IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

BruEPIDIA

Brucellosis in wildlife and domestic animals: development of a direct diagnostic method and assessment of genetic diversity of *Brucella melitensis* and *Brucella suis biovar 2* strains in the EU

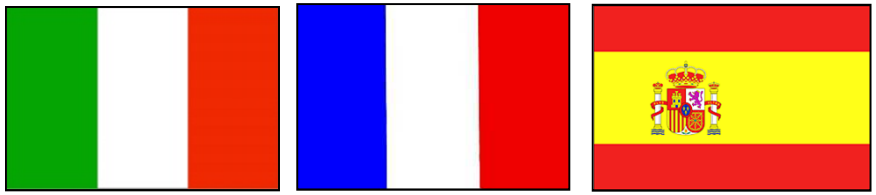
Dr. Giuliano Garofolo - g.garofolo@izs.it

Risultati della ricerca corrente condotta dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale". Anno 2014 ***Centro Internazionale per la Formazione e l'Informazione Veterinaria "Francesco Gramenzi»***

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

BruEPIDA



Paris-Est University, Anses, Animal Health Laboratory, Bacterial Zoonoses Unit, EU/OIE/FAO Brucellosis Reference Laboratory, 94706, Maisons-Alfort, France

Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) de Aragón, 50059 Zaragoza, Spain

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale". Centro di Referenza Nazionale ed OIE per le Brucellosi

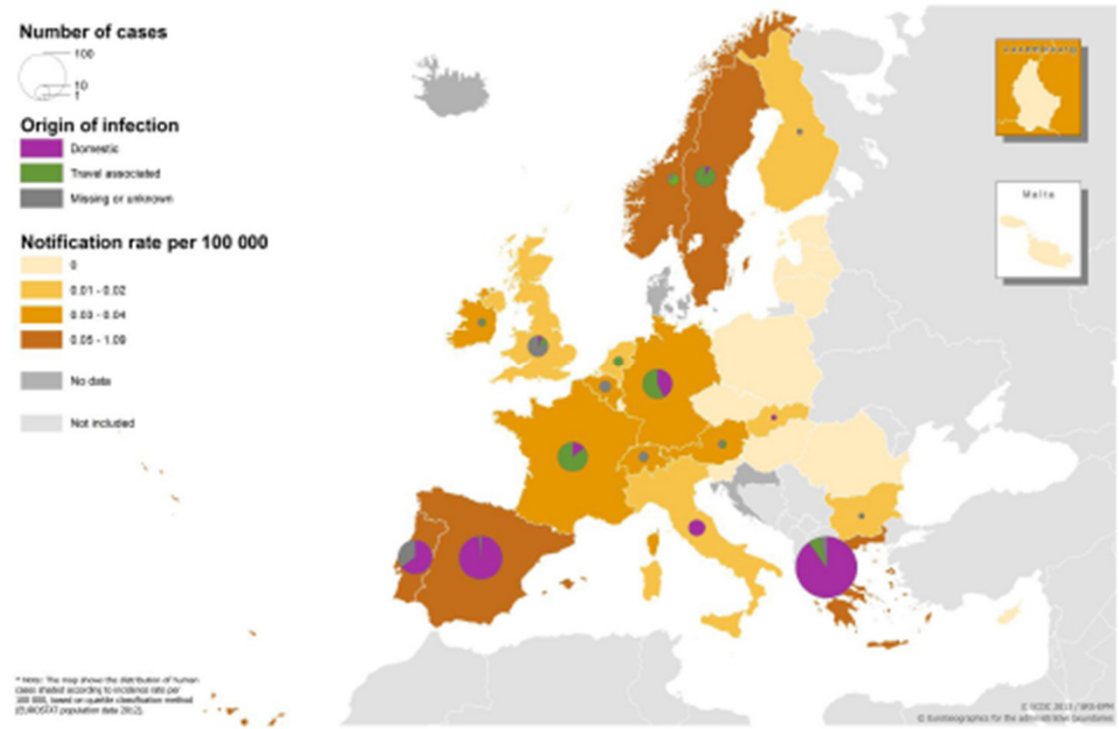
Istituto Superiore di Sanità - Profilassi e controllo delle zoonosi batteriche - Dipartimento sanità pubblica veterinaria e sicurezza alimentare

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

Brucellosi nell'uomo

Figure BR1. Notification rates and origin of infection in human brucellosis in the EU/EFTA, 2012



Note: The map shows the distribution of human cases shaded according to incidence rate per 100,000 based on quartile classification method (EUROSTAT population data 2012).

