stata espletata una nuova fase di lavaggio ed è stata aggiunta la soluzione di sviluppo (3,3'-Diaminobenzidina dissolta in Tris 1M pH 7.5, H₂O e H₂O₂). Dopo aver bloccato la reazione con abbondante acqua distillata, sono state valutate eventuali reazioni cromatografiche specifiche all'altezza della proteina presa in considerazione.

6.9 Campionamento dei sieri esaminati:

Il pannello di sieri utilizzato in questa ricerca è composto da:

- 94 sieri positivi e 137 negativi di ovicaprini, 85 sieri bovini negativi disponibili presso la sezione di Malattie Infettive del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Torino, precedentemente utilizzati in altri studi.
- 6 sieri bovini positivi e 6 sieri bovini negativi classificati sia sulla base di prove sierologiche (ELISA) sia attraverso real time-PCR (utilizzati per l'allestimento del saggio Immunoblot).
- 412 sieri campionati in regione Campania per lo studio di sieroprevalenza di febbre Q nelle vacche da latte. Il numero di animali da campionare è stato calcolato al netto di una prevalenza attesa del 14% e una precisione del 5%. Sono stati, quindi, campionati almeno 50 sieri per provincia suddivisi in almeno 5 allevamenti individuati in maniera randomizzata.
- 10 sieri di animali provenienti dalla stalla didattica afferente al Dipartimento di Scienze Veterinarie di Torino, precedentemente testati come negativi e sottoposti a vaccinazione. Gli animali in questione sono bovini di età superiore a 6 mesi, cui sono stati somministrati 4 ml di vaccino Coxevac (CEVA) con richiamo a 21 giorni. Il sangue è stato prelevato a tempo 0 e a 21, 42, 63 giorni dopo la prima somministrazione. Tali campioni sono stati sottoposti a un test ELISA "fase specifico", I o II (Q-fever Elisa 1 e 2 bulk antigene, BioScience Slovakia s.r.o.), seguendo le indicazioni della casa produttrice. Il suddetto test è in grado di valutare la risposta anticorpale nei confronti della fase I e II in maniera distinta, a differenza dei comuni kit commerciali basati su mix di antigeni. I risultati sono stati, quindi, confrontati con quelli ottenuti utilizzando l'ELISA in-house.

6.10 Elisa indiretto “in-house”

Dopo quantificazione con metodo Bradford, le proteine ricombinanti sono state diluite a concentrazione di 1 ng/μl in una soluzione tampone a pH 9.6 (buffer carbonato/bicarbonato 0,1M) e quindi utilizzate per il *coating* di piastre da 96 pozzetti (Maxisorp).

Il *coating* è avvenuto aggiungendo 100 μl di soluzione contenente l'antigene, a 4°C, *overnight*. Quindi le piastre sono state svuotate e bloccate per 3h con una soluzione di caseina bovina al 2.5%. Dopodichè i sieri sono stati diluiti 1:100 in un buffer fosfato contenente caseina all'1.25% e dispensati nei singoli pozzetti. Trascorsa un'incubazione di 1 h a temperatura ambiente, ed effettuati 3 lavaggi con 300 μl di *washing* buffer, è stato aggiunto l'anticorpo secondario (monoclonale anti-IgG bovine o anti-goat/sheep a seconda della specie presa in considerazione) per 45 min a temperatura ambiente. Dopo ulteriori lavaggi, la soluzione di sviluppo contenente 3,3',5,5' - tetrametilbenzidina (TMB), 100 μl è stata incubata per 15 min, al termine dei quali è stata addizionata un uguale volume di soluzione di stop (H₂SO₄ 0.2 M).

La O.D. (*optical density*) è stata valutata a 450 nm con spettrofotometro (Microplate Absorbance Reader, Biorad).

Per gli antigeni che hanno fornito risultati incoraggianti, il protocollo utilizzato è stato messo a punto testando differenti quantità di ciascun antigene con diluizioni sierali dei sieri positivi e negativi di controllo (criss-cross reaction) e, dopo aver valutato il rapporto tra le assorbanze dei sieri positivi e negativi, sono state selezionate le migliori condizioni di lavoro.

6.11 Elisa a doppio antigene

Nel caso di Ybgf è stato sperimentato anche un protocollo ELISA a doppio antigene, allo scopo di ottenere un test basato su più classi di immunoglobuline e adattabile a più specie animali. L'antigene prodotto in forma ricombinante è stato quindi coniugato alla perossidasi. Una fiala di horseradish peroxidase (HRP) da 2000 unità è stata idratata in 540 μl di acqua, miscelata con 120 μl di sodio periodato 0,088 M e incubata al buio, per 15 min. Quindi sono stati aggiunti 60 μl di glicole etilenico trasferendo il contenuto in un tubo da 15 ml. A questo punto sono stati addizionati 6 mg

di Ybgf, dializzata contro tampone carbonato pH 9.6, incubata 2 h a temperatura ambiente, in agitazione. Dopo l'aggiunta di sodio bromuro (50 mg NaBH₄ in 10 ml di 0.1 mM di NaOH) e un'incubazione di 2 h a 4°C, il prodotto ottenuto è stato sottoposto a dialisi nei confronti di 100 volumi di TRIS mM ph 7.5, 0,5 M NaCl, overnight a 4°C.

Il prodotto di dialisi è stato incubato per 30 min su basculante con una resina ConA-sepharose (Sigma). Dopo aver trasferito il contenuto in una colonna da cromatografia manuale, sono stati ottenuti degli eluati in saccarosio 1 M. L'antigene coniugato così ottenuto è usato come secondario nel seguente protocollo ELISA:

- Coating di 25 ng di Ybgf ricombinante
- Blocking con 300 µl di caseina
- Lavaggio con 300 µl di washing buffer
- Aggiunta del campione: 25 µl di siero e 25 µl di diluente, 1h a temperatura ambiente
- Lavaggi con 300 µl di washing buffer X 3
- Aggiunta del secondo antigene (100 µl antigene coniugato, diluito 1:100 in apposito buffer). Incubazione di 1h
- Lavaggi con 300 µl di washing buffer X 3
- Aggiunta di 100 µl di TMB, 15 min
- Aggiunta della soluzione di stop (100 µl di Acido solfridico 0.2 M)

6.12 Kit Elisa Commerciale

Tutti i sieri in esame sono stati testati per la ricerca di anticorpi (IgG) nei confronti di *C. burnetii* con un kit commerciale (Q fever Coxiella burnetii antibody test kit, IDEXX), seguendo le indicazioni della ditta manifatturiera. Il test in questione è tra i più utilizzati per il monitoraggio nei ruminanti su base routinaria, è prodotto a partire da mix di antigeni nativi di fase I e II e possiede una sensibilità diagnostica pari a 88.57% e una specificità diagnostica pari a 99%,

In particolare, i sieri diluiti 1:400 nell'apposito buffer sono incubati per 1 h a 37 °C. Quindi, dopo 3 lavaggi con 300 µl di *washing buffer*, sono stati aggiunti 100 µl del coniugato anti-IgG *ruminant*, per 30 min a 37 °C. Dopo un ulteriore ciclo di lavaggi, la piastra è stata asciugata con cura e sono stati dispensati 100 µl di substrato (TMB) per 15 min, cui segue l'aggiunta di 100

μ l di soluzione di stop. Quindi la piastra è stata letta a 450 nm ed i valori di O.D. ottenuti sono stati confrontati con quelli del controllo positivo per l'interpretazione dei risultati.

6.13 Questionario ed analisi statistica

In tutti gli allevamenti della regione Campania sottoposti a campionamento si è provveduto alla compilazione di un questionario in presenza dell'allevatore. Il fine è stato quello di raccogliere informazioni di natura zootecnica (come ad es. il numero di capi in lattazione, il livello di intensività ecc.), manageriale (come ad es. l'eventuale attuazione di trattamenti antiparassitari e rodenticidi ecc.) e di tipo anamnestico (come ad es. la frequenza di problematiche della sfera riproduttiva ecc.) relative alle diverse aziende. I dati raccolti hanno rappresentato la base per la successiva analisi dei fattori di rischio, in modo da evidenziare quali elementi, pratiche e caratteristiche aziendali possano in qualche modo influenzare l'ingresso, la diffusione e il mantenimento dell'infezione in azienda.

In figura 19, il *fac-sisimile* completo del questionario. L'analisi statistica è stata effettuata tramite MedCalc per Windows, versione 18.11.3 (MedCalc Software, Ostend, Belgium), per il modello logistico è stato utilizzato JMP versione 14.1.0 (SAS Institute Inc.). Valori di $P < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

QUESTIONARIO

Capi in lattazione: <25 25≤50 >50

Tipologia di allevamento : intensivo semi-estensivo estensivo

Introduzione animali da altri allevamenti: costante (tutti i mesi)
saltuaria (di frequente) nulla (mai)

Riproduzione: naturale (toro) inseminazione artificiale

Presenza di altri ruminanti in azienda: si no

Corretta gestione del letame : si no

Anamnesi di malattie abortigene nell' ultimo anno: IBR BVD
 Brucella Febbre Q Chlamydia Neospora

Anamnesi di disturbi riproduttivi nell'ultimo anno : si no

Frequenza di fenomeni abortivi/ritenzione di placenta: ogni mese
(frequente) intervalli di 1-3 mesi (sporadico) ogni 3 mesi (raro)

Trattamenti nei confronti dei roditori : si no

Trattamenti antiparassitari (zecche) : si no

Fig. 19 Raccolta dati espletata tramite questionario necessaria per la successiva analisi dei fattori di rischio connessi all'infezione da C. burnetii

Capitolo 7

Risultati

7.1 Amplificazione e clonaggio delle sequenze di interesse

Tutte le sequenze d'interesse sono state amplificate con successo a partire dal DNA genomico di *Coxiella burnetii* RSA 493 fase I e sono state sottoposte ad elettroforesi su gel di agarosio per la visualizzazione delle bande attese. Queste ultime presentano diverse intensità a seconda della proteina considerata, dimostrando una buona efficienza della reazione di PCR e assenza di aspecifici.