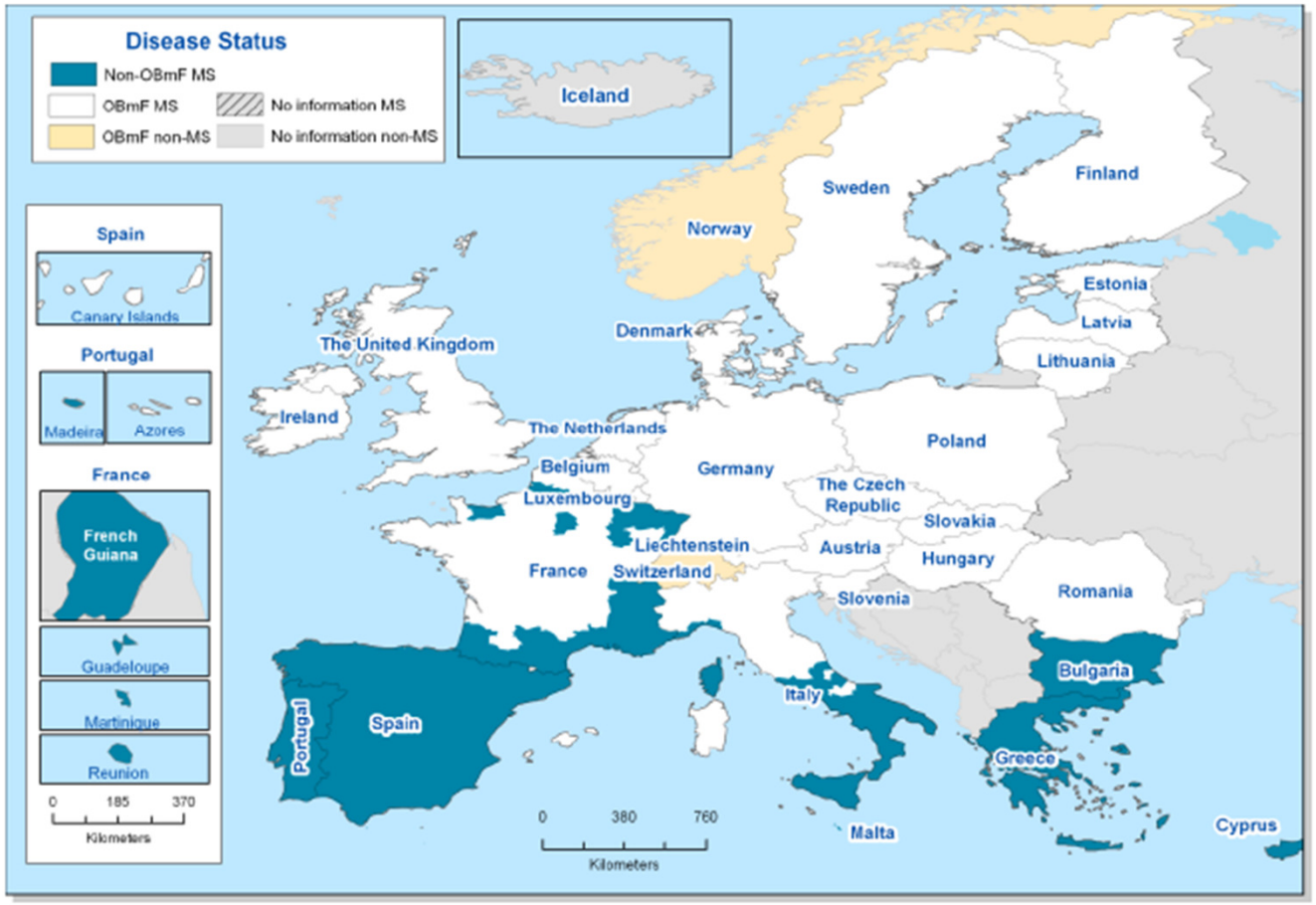
EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. EFSA Journal 2014;12(2):3547, 312 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3547

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

Brucella melitensis in Europa

Figure BR7. Status of countries regarding ovine and caprine brucellosis, 2012



IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

Brucellosi nei suidi

- B. suis comprende 5 biovarianti ma solo le prime 3 infettano i suidi
- In Europa la Brucella suis biovariante 2 è l'agente più comune
- *B. suis* biovar 2 predilige infettare suidi e lepri
- Ma può infettare bovini e raramente l'uomo

B. suis 1,3
B. suis 2
B. suis 4
B. suis 5

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

B. suis biovar 2 in Europa

Presente nella popolazione di Lepri e Cinghiali in tutta Europa

Scandinavia

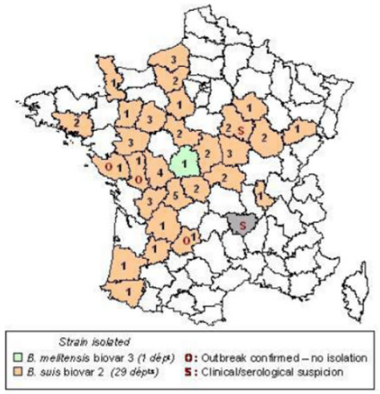
Balcani

The EFSA Journal (2009) 1144, 73-112

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

Francia - Spagna B. suis biovar 2



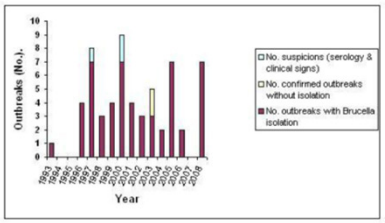
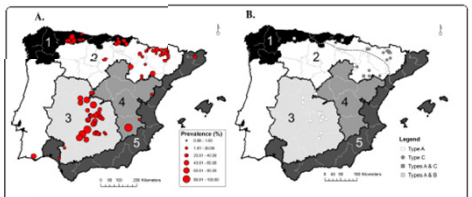


Figure 11. Outbreaks and suspicions of porcine brucellosis in France (1993-2008) (NRL data)

The EFSA Journal (2009) 1144, 73-112



C.

B. suis reference strains	*B. suis* Mpx-PCR[1]	Omp2a[3]		Omp2b[2]		Omp31[3]		
		StyI	NcoI	EcorI	KpnI	AvaII	HaeIII	
1330	*B. suis* biovar 1	P2	P2	P1	P1	P1	P1	
Thomsen	*B. suis* biovar 2	NR[4]	NR	P3	NR	P2	P2	
686	*B. suis* biovar 3	P2	P2	P1	NR	P1	P1	
Nr. of *B. suis* strains isolated		Resulting haplotypes						
57	*B. suis* biovar 2	P2	P2	P3	NR	P2	P2	Type A
1	*B. suis* biovar 2	P2	P2	P1	P1	P2	P2	Type B
46	*B. suis* biovar 2	NR	NR	P1	P1	P2	P2	Type C

[1] multiplex PCR [33] for differentiation of the main *B. suis* biovars

[2] PCR-RFLP patterns of *omp2a* and *omp2b* genes with the corresponding restriction enzymes [34, 35]

[3] PCR-RFLP patterns of *omp31* gene with the corresponding restriction enzymes [34, 35]

[4] No restriction pattern obtained with the corresponding enzyme

Figure 2 Panel A: Apparent prevalence of brucellosis in Eurasian wild boar (*Sus scrofa*) in Bio-regions 1 to 5. Dots are proportional to prevalence. Only data from localities with at least 10 wild boar samples are shown. Panel B: Distribution of the different haplotypes of *Brucella suis* strains isolated from wild boar. Points represent an infected population cluster rather than individual isolates; the dotted line represents the south-western distribution limit of the European brown hare (*Lepus europaeus*). Panel C: Characteristics of the *B. suis* biovar 2 haplotypes isolated when identified by PCR (Mpx-PCR) and further analysis of *omp2a*, *omp2b* and *omp31* genes by PCR-RFLP.

Francia - Prevalenza sierologica nel cinghiale 30%

Spagna - Prevalenza sierologica nel cinghiale 25% to 46%

Muñoz PM, et al.Spatial distribution and risk factors of Brucellosis in Iberian wildungulates., BMC Infect Dis. , 10, 2010, 46

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

ITALIA *B. suis biovar 2*

Quaranta V., Farina R., Poli A., Cerri D. & Palazzo L.1995. Sulla presenza di Brucella suis biovar 2 nella lepre in Italia. Selezione Vet, 36, 953-958

Journal of Wildlife Diseases, 45(4), 2009, pp. 1178–1181
© Wildlife Disease Association 2009

Epidemiologic Survey for *Brucella suis* Biovar 2 in a Wild Boar (*Sus scrofa*) Population in Northwest Italy

Stefania Bergagna,[1] Simona Zoppi,[1] Ezio Ferroglio,[2,5] Mario Gobetto,[3] Alessandro Dondo,[2] Elisabetta Di Giannatale,[4] Maria Silvia Gennero,[1] and Carla Grattarola[1] [1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino, Italy; [2]Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Università degli Studi di Torino, Grugliasco, Italy; [3]Servizio Veterinario Area "C" TO4, Torino, Italy; [4]National Reference Centre for Brucellosis, Teramo, Italy, Studi di Torino, Grugliasco, Italy; [5]Corresponding author (email: ezio.ferroglio@unito.it)

Presenza *B. suis biovar 2*

Assenza *B. suis biovar 2*

Journal of Wildlife Diseases, 39(3), 2003, pp. 718–722
© Wildlife Disease Association 2003

Prevalence of *Leptospira* and *Brucella* Antibodies in Wild Boars (*Sus scrofa*) in Tuscany, Italy

Valentina V. Ebani,[1] Domenico Cerri,[1] Alessandro Poli,[1,2] and Ernesto Andreani[1] [1] Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Pisa, Viale delle Piagge, 2 I-56124 Pisa, Italy; [2] Corresponding author (email: apoli@vet.unipi.it)

Veterinaria Italiana, 2012, 48 (4), 397-404

Isolation of *Brucella suis* biovar 2 from a wild boar in the Abruzzo Region of Italy

Fabrizio De Massis, Andrea Di Provvido, Daria Di Sabatino, Daniela Di Francesco, Katiuscia Zilli, Massimo Ancora & Manuela Tittarelli

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazional

Problemi RIemergenti in Europa

Unexpected *Brucella suis* Biovar 2 Infection in a Dairy Cow, Belgium

David Fretin, Marcella Mori, Guy Czaplicki, Christian Quinet, Benoît Maquet, Jacques Godfroid, and Claude Saegerman

Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 19, No. 12, December 2013

2012-2013 Brucellosi in Belgio – 7 casi (6 *B. abortus*- 1 *B. suis biovar 2*)

2012 Brucellosi in Francia – 1 casi (1 *B. melitensis*)

RAPID COMMUNICATIONS

Re-emergence of brucellosis in cattle in France and risk for human health

A Mailles (a.mailles@invs.sante.fr)[1], S Rautureau[2], J M Le Horgne[3], B Poignet-Leroux[2], C d'Arnoux[4], G Dennetière[3], M Faure[4], J P Lavigne[7], J P Bru[8], B Garin-Bastuji[9]

2012 Brucellosi in Svezia – 13 casi (*B. melitensis*)

Garofolo G., Fasanella A., Platone I., Boskani T. Wahab T. 2013. Brucellosis in Europe is still a threat? Reports from Italy and Sweden. Medical Biodefense Conference 2013 Bundeswehr Medical Academy Munich (Germany) 22-25 ottobre 2013

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

BruEPIDIA Obiettivi generali

Il progetto studierà
B. melitensis e *B. suis biovar 2*

- Sviluppo di un nuova strategia diagnostica diretta al il rilevamento e l'identificazione di Brucella
- Sviluppo di un sistema di genotipizzazione in grado di tracciare e mappare la diffusione nel della Brucellosi in Europa ,e in particolare modo nell'area mediterranea .