Gli amplificati sono stati quindi digeriti con specifici enzimi di restrizione e inseriti in appositi plasmidi utili alla trasformazione di *E.coli*.

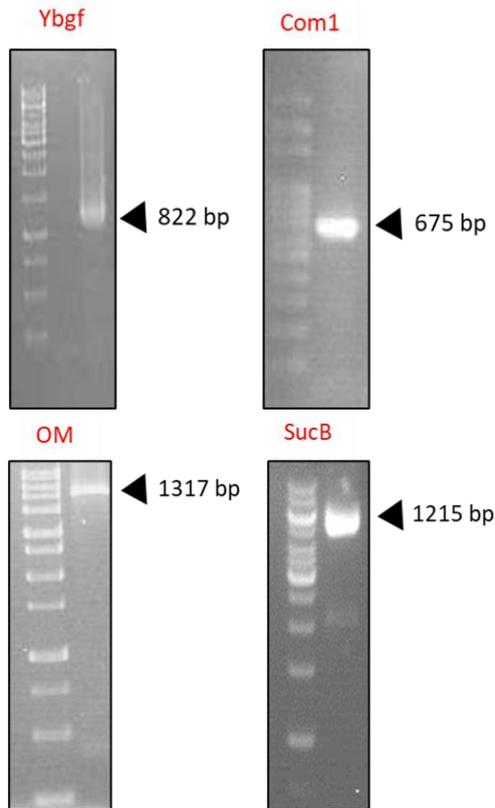


Fig. 20 Analisi elettroforetica delle sequenze amplificate (Ybgf=822 bp; Com1=675 bp; OM=1317 bp; SucB=1215 bp) e visualizzazione delle bande attese in gel d'agarosio all'1,5%.

7.2 Trasforming, produzione e purificazione degli antigeni

Il *transforming* e la crescita delle colonie di *E.coli BL 21 C 43* con gli specifici vettori di espressione è avvenuto con successo ed è stato evidenziato attraverso la crescita delle colonie in terreno contenente ampicillina. Tramite PCR di screening è stato confermato l'avvenuto clonaggio unidirezionale visualizzando la banda attesa (corrispondente al plasmide contenente l'inserto) in elettroforesi su gel d'agarosio.

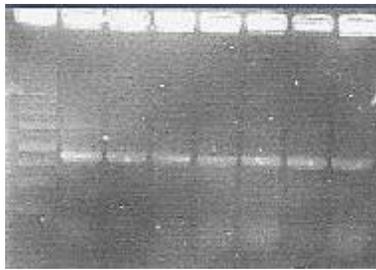


Fig. 21 Esempio di PCR di screening sulle colonie batteriche (Com1). Tutte le colonie sono state trasformate correttamente ed esprimono il gene d'interesse evidenziabile con una banda attesa di circa 5600 bp (4984 bp relative al plasmide P_{gex 6P} addizionate alle 675 bp della sequenza relativa a Com1)

Dopo aver selezionato e messo in coltura le colonie trasformate, si è proceduto a una prova di espressione tramite induzione della sintesi proteica con IPTG.

Sottoponendo le aliquote delle colture batteriche a corsa elettroforetica (SDS-page) su gel d'acrilamide, colorato con blu di Coomassie, è stato possibile confermare l'effettiva correlazione tra l'espressione della proteina specifica e l'operone *lac*, evidenziando le differenze nel pattern di espressione proteica tra la frazione "pre-induzione" e quella "post-induzione" (fig. x).

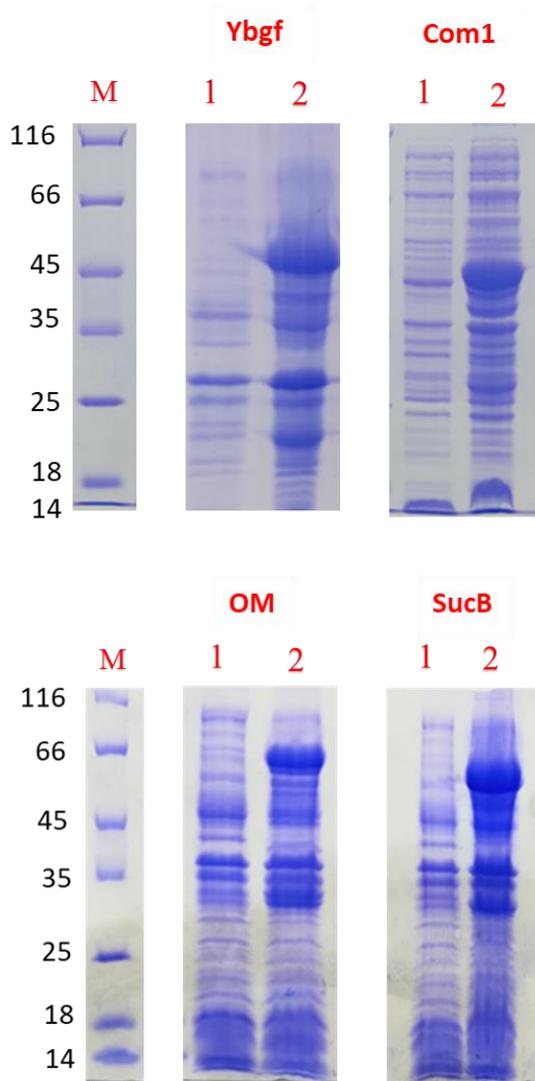


Fig. 22 Elettroforesi su gel di acrilamide colorato con blu di Comassie. Differenza nel pattern di espressione proteica tra colture batteriche non indotte (1) e indotte con IPTG (2).

La purificazione delle proteine target, antigeni candidati per l'allestimento degli ELISA, ha dato gli esiti sperati, come dimostrato dall'analisi elettroforetica in SDS-page e Western Blot, mostrando un certo grado di purezza, nonostante negli eluati finali fossero presenti anche altri residui proteici. Per quanto concerne le proteine espresse in fusione con la GST, ossia Com1 e Ybgf, si è proceduto al clivaggio proteolitico direttamente in colonna, permettendone la separazione dal carrier di espressione.

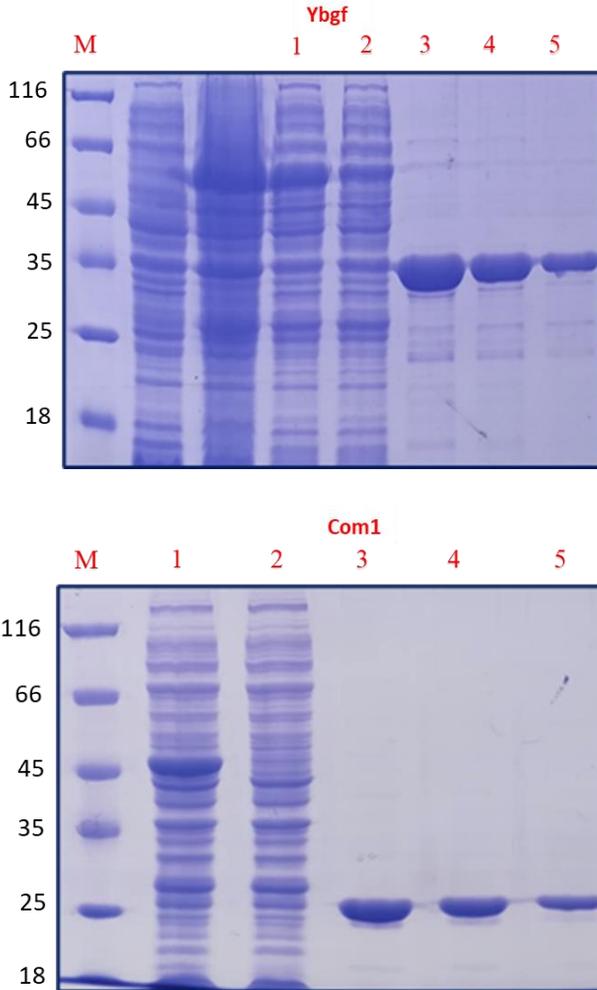


Fig. 23 Analisi in SDS-PAGE delle frazioni ottenute: M= marker, 1= estratto totale, 2=estratto totale post-adsorbimento in resina, 3,4,5= eluati della proteina purificata e clivata.

Nel pozzetto 1 si può osservare la sovraespressione di una banda corrispondente a circa 60 kDa nel caso di Ybgf e a circa 50 kDa per quanto riguarda Com1, assimilabile alla proteina di fusione. L'intensità di tale banda si riduce nei pozzetti 2 a causa dell'adsorbimento della proteina con la resina. Nei pozzetti 3,4 e 5 si osserva la proteina purificata in condizioni native e clivata. Quest'ultima, liberatasi della GST, riacquisisce il peso molecolare originale (Ybgf 35 kDa e Com1 25 kDa).