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

BruEPIDA 2013 (ITA-FRA-SPA)

Task-1
Sviluppo di una strategia di diagnosi diretta

Sviluppo Brodo selettivo

Concentrazione tramite dynabeads

DNA- PCR

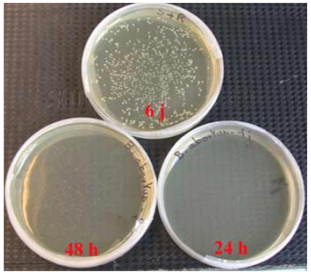
Coltura diretta

Valutazione del sistema

Validazione

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale



Diagnosi diretta WP1 e WP2

- I terreni selettivi di elezione per l'isolamento di Brucella sono il Farrel e il Thayer-Martin modificato.

1. Farrel è spesso inibitore della flora microbica contaminante ma inibisce la crescita di *B. ovis*, alcune *B. melitensis* e *B. abortus*
2. Thayer-Martin modificato permette la crescita di gran parte delle specie di Brucella ma al contempo non inibisce la flora contaminante

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

Diagnosi diretta WP1 e WP2

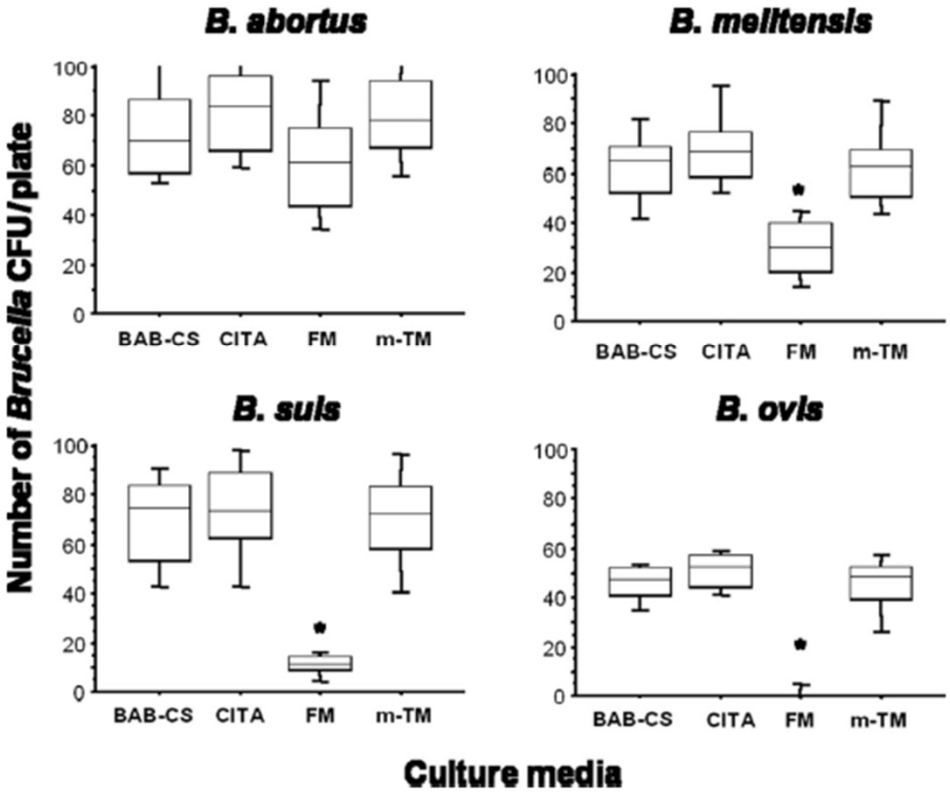


FIG. 1. Growth (number of CFU/plate) of representative *Brucella* species (see Table 1 for descriptions) on BAB-CS and three selective culture media: mTM (15), FM (15), and CITA (the new selective medium developed in this work). Statistical comparisons of means (numbers of CFU/plate) obtained for a given *Brucella* sp. for the different culture media were performed by Fisher's PLSD test. *, $P < 0.0001$ between FM and any other culture medium.

Marín CM, Alabart JL, Blasco JM Effect of Antibiotics Contained in Two Brucella Selective Media On Growth of Brucella Abortus, BMelitensis, and B-Ovis. , J Clin Microbiol , 34, 1996, 426-428

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

Studio sviluppo brodo selettivo

- Piccole quantità di brucella possono essere amplificate in brodocoltura limitando la crescita dei contaminanti
- Uso degli antibiotici secondo gli studi precedentemente eseguiti (Ba, Bm e Bs biovar 2)
- La fermentazione degli zuccheri da parte dei contaminanti