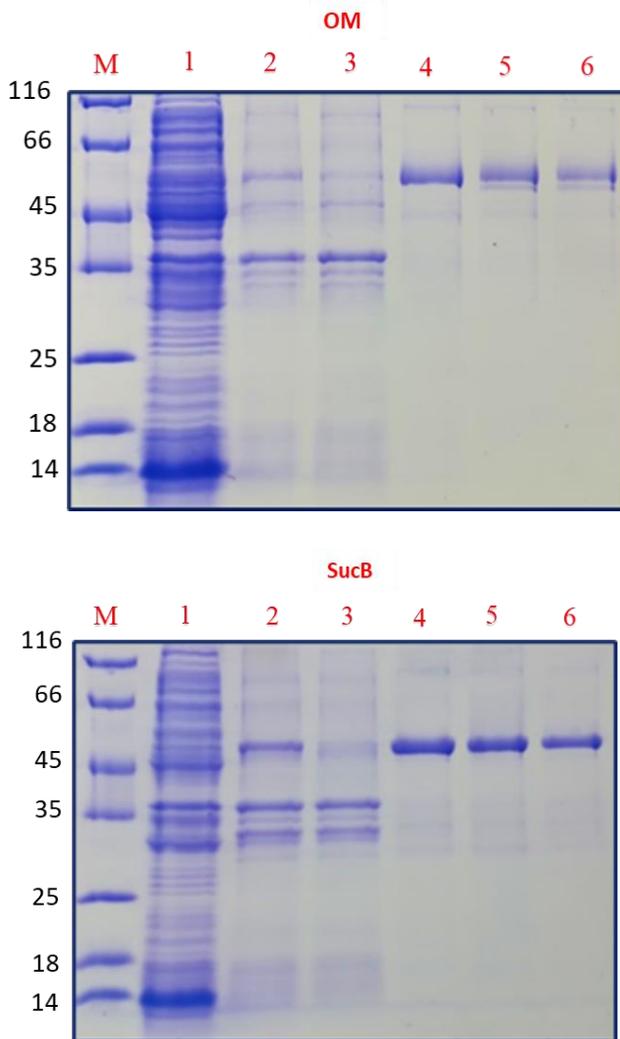


Fig. 24 Analisi in SDS-PAGE delle frazioni ottenute: M= marker, 1= lisato totale, 2=estratto in urea 1M, 3= estratto in Urea 1M post-adsorbimento in resina, 4,5,6= frazioni della proteina eluita. Nel pozzetto 2 si puà osservare la presenza di una banda corrispondente a circa 50 kDa nel caso di OM e a circa 47 kDa per quanto riguarda SucB. L'intensità di tale banda si riduce nei pozzetti 3 a causa dell'adsorbimento della proteina con la resina. Nei pozzetti 4, 5 e 6 si osserva la proteina purificata in condizioni denaturanti in tre differenti eluati

La concentrazione delle proteine ricombinanti è stata valutata con il saggio di Bradford e quantizzata come riportato di seguito:

Tab.8 Quantizzazione in Bradford degli eluati ottenuti

<i>Antigene ricombinante</i>	<i>Eluato 1 (E1)</i>	<i>Eluato 2 (E2)</i>
<i>Ybgf</i>	2.8 mg/ml	1.5 mg/ml
<i>Com1</i>	1.4 mg/ml	0.87 mg/ml
<i>OM</i>	0.42 mg/ml	0.38 mg/ml
<i>SucB</i>	0.62 mg/ml	0.49 mg/ml

Pertanto, i primi eluati purificati (E1) sono stati adoperati per il *coating* di piastre ELISA, mentre i secondi (E2) sono stati utilizzati per il saggio in Western Blot.

7.3 Spettrometria di massa

L'analisi in spettrometria di massa ha permesso di confermare ulteriormente l'identità delle proteine separate per mezzo dell'elettroforesi e contenute nelle bande.

Infatti, Ybgf, Com1 e SucB hanno riportando dei valori di *coverage*, ovvero percentuali di corrispondenza della sequenza amminoacidica confrontata con quelle contenute in uno specifico database, superiori al 15%. Anche altre caratteristiche fisico-chimiche si sono rivelate sovrapponibili.

Non è stato possibile confermare, invece, l'identità della proteina OM.

Tab. 9 Analisi in spettrometria di massa degli antigeni ricombinanti prodotti

Accession	Mw (Da)	PI (pH)	PLGS score	Peptides	Coverage	Precursor RMS Mass Error (ppm)	Products RMS Mass Error (ppm)	Products RMS RT Error (min)
Q83F57 YBGF	34239	6,5376	18836,56	30	61,63%	5,3095	14,2794	0,0121489065
H7C7D7 Com1	27608	9,4456	30452,61	12	37,30%	8,1731	10,1281	0,03313456
Q83BU7 SueB	45867	5,4	28451,31	18	17,8%	6,0952	12,4981	0,013654
OM	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

7.4 Western blotting

L'analisi Western Blot ha permesso di evidenziare la reattività degli antigeni Ybgf, Com1 e, in parte, Suc-b nei confronti di alcuni sieri positivi.

Tali proteine non hanno mostrato reattività nei confronti dei sieri negativi. In particolare, Ybgf ha reagito con 3 sieri positivi su 4, Com1 e Suc-b con 2. In aggiunta, Suc-b ha evidenziato bande più o meno reattive ad altezze indesiderate, assimilabili a sottoprodotti della proteina in esame o a proteine di *E. Coli* reattive nei confronti dei sieri in esame.

La proteina OM ha invece espletato reazioni aspecifiche indipendentemente dal tipo di siero (positivo o negativo).

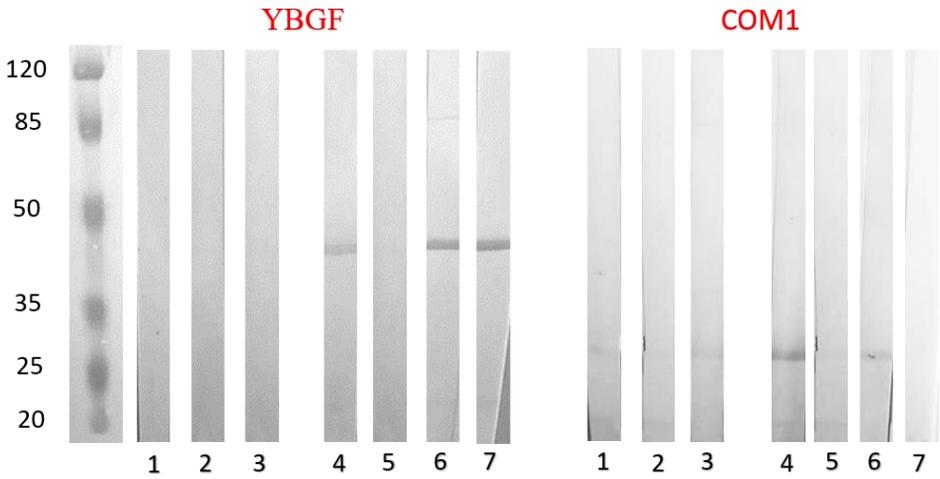


Fig. 25 Dettaglio della reattività degli antigeni *Ybgf* e *Com1* in western blot. Le strip 1, 2 e 3 di ciascun antigene sono state incubate con sieri negativi, quelle 4, 5, 6 e 7 con sieri positivi

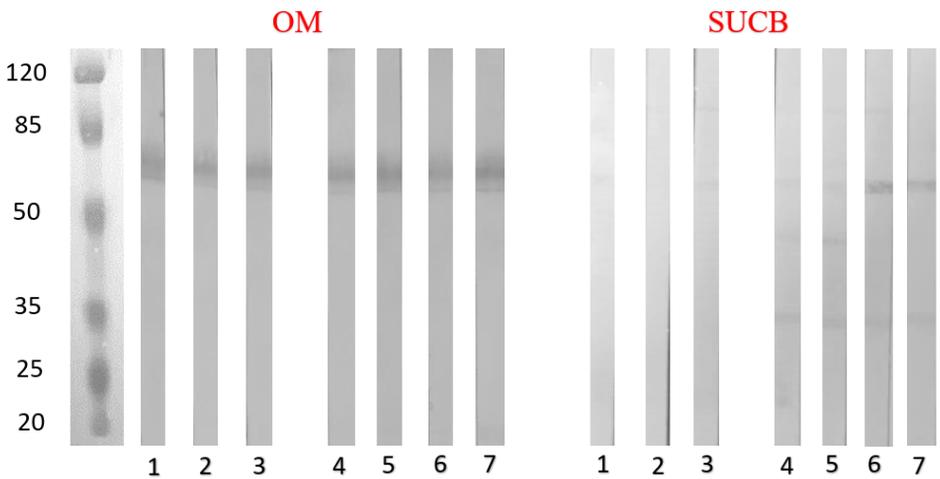


Fig. 26 Dettaglio della reattività degli antigeni *OM* e *SubB* in western blot. Le strip 1, 2 e 3 di ciascun antigene sono state incubate con sieri negativi, quelle 4, 5, 6 e 7 con sieri positivi

7.5 Allestimento degli Elisa-in house e confronto con Elisa commerciale

Ciascun saggio ELISA è stato messo a punto testando differenti quantità di ciascun antigene con diluizioni sierali dei sieri positivi e negativi di controllo (criss-cross reaction) e, dopo aver valutato il rapporto tra le assorbanze dei sieri positivi e negativi, sono state selezionate le migliori condizioni di lavoro. Una volta settate le condizioni di lavoro, sono stati allestiti dei test ELISA con l'utilizzo dei diversi antigeni e di sieri a sieroreattività nota al fine di individuare IgG anti-*Coxiella*. Un totale di 196 sieri appartenenti a soggetti di specie mista (bovini, ovini e caprini) ha rappresentato il panel per la prima indagine volta alla valutazione delle potenzialità diagnostiche delle proteine in esame per la rilevazione di anticorpi specifici nei confronti di *C. burnetii*.

Parallelamente a tale valutazione, tutti i sieri in esame sono stati saggiati tramite un kit commerciale, basato su antigeni nativi inattivati e in grado di valutare la presenza di specifiche IgG con elevata sensibilità e specificità.

I risultati ottenuti con i due kit (*in house* e commerciale) sono stati confrontati ed hanno confermato quanto appurato tramite Western Blot, definendo Ybgf come l'antigene più promettente, su cui si sono concentrate ulteriori analisi di approfondimento, testando un totale di 587 campioni. Infatti, i valori di sensibilità e specificità relativa, nonché di concordanza, dell'ELISA rYbgf si sono mostrati maggiori rispetto agli altri antigeni saggiati, come si evince dalle figure 25 e 26.

Per quanto concerne OM, le reazioni aspecifiche osservate in Wester Blot si sono ripetute nel saggio immuno-enzimatico in questione.

I valori K di Cohen ottenuti hanno rivelato un buon grado di concordanza nel caso di Ybgf (K compresa tra 0.6 e 0.8) e discreto per rSucb e rCom1 (K compresa tra 0.4 e 0.6). In nessun caso il valore K ha assunto valore compreso tra 0.8 e 1, indice di eccellente concordanza.

Il Kappa di Cohen è un coefficiente statistico che rappresenta il grado di accuratezza e affidabilità in una classificazione statistica, tenendo conto della probabilità di concordanza casuale e viene calcolato in base al rapporto tra l'accordo in eccesso rispetto alla probabilità di concordanza casuale e l'eccesso massimo ottenibile.

Utilizzando i valori di O.D. ottenuti in ELISA è stato possibile ideare una curva ROC, grazie all'ausilio del software MedCalc (Software, Ostend, Belgium).

L'area sottesa alla curva (AUC) indica la capacità discriminativa del test considerato (maggiore è il valore dell'area, maggiore risulta l'accuratezza del test), corrisponde a 0.85, con errore standard (se) di 0.032 e un intervallo di confidenza al 95% (IC 95) da 0.816 a 0.879.

La curva ROC ha permesso anche di evidenziare come il *cut-off* scelto arbitrariamente (0.5 O.D. a 450 nm) coincida con quello dotato delle migliori performances (0.507).

Tab. 10 Performances di double rYbgf-ELISA confrontate con quelle di un kit commerciale

Overall	+ IDEXX	- IDEXX	Totali
+ rYbgf	92	9	101
- rYbgf	22	73	95
Totali	114	82	196

Tab. 11 Performances di rYbgf-ELISA confrontate con quelle di un kit commerciale

Overall	+ IDEXX	- IDEXX	Totali
+ double rYBGF	74	4	78
- double rYBGF	40	78	118
Totali	114	82	196

Tab. 12 Performances di rCom1-ELISA confrontate con quelle di un kit commerciale

Overall	+ IDEXX	- IDEXX	Totali
+ rCom1	70	15	85
- rCom1	44	67	111
Totali	114	82	196

Tab. 13 Performances di rSuch-ELISA confrontate con quelle di un kit commerciale

Overall	+ IDEXX	- IDEXX	Totali
+ rSuch	78	14	92
- rSuch	36	68	104
Totali	114	82	196

Tab. 14 Performances di rYbgf-ELISA confrontate con quelle di un kit commerciale nella specie bovina e negli ovicapri.

	+ IDEXX	- IDEXX	Totali
Ovicapri			
+ rYBGF	78	14	92
- rYBGF	16	123	139
Totali	94	137	231
Bovini			
+ rYBGF	48	29	77
- rYBGF	12	267	279
Totali	60	296	356
Overall			
+ rYBGF	126	43	169
- rYBGF	28	390	418
Totali	154	433	587

Tab. 15. Tabella riassuntiva delle performances ottenute suddivise per antigene: Sens.R= Sensibilità relativa; Spec. R= Specificità relativa; IC95= Intervallo di confidenza al 95%

Proteina	Sens. R	Spec. R	Concordanza	IC 95
rYbgf	81.8% (IC 95 74.8-87.5)	90.1% (IC 95 86.8-92.7)	0.88	(0.85- 0.9)
rYbgf-HRP double antigen	64.9% (IC 95 56.1-73.7)	95.1% (IC 95 90.4-99.8)	0.776	(0.72-0.83)
rCom1	61.2% (IC 95 52.3-70.1)	81.1% (IC 95 72.6-89.6)	0.699	(0.62-0.76)
rOM	/	/	/	/
rSucb	68.4% (IC 95 59-76.8)	82.9% (IC 95 73-90)	0.745	(0.67-0.8)

Sens.R= sensibilità relativa; Spec.R= specificità relativa; IC 95= intervallo di confidenza al 95%

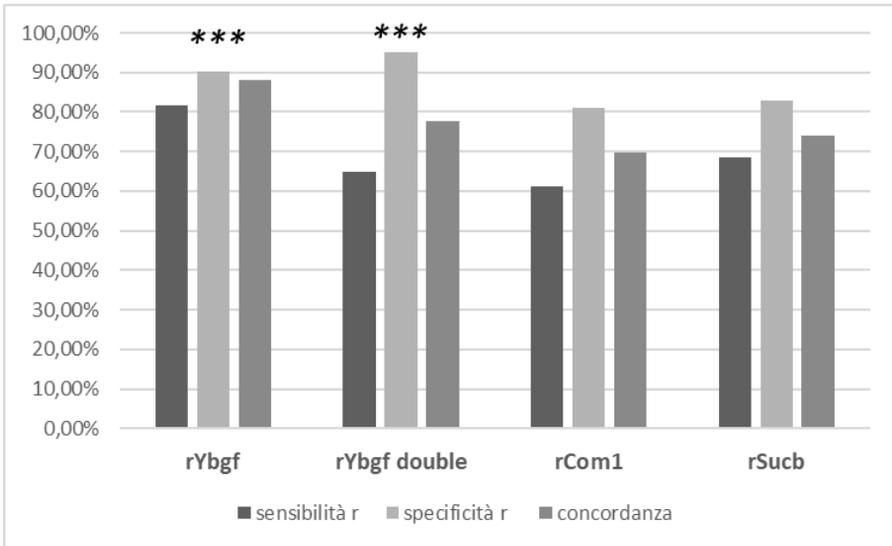


Fig. 27 Grafico riassuntivo delle performances ottenute in ELISA utilizzando i diversi antigeni. rYbgf e double-rYbgf hanno mostrato rispettivamente la migliore sensibilità e la migliore specificità.

Tab. 16 Valori di Kappa di Cohen calcolati per ogni antigene

Proteina	K Cohen	IC 95	SE
rYbgf	0.69	(0.631-0.763)	0.034
rYbgf-HRP double antigen	0.565	(0.495-0.635)	0.055
rCom1	0.411	(0.278-0.544)	0.068
rOM	/	/	/
rSubc	0.495	(0.374-0.616)	0.062

IC 95= intervallo di confidenza al 95%; SE= errore standard

Tab. 17 Griglia di valutazione del valore di K proposta da d Landis e Koch

Kappa	Concordanza
< 0.00	Scarsa
0.00-0.20	Leggera
0.21-0.40	Discreto
0.41-0.60	Moderato
0.61-0.80	Sostanziale
0.81-1.00	Quasi perfetto

Tab. 18 Tabella riassuntiva delle performances ottenute in rYbgf-ELISA in diverse specie di ruminanti.

Specie	Sens. R	Spec. R	Concordanza	IC 95	K Cohen	IC 95	SE
Ovicapriini	83 % (IC 95 73.8-89.9)	89.8% (IC 95 83.4-94.3)	0.87	(0.82-0.91)	0.73	(0.640-0.82)	0.046
Bovini	80% (IC 95 67.7-89.2)	90.2% (IC 95 86.2-93.3)	0.88	(0.84-0.91)	0.63	(0.524-0.737)	0.054
Overall	81.8% (IC 95 75.7-87.9)	90.1% (IC 95 87.3-92.9)	0.88	(0.85-0.9)	0.697	(0.631-0.763)	0.034

Sens.R= sensibilità relativa; Spec.R= specificità relativa; IC 95= intervallo di confidenza al 95%; SE= errore standard

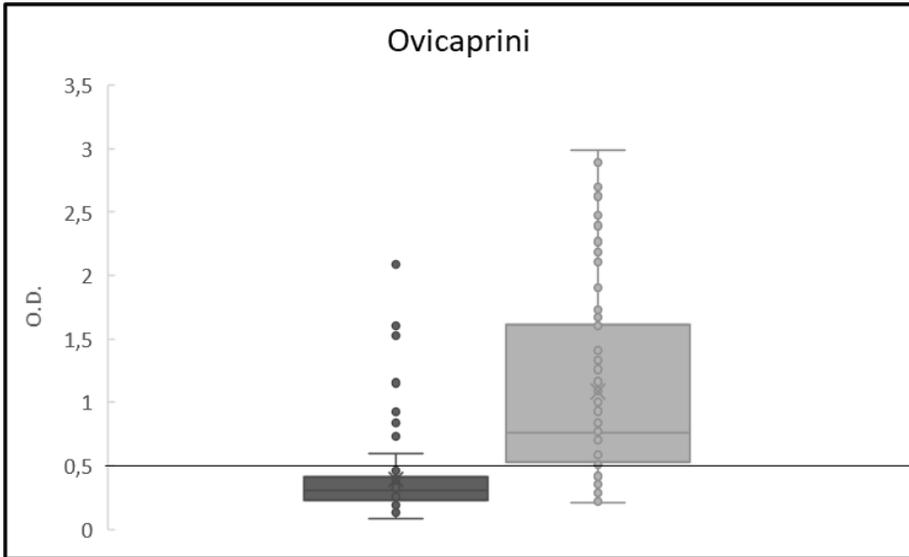


Fig. 28 Box plot della distribuzione delle assorbanze ottenute in rYbgf ELISA testando sieri di ovicapriini positivi e negativi al kit commerciale. La base dei boxes rappresenta il primo quartile di distribuzione, la linea centrale la mediana e il lato superiore il terzo quartile.

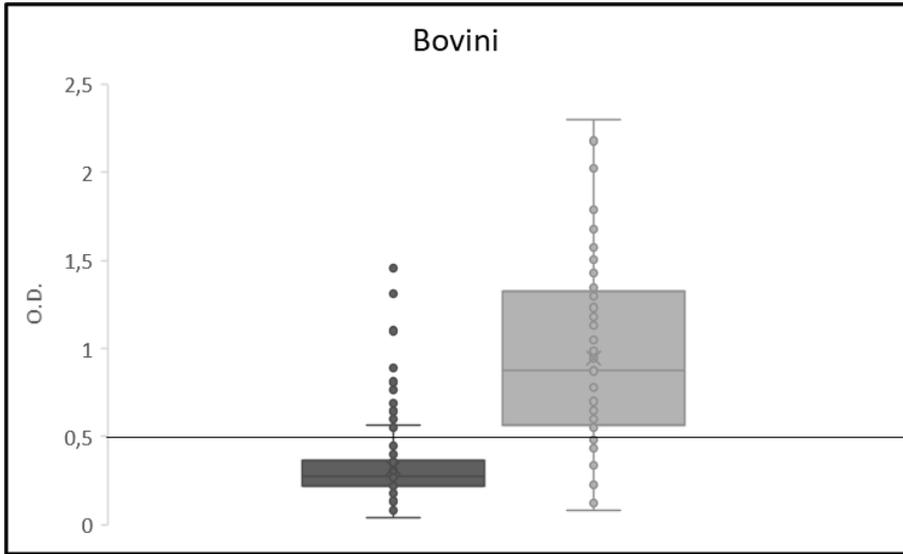


Fig. 29 Box plot della distribuzione delle assorbanze ottenute in rYbgf ELISA testando sieri bovini positivi e negativi al kit commerciale. La base dei boxes rappresenta il primo quartile di distribuzione, la linea centrale la mediana e il lato superiore il terzo quartile.