Discesa ph inibizione della crescita di Brucella

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

Diagnosi diretta WP1 e WP2

- Testare fonti di carbonio alternativi agli esosi

1. Carbone
2. Glicerolo
3. Glutammato

Effettuare prove di sensibilità tra i 3 laboratori

Brodo selettivo

PCR diretta

Dynabeads sensibilizzate con LPS

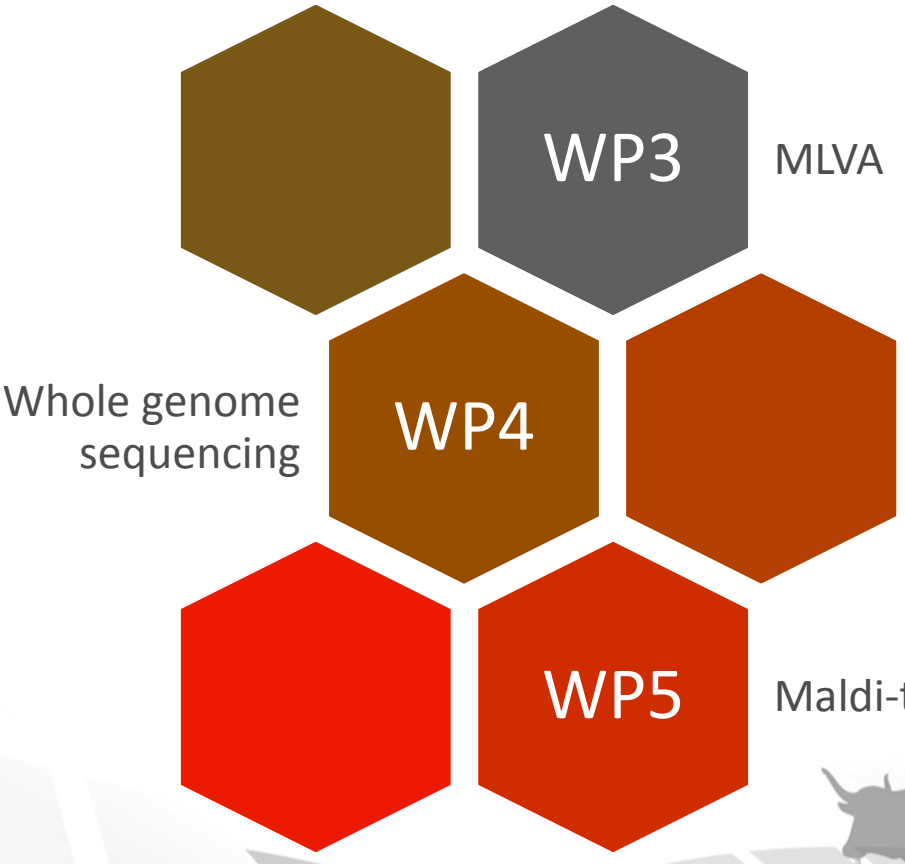
WP4

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

BruEPIDA 2013 (ITA-FRA-SPA)

Task-2 – Caratterizzazione molecolare B. melitensis e B. suis



IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

WP3-MLVA-16

Scelta del pannello di loci

Scelta dei materiali di riferimento

Scelta degli algoritmi di analisi

Gentipizzazione Bm e Bs2

Journal of Microbiological Methods 92 (2013) 103–107

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth

Note

MLVA-16 loci panel on *Brucella spp.* using multiplex PCR and multicolor capillary electrophoresis

Giuliano Garofolo *, Massimo Ancora, Elisabetta Di Giannatale

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" – National and OIE Reference Laboratory for Brucellosis, Italy

ARTICLE INFO

Article history:
Received 24 August 2012
Received in revised form 8 November 2012
Accepted 8 November 2012
Available online 19 November 2012

Keywords:
MLVA
Capillary electrophoresis
Brucella spp.
Genotyping

ABSTRACT

The Multi Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis 16 loci panel (MLVA-16), involving singleplex PCRs and agarose gel electrophoresis, is the standard genotyping method for *Brucella spp.*, used also for the *Brucella* international online database. We describe an alternative, reliable, high-throughput MLVA-16 protocol using multiplex PCRs and multicolor capillary electrophoresis.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

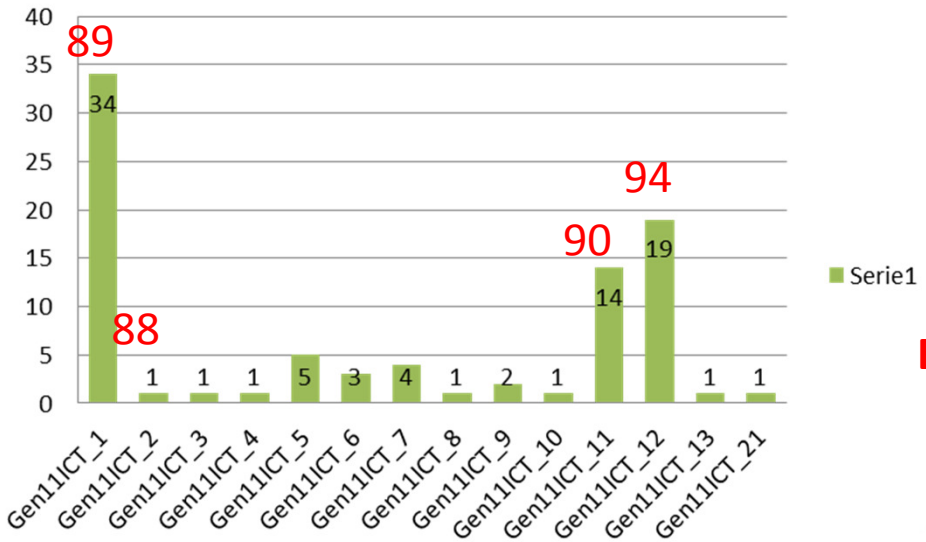
Il protocollo MLVA-16 impiega normalmente singleplex PCR e AE. L'uso di elettroforesi capillare (CE) in MLVA-16 non era mai stato provato. Nello studio, un sistema di PCR multiplex con CE multicolor per il pannello MLVA-16 è stato progettato, testato e dimostrato di migliorare l'affidabilità.