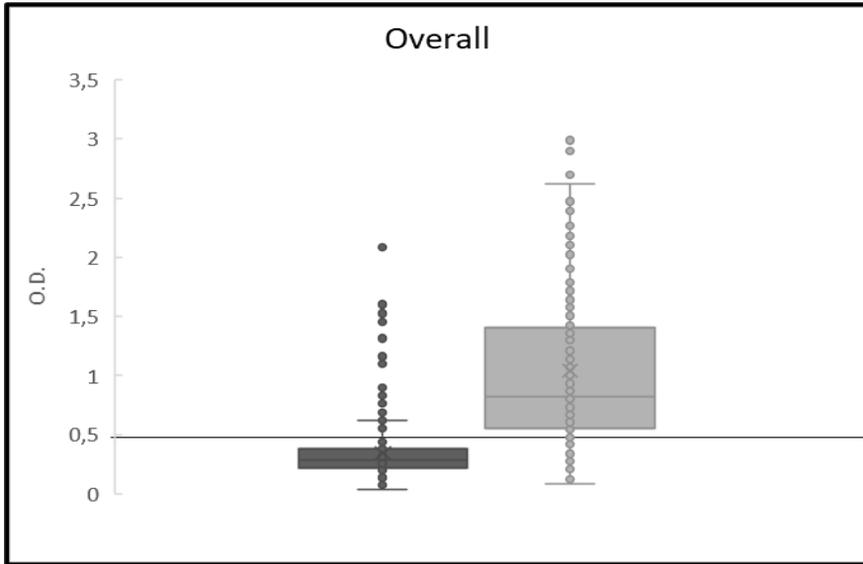


Fig. 30 Box plot della distribuzione delle assorbanze ottenute in rYbgf ELISA testando sieri bovini positivi e negativi al kit commerciale. La base dei boxes rappresenta il primo quartile di distribuzione, la linea centrale la mediana e il lato superiore il terzo quartile.

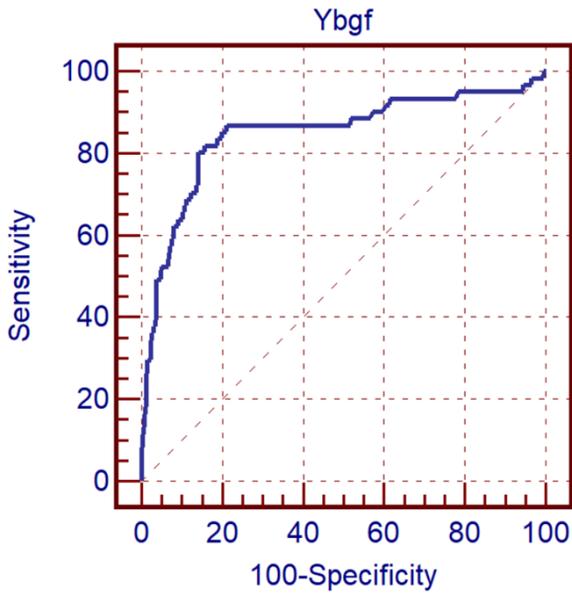


Fig. 31 Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis del rYbgf ELISA generata utilizzando i risultati ottenuti analizzando 433 sieri negativi e 154 sieri positivi.

7.6 Valutazione della reattività vaccinale

L'eventuale reattività dell'antigene Ybgf nei confronti di sieri appartenenti ad animali vaccinati è stata valutata su un totale di 10 animali di specie bovina, i risultati sono stati monitorati a diversi tempi e confrontati con quelli ottenuti testando gli stessi sieri con un kit commerciale fase specifico (Q-fever Elisa 1 e 2 bulk antigene, BioScience Slovakia s.r.o.).

La reattività nei confronti degli antigeni di fase I e II aumenta esponenzialmente e in maniera statisticamente significativa già a 21 giorni dalla somministrazione della prima dose di vaccino (t21), rendendo molti animali positivi al test.

Per quanto concerne Ybgf si assiste, al t21, ad un transitorio ma significativo aumento della densità ottica (O.D.). Quest'ultimo non è in grado di rendere positivo alcun animale in quanto i valori di O.D. risultano sempre inferiori a 0.5, valore di *cut-off*. Nel gruppo di controllo, composto da due animali non vaccinati, non si è assistito ad alcuna variazione di sieroreattività a entrambi i test.

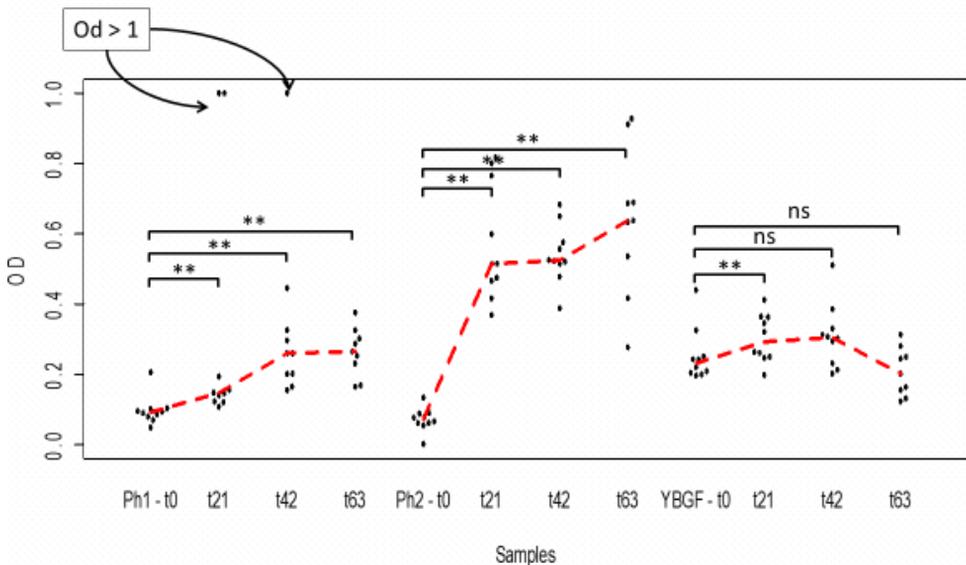


Fig. 32 Andamento della reattività dei sieri appartenenti ad animali vaccinati nei confronti degli antigeni di fase I, degli antigeni di fase II e Ybgf.

7.7 Sieroprevalenza di *C. burnetii* in regione Campania

Uno studio di sieroprevalenza dell'infezione da *C. burnetii* è stato condotto in regione Campania campionando 412 sieri bovini in 21 allevamenti di vacche da latte.

Un totale di 59 animali sono risultati positivi al test ELISA commerciale, distribuiti in maniera abbastanza uniforme tra le diverse province, contribuendo al raggiungimento di una prevalenza del 14.3%. Ben 17 allevamenti su 21 presentano almeno un animale sieropositivo.

Dall'analisi è stata deliberatamente esclusa la provincia di Napoli, poiché in possesso di un patrimonio zootecnico trascurabile, circa il 2.6% del patrimonio di ruminanti campano (fonte Banca Dati Nazionale dell'Anagrafe Zootecnica).

Le prevalenze provinciali risultano le seguenti, come si può osservare nella Tab. 19: Avellino 13% (IC 95% 6.4 - 19.4), Benevento 8% (IC 95% 2.7 - 13.3), Caserta 18.75% (IC 95% 11.55 - 25.95) e Salerno 17% (IC 95% 9.6 - 24.4).

Prevalenze maggiori si riscontrano nelle province di Caserta e di Salerno, nel caso di Caserta, significativamente maggiore rispetto a quella ottenuta nella provincia di Benevento (OR 2.5; IC 95% 1.04-5.96).

I dati aziendali relativi ai fattori di rischio di tipo manageriale ed anamnestico, raccolti tramite questionario, sono stati analizzati statisticamente, osservando correlazione per diverse voci (Tab. 20).

In particolare, sono state evidenziate prevalenze maggiori e statisticamente significative quando gli animali sono allevati in sistemi aziendali aperti (p value 0.0057), intensivi (p value 0.0385) che presentavano altri ruminanti in azienda (p <0.0001), che già evidenziavano anamnesi di malattie infettive abortigene nell'ultimo anno (p <0.0001) e periodiche problematiche della sfera riproduttiva quali aborti, ritenzioni di placenta ecc. (p value 0.0497).

Prevalenze maggiori sono state individuate parallelamente all'aumento dei capi in lattazione e in base all'età dei soggetti testati ma senza significatività statistica.

L'adozione di un sistema di riproduzione naturale (monta naturale) o mista sembrerebbe ridurre il rischio di infezione (p= 0.0038).

Tab. 19 Prevalenza dell'infezione da *C. burnetii* ottenuta nelle diverse province in regione Campania

Provincia	N°animali pos.	Prevalenza	95% IC	N°aziende pos.
Avellino	13/100	13%	6.4 - 19.4	5/5
Benevento	8/100	8%	2.7 – 13.3	3/5
Caserta	21/112	18.75%	11.55 – 25.95	6/6
Salerno	17/100	17%	9.6 – 24.4	3/5
Totale	59/412	14.3%	10.6 – 17.7	17/21

IC= intervallo di confidenza al 95%
Pos.= positivi

Tab. 20 Prevalenza di *C. burnetii* nelle diverse categorie ed analisi dei fattori di rischio.