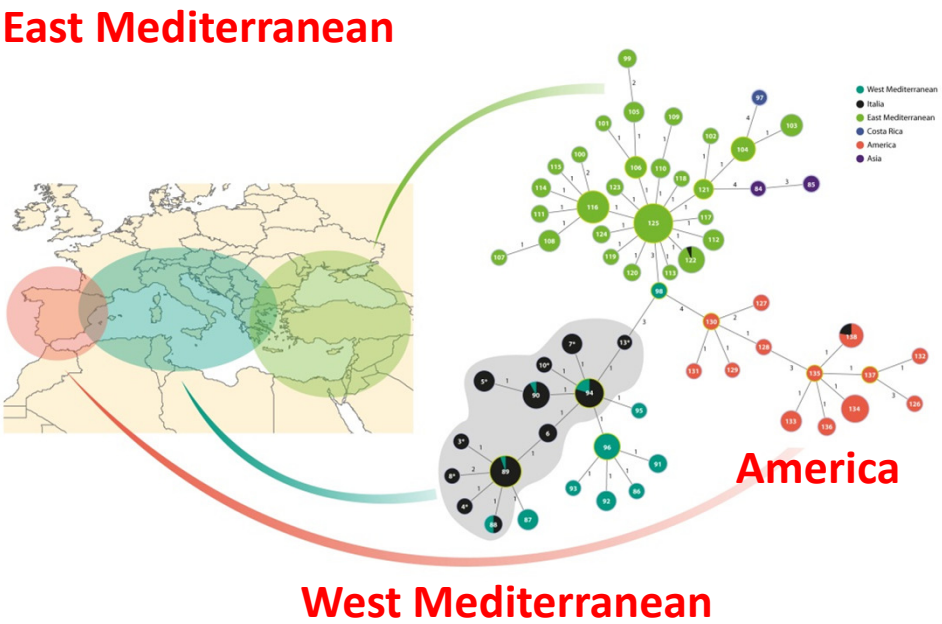
IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

MLVA global epidemiology
B. melitensis

200 strains from 2011,2012, 2013





12 MLVA11 genotypes 96,2 % strains
Belong to West Mediterranean

1 MLVA11 genotype East Mediterran

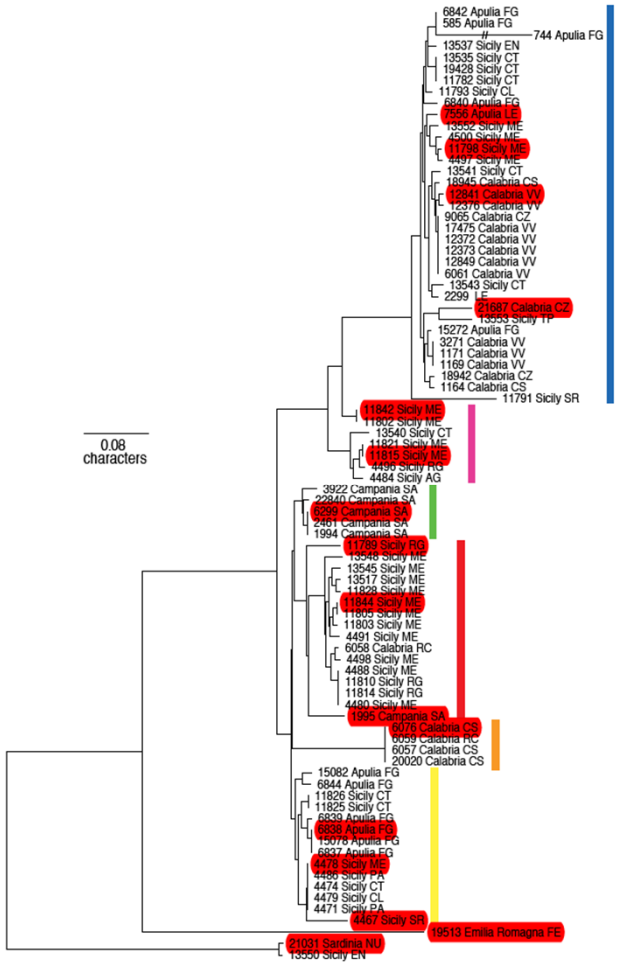
1 MLVA11 genotype America

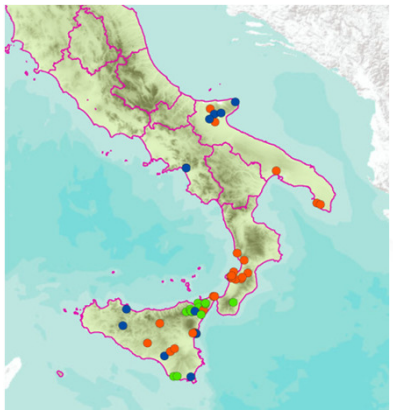
IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

Analisi clusters MLVA16 B. melitensis

Results

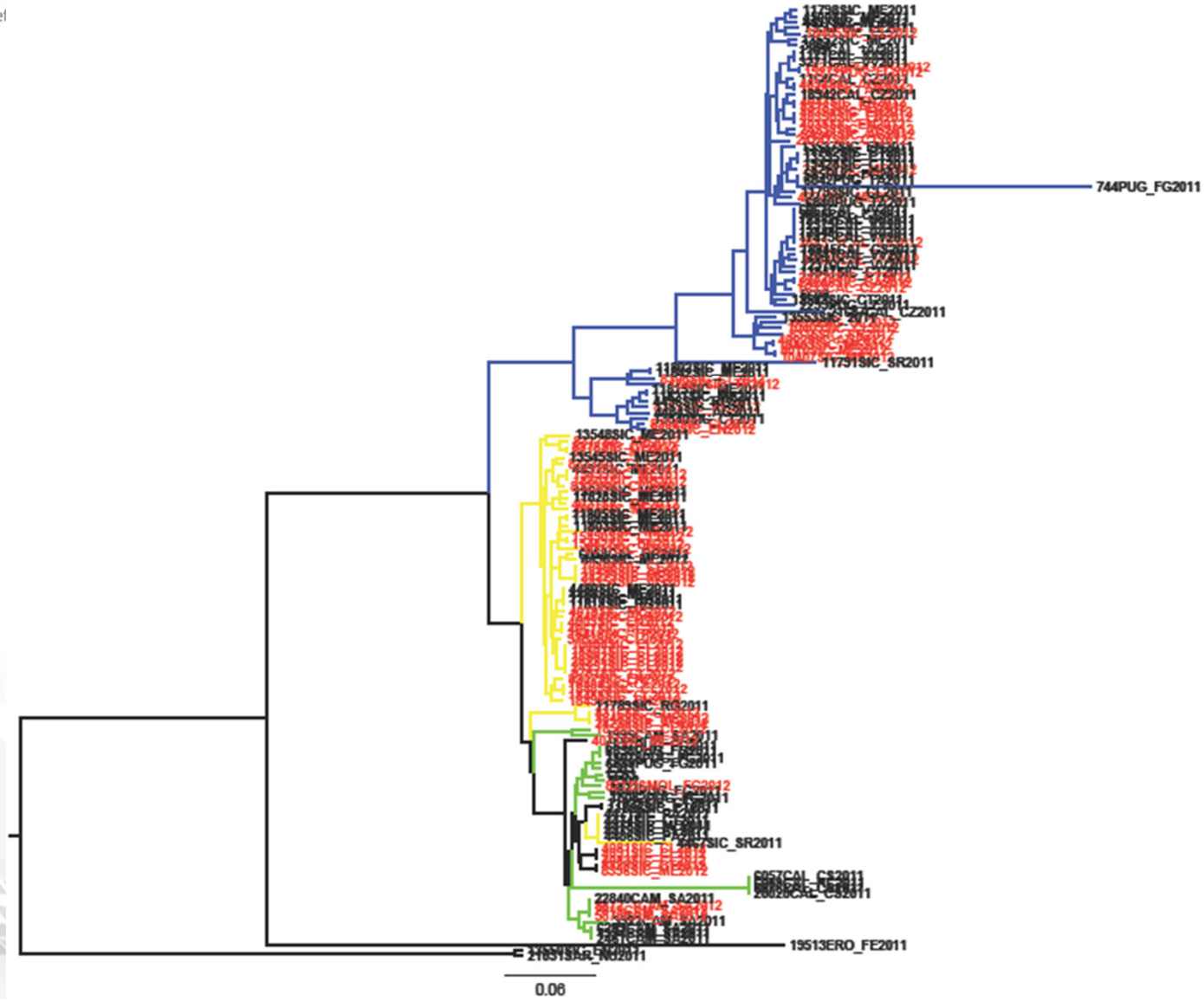




IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Brucellosi
Centro di Ref

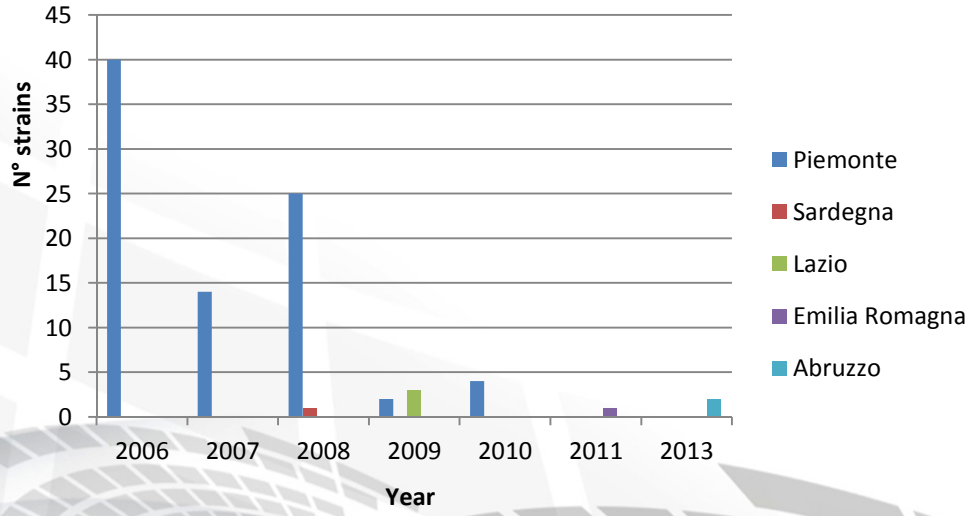
MLVA16 B. melitensis



B. suis biovar 2 Italy

Species	Year	Host	isolates	Prov.	Region	
Brucella suis	2006	Wild boar	40	To	Piemonte	42,95%
Brucella suis	2007	Wild boar	3	Cn	Piemonte	3,29%
			11	To	Piemonte	12,08%
Brucella suis	2008	Swine	1	Ca	Sardegna	1,09%
		Wild boar	25	To	Piemonte	26,40%
Brucella suis	2009	Swine	3	Roma	Lazio	3,29%
		Wild boar	1	To	Piemonte	1,09%
		Swine	1	Cn	Piemonte	1,09%
Brucella suis	2010	Wild boar	4	To	Piemonte	4,39%
Brucella suis	2011	Wild boar	1	Re	Emilia Romagna	1,09%
Brucella suis	2013	Wild boar	2	Aq	Abruzzo	2,00%
Brucella suis	2013	Swine	1	Ca	Sardegna	1,09%