	Testati	Positivi	Sieroprevalenza	χ^2	"p" value	OR
Provincia						
Avellino	100	13	13%	6.14	0.3319	1.45 (IC 95 0.68-3.1)
Benevento	100	8	8%		0.0388	2.5 (IC 95 1.04-5.96)
Caserta	112	21	18.75%		Ref.	Ref.
Salerno	100	17	17%		0.8696	1.06 (IC 95 0.52-2.16)
Età						
Manze (< 14 mesi)	69	8	11.6% (IC 95 4.05-19.15)	0.271		Ref.
Adulti (>14 mesi)	343	51	14.9% (IC 95 11.1-18.7)		0.6025	0.75 (IC 95 0.34- 1.66)
N° di animali in lattazione						
<25	80	7	8.75% (IC 95 2.65-14.85)	3.64		2.2 (IC 95 0.89-5.39)
25-50	200	28	14% (IC 95 9.2-18.8)			1.29 (IC 95 0.71-1.36)
>50	132	24	18.2% (IC 95 11.6-24.8)		0.162	Ref.
Tipologia allevamento						
Intensivo	292	49	16.8% (IC 95 14.5-21.1)	4.282		Ref.
Semiestensivo/estensivo	120	10	8.3% (IC 95 3.4-13.2)		0.0385	2.95 (IC 95 1.43-6.05)

	Testati	Positivi	Sieroprevalenza	χ^2	"p" value	OR
Presenza di altri ruminanti						
Sì	112	30	26.8%(IC 95 18.6-35)	18.109		Ref.
No	300	29	9.7%(IC 95 6.4-13)		<0.0001	3.42 (IC 95 1.94- 6.03)
Introduzione di nuovi capi						
Costante	40	12	30% (IC 95 15.8-44.2)	10.342		Ref.
Saltuaria	212	29	13.7%(IC 95 9.1-18.3)			2.7 (IC 95 1.23-5.9)
Nulla	160	18	11.3%(IC 95 6.4-16.2)		0.0057	3.6 (IC 95 1.5-8.3)
Fecondazione						
Artificiale	312	54	17.3%(IC 95 13.1-21.5)	8.373		Ref.
Naturale	100	5	5%(IC 95 0.7-9.3)		0.0038	3.98 (IC 95 1.54-10.24)

	Testati	Positivi	Sieroprevalenza	χ^2	"p" value	OR
Procedure di derattizzazione						
Si	292	46	15.75% (IC 95 11.6-19.95)	1.301		Ref.
No	120	13	10.8% (IC 95 5.3-16.2)		0.254	1.54 (IC 95 0.79-2.97)
Corretta gestione dei reflui						
Si	252	42	18.7% (IC 95 13.9-23.5)	2.44		Ref.
No	160	17	10.6% (IC 95 5.8-15.4)		0.118	1.70 (IC 95 0.92-3.07)
Presenza di gatti						
Si	200	24	12% (IC 95 7.5-16.5)	1.358		Ref.
No	212	35	16.5% (IC 95 11.5-21.5)		0.244	0.70 (IC 95 0.39-1.21)
Antiparassitari						
Si	192	30	15.6% (IC 95 10.5-20.7)	0.32		Ref.
No	220	29	13.2% (IC 95 8.7-17.7)		0.5719	1.22 (IC 95 0.70- 2.12)

	Testati	Positivi	Sieroprevalenza	χ^2	"p" value	OR
Anamnesi mal.infettive						
Si	132	34	25.8% (IC 95 18.3-33.3)	19.358		Ref.
No	280	25	8.9% (IC 95 5.6-12.2)		<0.0001	3.54 (IC 95 2.01-6.24)
Anamnesi infertilità						
Si	152	29	19.1% (IC 95 12.9-25.3)	3.852		Ref.
No	260	30	11.5% (IC 95 7.6-15.4)		0.0497	1.81 (IC 95 1.03- 3.15)
Frequenza di problemi della sfera riproduttiva						
Alta (mensile)	120	25	20.8% (IC 95 13.6-28)	5.98		Ref.
Intermedia (1-3 mesi)	172	19	11% (IC 95 6.3-15.7)			1.98 (IC 95 1.02-3.81)
Bassa (3-6 mesi)	120	15	12.5% (IC 95 6.6-18.4)		0.0504	1.89 (IC 95 0.94-3.79)

χ^2 = chi-quadro; OR= odds ratio

Capitolo 8

Discussione

Nonostante la febbre Q rappresenti un'importante problematica di sanità pubblica a livello mondiale e risulti fonte di ingenti perdite economiche in ambito zootecnico, è annoverata tra le zoonosi maggiormente sottostimate e sottovalutate (Rizzo et al., 2016). Il focolaio verificatosi nei Paesi Bassi tra il 2007 e il 2010, che ha registrato 4000 casi certificati (si stima che quelli reali fossero circa 50,000) e numerose morti, deve essere di monito e deve sensibilizzare le autorità internazionali nell'attuazione di piani e misure concrete per il controllo di questa infezione, in quanto la risoluzione definitiva esula da indagini episodiche ed estemporanee.

Considerata l'epidemiologia di *C. burnetii*, i progressi e gli obiettivi da perseguire non possono che coinvolgere marcatamente il mondo veterinario, nonché rispettare il concetto di “*One Health*”.

In tal senso, la diagnostica veterinaria e, in particolare, quella sierologica, fondamentale per le operazioni di sorveglianza sanitaria, è caratterizzata da molteplici limiti. Infatti, i kit diagnostici odierni sono composti da mix complessi di antigeni, costosi e poco maneggevoli (per la produzione necessitano della coltura del microrganismo in BSL3), scarsamente standardizzati e in grado di dare luogo a *cross*-reazioni traducibili in risultati di campo discordanti (Fernandes et al., 2009). Le performances analitiche poco soddisfacenti di tali test, e la loro variabilità in base alla specie e alla matrice presa in considerazione (Kittelberger et al., 2009), sono altresì evidenziate da studi bibliografici. Peraltro, i kit in questione non sono in grado di offrire informazioni circa lo stadio dell'infezione né, tanto meno, di distinguere gli animali infetti da quelli vaccinati. Paradossalmente negli allevamenti vaccinati risulta impossibile monitorare la circolazione del patogeno tramite test sierologici, poichè gli animali infetti si camufferebbero con quelli vaccinati, risultando positivi (Kowalczywska et al., 2011; Gerlach et al., 2017).

E' chiaro che le conoscenze in veterinaria sono piuttosto limitate se comparate a quelle ottenute in umana, dove la standardizzazione dei test di IFA offre garanzie sia in termini di performances che in termini di informazioni circa lo stadio dell'infezione. La ricerca ha dunque l'obbligo di colmare questi *gap*, avvalendosi di approcci innovativi, come ad esempio gli antigeni ricombinanti. Questi ultimi potrebbero potenzialmente snellire e facilitare le operazioni di sorveglianza nei confronti di questa malattia risolvendo parte delle problematiche finora descritte, essendo la loro produzione economica, rapida, maneggevole e ripetibile.

Ad oggi, l'unica applicazione di tale metodica nella sierodiagnosi di febbre Q nei ruminanti è rappresentata da una *heat shock protein B* (HspB)

utilizzata in un test *in house*, dimostratasi, tra l'altro, altamente specifica (97%) e più efficace nell' identificare precocemente l'infezione rispetto ai kit ELISA commerciali (Fernandes et al., 2009).

Il presente lavoro di ricerca rappresenta un'applicazione della tecnologia del DNA ricombinante in Medicina Veterinaria e si prefigge di saggiare quattro dei principali antigeni immunodominanti di *C. burnetii* prodotti in forma ricombinante per la sierodiagnosi di tale malattia infettiva nei ruminanti domestici.

A riprova di quanto descritto precedentemente, gli antigeni selezionati (Ybgf, Com1, OM, SucB) sono stati ampiamente studiati in medicina umana e rappresentano tra i più importanti candidati per l'applicazione nella sierodiagnosi e nella vaccinologia (Beare et al., 2008; Vigil et al., 2010, Derringer et al., 2011).

In particolare, Ybgf è stato proposto come marker di infezione acuta (specifico, quindi, per gli anticorpi di fase II) in diversi studi e rientra tra i primi cinque antigeni immunodominanti (Kowalczywska et al., 2012).

Com1 è ritenuta la proteina maggiormente sieroreattiva e, in studi di valutazione delle sue performance analitiche in ELISA, sono stati ottenuti risultati piuttosto variabili, con valori di sensibilità oscillanti tra il 38% ed il 90% ed una specificità intorno al 90% (Sekeyova et al., 2010; Chen et al., 2014; Beare et al., 2008). Rappresentando un marker di fase I, le performance di Com1 migliorano notevolmente (superando il 90%) se si considera esclusivamente la sua capacità di individuare le forme croniche della malattia (Vranakis et al., 2019).

Date tutte queste premesse i quattro antigeni immunodominanti sono stati espressi in *E. coli* al fine di saggiarne la reattività attraverso numerosi approcci.

Il clonaggio, l'espressione in modelli procarioti e la purificazione di tutte le proteine in oggetto sono avvenuti con estrema efficacia (fig. 23 e 24) e la successiva analisi in spettrometria di massa ha confermato l'effettiva identità di tali proteine, escludendo la presenza di aspecifici (Tab. 9).

I risultati ottenuti in ELISA e in Immunoblot risultano congruenti, complementari e spostano l'attenzione sull'antigene Ybgf, su cui si sono concentrate indagini integrative come la coniugazione all' HRP e la realizzazione di un ulteriore test ELISA, a doppio antigene.

Il comportamento completamente aspecifico della proteina OM, invece, dimostra come non sempre le proteine ricombinanti conservano le proprietà antigeniche delle proteine native. Il motivo risiede nel fatto che *E.coli*, oltre a poter apportare delle modifiche ai peptidi d'interesse, non è in grado di

espletare modifiche post-traduzionali, quali reazioni di glicosilazione, metilazione ecc. che possono contribuire alla definizione dei determinanti antigenici (Gallina et al., 1992).

Tra i 4 antigeni saggiati in ELISA, Ybfg si è rivelato il più promettente, mostrando valori di sensibilità e specificità relativa rispettivamente di 81.8% (IC 95% 74.8-87.5) e 90.1% (IC 95% 86.8-92.7) e mostrando una buona concordanza con il kit commerciale con cui è stato confrontato, sia quando utilizzato per il *coating* dell'ELISA indiretto classico (K di Cohen 0.69), che quando utilizzato nell'ELISA a doppio antigene (K di Cohen 0.565).

Il riscontro di performances imperfette può essere delucidato attraverso numerose spiegazioni.

In primo luogo, bisogna tener conto del fatto che Ybfg è, almeno nell'uomo, un marker specifico di fase II e, quindi, di infezione acuta, per cui potrebbe essere carente nell'identificazione delle infezioni croniche.

Ciò si unisce alle complesse dinamiche che caratterizzano la risposta anticorpale scatenata dall'infezione di *C. burnetii*, e al fatto che nei test in questione la ricerca è indirizzata a una singola classe anticorpale (IgG) diretta verso una singola proteina, marker di una precisa fase di infezione.

In secondo luogo, lo stesso test commerciale utilizzato per il confronto è dotato di performances imperfette che, in assenza di informazioni più precise circa gli animali infetti, alimentano sospetti relativi all'effettiva falsa positività di alcuni sieri all' rYbfg, che potrebbero in realtà rappresentare dei falsi negativi al kit commerciale. A tal riguardo diversi studi asseriscono che, a fronte di una specificità che si avvicina al 99%, la sensibilità si aggira intorno al 90% circa (Paul et al., 2013; Kittenberg et al., 2009; Horigan et al., 2011; Wood et al., 2019).

Anche nel caso di rYbfg la specificità risulta maggiore della sensibilità, specie per quanto riguarda il test a doppio antigene, che ha ottenuto le migliori performance (95.1% IC 95% 90.4-99.8).

I risultati relativi agli altri antigeni (Com1 e SucB) rilevano un numero maggiore di falsi positivi e negativi.

Anche se l'analisi *in silico* ha permesso di escludere eventuali *cross* reazioni o omologie con antigeni appartenenti ad altri microbi, bisogna considerare la possibilità dell'esistenza di epitopi in comune ad altri rappresentanti del mondo microbico e, in particolare, a germi filogeneticamente vicini a *Coxiella* e piuttosto comuni nei ruminanti, come *Rickettsia*, *Bartonella* e *Chlamydia*.

Per comprendere completamente tali dinamiche ed evidenziare le proteine cross-reattive nei confronti di altri patogeni, sarebbe necessario testare gli

antigeni oggetto di studio con sieri di animali affetti dalle infezioni provocate da parte degli agenti eziologici in grado di provocare potenziali *cross*-reazioni.

Altro fattore che ha probabilmente inciso sull'accuratezza della metodica è il mancato utilizzo di sieri standardizzati rappresentanti il controllo positivo. Certamente i saggi allestiti in tale ricerca non rappresentano al momento degli strumenti di utilizzo ipotizzabile nella diagnostica di *routine*, bensì necessitano di ulteriori prove sperimentali, magari confrontando le performances con un numero maggiore di sieri o con sieri di animali infetti sperimentalmente per capire a pieno l'evolversi della risposta immunitaria nei confronti dei singoli antigeni.

È altresì vero che essi rappresentano degli *screening* sierologici rapidi, economici, di semplice realizzazione e, in alcuni casi, dotati di accuratezza accettabile.

Nel caso di rYbgf è stata riscontrata, inoltre, una mancata sieroconversione in seguito alla vaccinazione, ovvero assenza di reattività vaccinale dovuta probabilmente al fatto che il vaccino è composto dal ceppo *Nine mile* in fase I e, quindi, potrebbe non scatenare risposta anticorpale nei confronti di tale proteina tale da positivizzare i soggetti vaccinati.

Monitorando l'andamento della sieroreattività nei confronti degli antigeni di fase I ed fase II in animali vaccinati, si assiste ad un progressivo aumento delle densità ottiche ottenute, statisticamente significativo per tutti i tempi analizzati, nonché alla positivizzazione di numerosi animali. Nel caso di Ybgf, invece, vi è solo un lieve e transitorio aumento delle densità ottiche a 21 giorni dalla prima vaccinazione, senza che nessun animale si positivizzi. Data l'assenza di protocolli DIVA (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*), laddove questa proprietà dovesse essere confermata su un numero maggiore di animali, per periodi prolungati nonché dopo ulteriori richiami, potrebbe rivelarsi estremamente utile come strumento di sorveglianza sierologica, specie in determinate evenienze, come ad esempio durante campagne di vaccinazione forzata (durante il famoso focolaio Olandese, difatti, la sorveglianza sierologica ebbe un ruolo piuttosto marginale).

Gli animali vaccinati, quando sottoposti ai kit ELISA commerciali comunemente utilizzati, composti da mix di antigeni nativi o dal "*whole cell antigen*", risultano sempre positivi, come esito dell'avvenuta sieroconversione (Fernandes et al., 2009; Horigan et al., 2011).

Utilizzando l'antigene Ybgf in parallelo con gli antigeni di fase I o con mix di antigeni si potrebbe allestire un protocollo DIVA in grado potenzialmente di identificare sia il tipo di infezione che l'avvenuta vaccinazione.

Anche se risulta complicato e forse utopico pensare di riuscire a diagnosticare un agente eziologico così complesso con l'utilizzo di una singola proteina, è certamente necessario continuare ad ampliare le conoscenze circa la sierodiagnosi in medicina veterinaria per scoprire nuovi strumenti utili e migliorare le *performances* degli strumenti già esistenti.

In tal senso, un approccio ideale includerebbe uno studio immunoproteomico dei ceppi di *Coxiella* circolanti sul territorio, evitando quindi l'utilizzo di ceppi di riferimento, e da realizzare nella specie di elezione, in modo da identificare antigeni immunodominanti specie-specifici.

Allo scopo di acquisire informazioni che possano contribuire a chiarire il quadro della diffusione della febbre Q in ambito regionale è stato condotto uno studio di sieroprevalenza di *C. burnetii* in regione Campania.

59 sieri su 412 si sono rivelati positivi, ottenendo una prevalenza del 14.3%. Esaminando i dati per provincia si è potuto constatare una certa variabilità: Avellino 13% (IC 95% 6.4 - 19.4), Benevento 8% (IC 95% 2.7 - 13.3), Caserta 18.75% (IC 95% 11.55 - 25.95), Salerno 17% (IC 95% 9.6 - 24.4). Tali dati confermano la cospicua circolazione del patogeno in regione Campania come si è osservato anche in altre regioni d'Italia, per la cui rilevazione si sono utilizzati approcci simili, nelle diverse popolazioni di ruminanti, anche se con prevalenze differenti.

In particolare, studi precedenti hanno evidenziato prevalenze in ELISA del 15.9% in Piemonte (Rizzo et al., 2016) e del 9% in Sardegna (Masala et al., 2004), nei piccoli ruminanti e, più recentemente, del 5.28% in Sicilia (Galluzzo et al., 2019) nella specie bovina.

Anche la prevalenza ottenuta a livello aziendale è in linea con quanto appurato in questi studi: 81% (IC 95% 64.2- 97.8).

Le province di Caserta e di Salerno, che hanno evidenziato la prevalenza maggiore, coincidono con le province dotate del più consistente patrimonio zootecnico e di una considerevole densità di ruminanti per km quadrato (fonte Banca Dati Nazionale dell'Anagrafe Zootecnica). Infatti, la numerosità delle mandrie e l'intensività degli allevamenti comporta l'aumento dei soggetti recettivi, nonché aumenta la possibilità di contagio tra le aziende, specie se particolarmente vicine (Paul et al., 2014). Tale aspetto trova ulteriore riscontro in bibliografia in uno studio siciliano che sottolinea come alla provincia di Ragusa e parte della provincia di Agrigento, storicamente dedite all'allevamento di ruminanti, sono attribuiti i tassi di prevalenza maggiori rispetto alle altre province dell'isola (Galluzzo et al., 2019). Nel caso della provincia di Caserta si è riscontrata una

prevalenza significativamente più alta rispetto quella ottenuta nella provincia di Benevento (OR 2.5 IC% 95 1.04-5.96).

Caserta risulta anche la provincia con il maggior numero di ruminanti e la maggior densità zootecnica della Campania (fonte Banca Dati Nazionale dell'Anagrafe Zootecnica).

Grazie alla raccolta di dati e informazioni circa le aziende oggetto di campionamento, sono state evidenziate eventuali correlazioni con fattori di rischio tramite analisi statistica.

I numerosi fattori di rischio in grado di influire sulla diffusione e sul mantenimento dell'infezione negli allevamenti bovini sono divisibili in due categorie: ambientali e gestionali (EFSA; 2010). In questo studio non sono stati contemplati i fattori ambientali (quali vento e siccità) ma ci si è dedicati ai fattori manageriali ed anamnestici (relativi alla sfera riproduttiva).

Sono state riscontrate prevalenze maggiori, anche se non statisticamente significative, in animali appartenenti ad aziende con più di 50 capi in lattazione e dotate di un sistema di allevamento di tipo intensivo, ovvero prive di possibilità di pascolo per l'intero anno (in questo caso la correlazione è risultata statisticamente significativa).

Ciò è confermato da studi antecedenti, che suggeriscono come la tipologia di allevamento e le sue dimensioni possono incidere sulla prevalenza di queste e di altre malattie (Rizzo et al 2016; Paul et al 2014). In quanto aziende di elevate dimensioni, infatti, sono maggiormente esposte, sia per numero di contatti fra gli animali, sia per la presenza di un numero più alto di soggetti recettivi all'infezione (van Engelen et al., 2014).

In uno studio effettuato in Danimarca le aziende con più di 150 animali avevano una probabilità di risultare infette 17,9 volte più alta rispetto a quelle con meno di 80 capi (Agger & Paul; 2014).

Per quanto riguarda la modalità di stabulazione, si sono ottenute prevalenze significativamente inferiori (OR 2.95 IC 95% 1.43-6.05) negli allevamenti di tipo semiestensivo che offrivano possibilità di pascolo agli animali. Tale dato è concordante con un lavoro effettuato in provincia di Avellino in cui sono descritte sieroprevalenze, ottenute in IFA, decisamente superiori per gli allevamenti ad orientamento intensivo rispetto gli allevamenti con possibilità di pascolo o completamente estensivi (Capuano et al., 2001).

Anche se il pascolo rappresenta un fattore di rischio per l'eventuale contaminazione da parte di altri allevamenti, animali selvatici e artropodi vettori, risulta altresì corretta l'ipotesi che negli allevamenti intensivi vi sia una maggior possibilità di contagio diretto, specie per via respiratoria, e che la disseminazione dell'agente resti circoscritta.

A tal proposito, studi condotti da Paul *et al* hanno dimostrato come la stabulazione libera è risultata significativamente associata alla presenza d'infezione rispetto alla stabulazione fissa (Paul et al., 2014).

Sempre in relazione all'analisi dei fattori manageriali, i nostri dati suggeriscono che la presenza di altri ruminanti all'interno dell'azienda ($p < 0.0001$; OR 3.42 IC 95% 1.94- 6.03) e l'introduzione costante di nuovi capi rappresentano dei fattori di rischio statisticamente significativi ($p = 0.0057$; OR 3.6 IC 95% 1.5-8.3). Ciò trova conferma in numerosi studi in cui si appura che animali provenienti da aziende miste ed aperte all'introduzione di nuovi capi hanno maggiori probabilità di contrarre l'infezione (Paul et al., 2014; Agger e Paul., 2014; Schimmer et al., 2014; Rizzo et al., 2016).

L'analisi statistica ha riscontrato significatività anche per quanto concerne l'utilizzo della fecondazione artificiale rispetto alla monta naturale ($p = 0.0038$; OR 3.98 IC% 95 1.54-10.24), nonostante essa dovrebbe assicurare una inferiore promiscuità tra gli animali e di conseguenza sieropositività inferiori (Schimmer et al., 2011).

Probabilmente, tale risultato è influenzato dal fatto che le aziende oggetto di tale studio che ricorrono alla fecondazione naturale adottano una tipologia di allevamento tradizionale risultando di tipo estensivo, chiuse e di piccole dimensioni, per cui le ridotte prevalenze riscontrate ne potrebbero essere delle dirette conseguenze.

Tra i fattori anamnestici consultati, l'anamnesi di altre malattie infettive negli ultimi anni (principalmente IBR) e l'osservazione di frequenti disordini riproduttivi sono correlati a maggior rischio di infezione (rispettivamente $p < 0.0001$ e p value 0.0497) a dimostrazione della condivisione dei principali fattori di rischio e degli effetti sugli indici riproduttivi operati dai diversi patogeni.

Gli animali allevati in aziende con anamnesi di infezioni abortigene presentano una probabilità di essere sieropositivi fino a 3.5 volte maggiore (IC 95% 2.01-6.24).

Il lavoro condotto rappresenta una delle più estese ricerche sierologiche attuate per *Coxiella* sul territorio campano, con cui è stata delineata per la prima volta una prevalenza regionale.

Anche in questo caso sono però necessari approfondimenti atti a completare il quadro epidemiologico e a rinforzare le informazioni in possesso.

In tal senso potrebbe risultare utile ottenere evidenze molecolari del patogeno nelle diverse popolazioni intraprendendo indagini in altre specie animali come, ad esempio, piccoli ruminanti ed animali selvatici. L'elevata

entità del patrimonio bufalino campano e l'avvenuta identificazione del DNA di *Coxiella* nel 17.5% dei feti abortiti (Perugini et al., 2009), rende la specie bufalina un ottimo target per futuri studi.

L'ampia diffusione dell'infezione da *Coxiella* indica la necessità di condurre studi e ricerche che possano chiarirne l'impatto, i fattori di rischio correlati, il ruolo che i ruminanti svolgono come serbatoio di infezione per l'uomo e l'effettivo rischio sanitario connesso. A tale scopo, solo dettagliati programmi di sorveglianza veterinaria e la messa a punto di sistemi diagnostici di laboratorio affidabili consentono l'acquisizione di consolidati dati epidemiologici.

- Agger JF, Paul S. Increasing prevalence of *Coxiella burnetii* seropositive Danish dairy cattle herds. *Acta Vet Scand.* 2014 Jul 15;56(1):46. doi: 10.1186/s13028-014-0046-2. PMID: 25056416; PMCID: PMC4115160.
- Beare PA, Samuel JE, Howe D, Virtaneva K, Porcella SF, Heinzen RA. Genetic diversity of the Q fever agent, *Coxiella burnetii*, assessed by microarray-based whole-genome comparisons. *J Bacteriol.* 2006 Apr;188(7):2309-24. doi: 10.1128/JB.188.7.2309-2324.2006. PMID: 16547017; PMCID: PMC1428397.
- Capuano F, Landolfi MC, Monetti DM. Influence of three types of farm management on the seroprevalence of Q fever as assessed by an indirect immunofluorescence assay. *Vet Rec.* 2001 Dec 1;149(22):669-71. doi: 10.1136/vr.149.22.669. PMID: 11765323.
- Chen HW, Zhang Z, Glennon E, Ching WM. Detection of Q Fever Specific Antibodies Using Recombinant Antigen in ELISA with Peroxidase Based Signal Amplification. *Int J Bacteriol.* 2014;2014:707463. doi: 10.1155/2014/707463. Epub 2014 Mar 12. PMID: 26904739; PMCID: PMC4745451.
- Deringer JR, Chen C, Samuel JE, Brown WC. Immunoreactive *Coxiella burnetii* Nine Mile proteins separated by 2D electrophoresis and identified by tandem mass spectrometry. *Microbiology (Reading).* 2011 Feb;157(Pt 2):526-542. doi: 10.1099/mic.0.043513-0. Epub 2010 Oct 28. PMID: 21030434; PMCID: PMC3090129.
- Fernandes I, Rousset E, Dufour P, Sidi-Boumedine K, Cupo A, Thiéry R, Duquesne V. Evaluation of the recombinant Heat shock protein B (HspB) of *Coxiella burnetii* as a potential antigen for immunodiagnostic of Q fever in goats. *Vet Microbiol.* 2009 Mar 2;134(3-4):300-4. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.08.024. Epub 2008 Aug 29. PMID: 18835111.
- Kittelberger R, Mars J, Wibberley G, Sting R, Henning K, Horner GW, Garnett KM, Hannah MJ, Jenner JA, Piggott CJ, O'Keefe JS. Comparison of the Q-fever complement fixation test and two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies against *Coxiella burnetii* (Q-fever) in ruminants: recommendations for use of serological tests on imported animals in New Zealand. *N Z Vet J.* 2009 Oct;57(5):262-8. doi: 10.1080/00480169.2009.58619. PMID: 19802039.
- Kowalczywska M, Sekeyová Z, Raoult D. Proteomics paves the way for Q fever diagnostics. *Genome Med.* 2011 Jul 30;3(7):50. doi: 10.1186/gm266. PMID: 21801463; PMCID: PMC3221545.

- Paul S, Toft N, Agerholm JS, Christoffersen AB, Agger JF. Bayesian estimation of sensitivity and specificity of *Coxiella burnetii* antibody ELISA tests in bovine blood and milk. *Prev Vet Med.* 2013 May 1;109(3-4):258-63. doi: 10.1016/j.prevetmed.2012.10.007. Epub 2012 Nov 22. PMID: 23182027.
- Paul S, Agger JF, Agerholm JS, Markussen B. Prevalence and risk factors of *Coxiella burnetii* seropositivity in Danish beef and dairy cattle at slaughter adjusted for test uncertainty. *Prev Vet Med.* 2014 Mar 1;113(4):504-11. doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.01.018. Epub 2014 Jan 21. PMID: 24485706.
- Perugini AG, Capuano F, Esposito A, Marianelli C, Martucciello A, Iovane G, Galiero G. Detection of *Coxiella burnetii* in buffaloes aborted fetuses by IS111 DNA amplification: a preliminary report. *Res Vet Sci.* 2009 Oct;87(2):189-91. doi: 10.1016/j.rvsc.2009.01.005. Epub 2009 Feb 15. PMID: 19232419.
- Rizzo F, Vitale N, Ballardini M, Borromeo V, Luzzago C, Chiavacci L, Mandola ML. Q fever seroprevalence and risk factors in sheep and goats in northwest Italy. *Prev Vet Med.* 2016 Aug 1;130:10-7. doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.05.014. Epub 2016 May 31. PMID: 27435642.
- Schimmer B, de Lange MM, Hautvast JL, Vellema P, van Duynhoven YT. *Coxiella burnetii* seroprevalence and risk factors on commercial sheep farms in The Netherlands. *Vet Rec.* 2014 Jul 5;175(1):17. doi: 10.1136/vr.102155. Epub 2014 Apr 29. PMID: 24789854.
- Sekeyová Z, Kowalczywska M, Vincentelli R, Decloquement P, Flores-Ramírez G, Skultéty L, Raoult D. Characterization of antigens for Q fever serodiagnostics. *Acta Virol.* 2010;54(3):173-80. doi: 10.4149/av_2010_03_173. PMID: 20822309.
- Vigil A, Chen C, Jain A, Nakajima-Sasaki R, Jasinskas A, Pablo J, Hendrix LR, Samuel JE, Felgner PL. Profiling the humoral immune response of acute and chronic Q fever by protein microarray. *Mol Cell Proteomics.* 2011 Oct;10(10):M110.006304. doi: 10.1074/mcp.M110.006304. Epub 2011 Aug 4. PMID: 21817167; PMCID: PMC3205856.
- Vranakis I, Mathioudaki E, Kokkini S, Psaroulaki A. Com1 as a Promising Protein for the Differential Diagnosis of the Two Forms of Q Fever. *Pathogens.* 2019 Nov 18;8(4):242. doi: 10.3390/pathogens8040242. PMID: 31752191; PMCID: PMC6963606.

Wood C, Muleme M, Tan T, Bosward K, Gibson J, Alawneh J, McGowan M, Barnes TS, Stenos J, Perkins N, Firestone SM, Tozer S. Validation of an indirect immunofluorescence assay (IFA) for the detection of IgG antibodies against *Coxiella burnetii* in bovine serum. *Prev Vet Med*. 2019 Aug 1;169:104698. doi: 10.1016/j.prevetmed.2019.104698. Epub 2019 May 23. PMID: 3131164.