Brucella suis bv2



- **We analyzed 94 strains**

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

MLVA data B. suis biovar 2

Genotyping

- MLVA 16

- Results

94 strains

MLVA16= 57 genotypes

MLVA11= 13 genotypes

Simpson's Diversity					
Locus	Diversity Index	Confidence Interval	K	max(pi)	Repeat Frequency
BRUCE09	0,939	0.934 - 0.943	23	0.101	
BRUCE04	0,929	0.923 - 0.935	23	0.124	
BRUCE30	0,863	0.856 - 0.871	11	0.185	
BRUCE07	0,85	0.834 - 0.865	16	0.266	
BRUCE55	0,764	0.747 - 0.782	6	0.341	
BRUCE19	0,585	0.554 - 0.616	5	0.554	
BRUCE18	0,563	0.523 - 0.604	5	0.614	
BRUCE42	0,509	0.492 - 0.527	5	0.560	
BRUCE08	0,499	0.487 - 0.512	4	0.556	
BRUCE12	0,438	0.408 - 0.468	2	0.676	
BRUCE11	0,051	0.023 - 0.078	4	0.974	
BRUCE43	0	0.000 - 0.016	1	1.000	
BRUCE21	0	0.000 - 0.016	1	1.000	
BRUCE45	0	0.000 - 0.016	1	1.000	
BRUCE16	0	0.000 - 0.016	1	1.000	
BRUCE06	0	0.000 - 0.016	1	1.000	

MLVA 11 loci

	Locus	Diversity I	Confidence Inte	K
	BRUCE09	0,941	0.936 - 0.945	23
	BRUCE04	0,931	0.925 - 0.937	23
	BRUCE30	0,865	0.858 - 0.873	11
	BRUCE07	0,852	0.836 - 0.867	16
	BRUCE55	0,766	0.748 - 0.783	6
	BRUCE19	0,586	0.556 - 0.617	5
	BRUCE18	0,565	0.524 - 0.605	5
	BRUCE42	0,51	0.493 - 0.528	5
	BRUCE08	0,501	0.488 - 0.513	4
	BRUCE12	0,439	0.409 - 0.469	2
	BRUCE11	0,051	0.023 - 0.078	4

High mutation rate

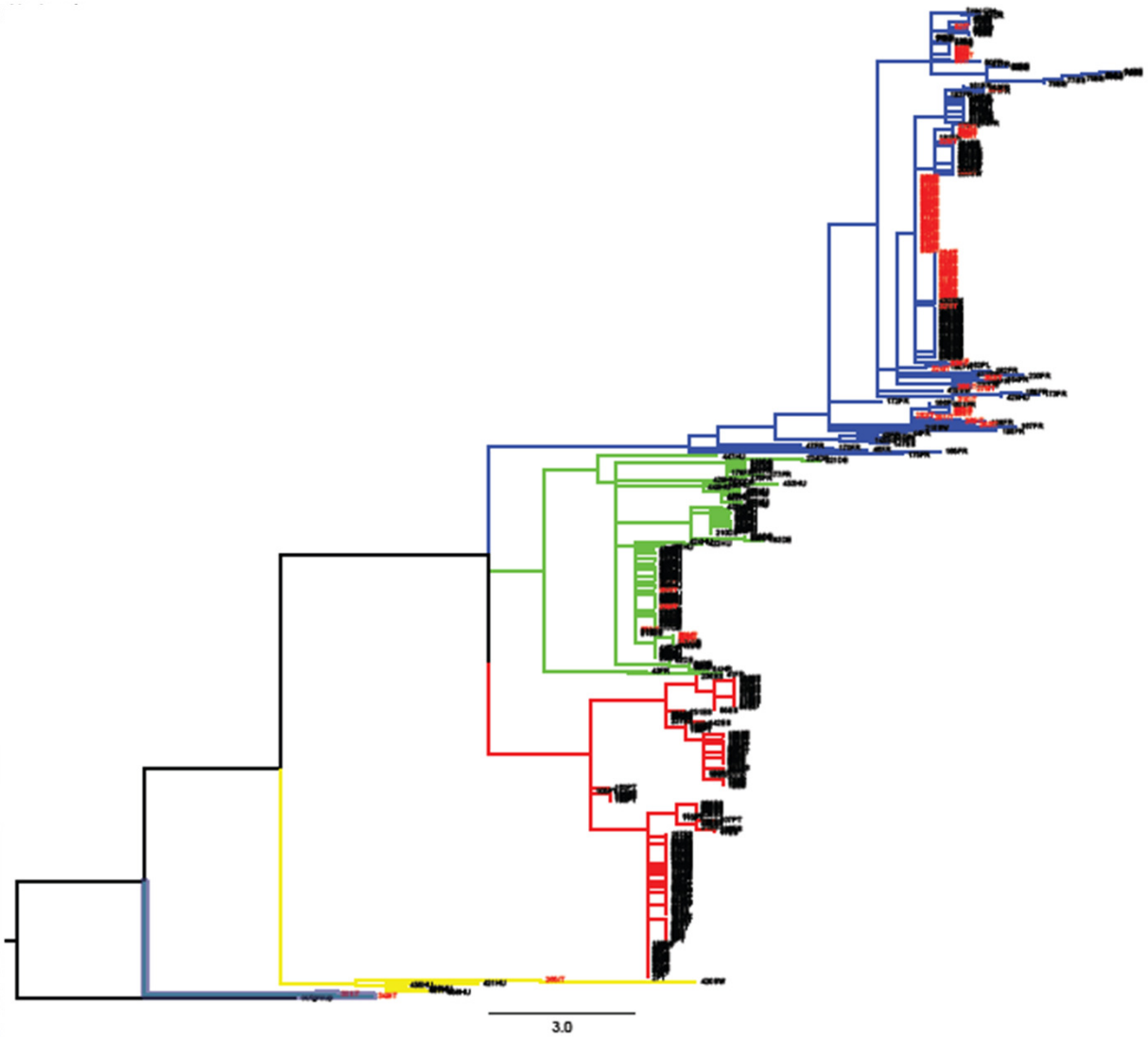
Low medium mutation rate

All distances were calculated with new locus weights
We estimated the locus mutation rate
weight for locus *was* defined as 1/*rk*
Rk represents the mutation rate for locus *k*

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza

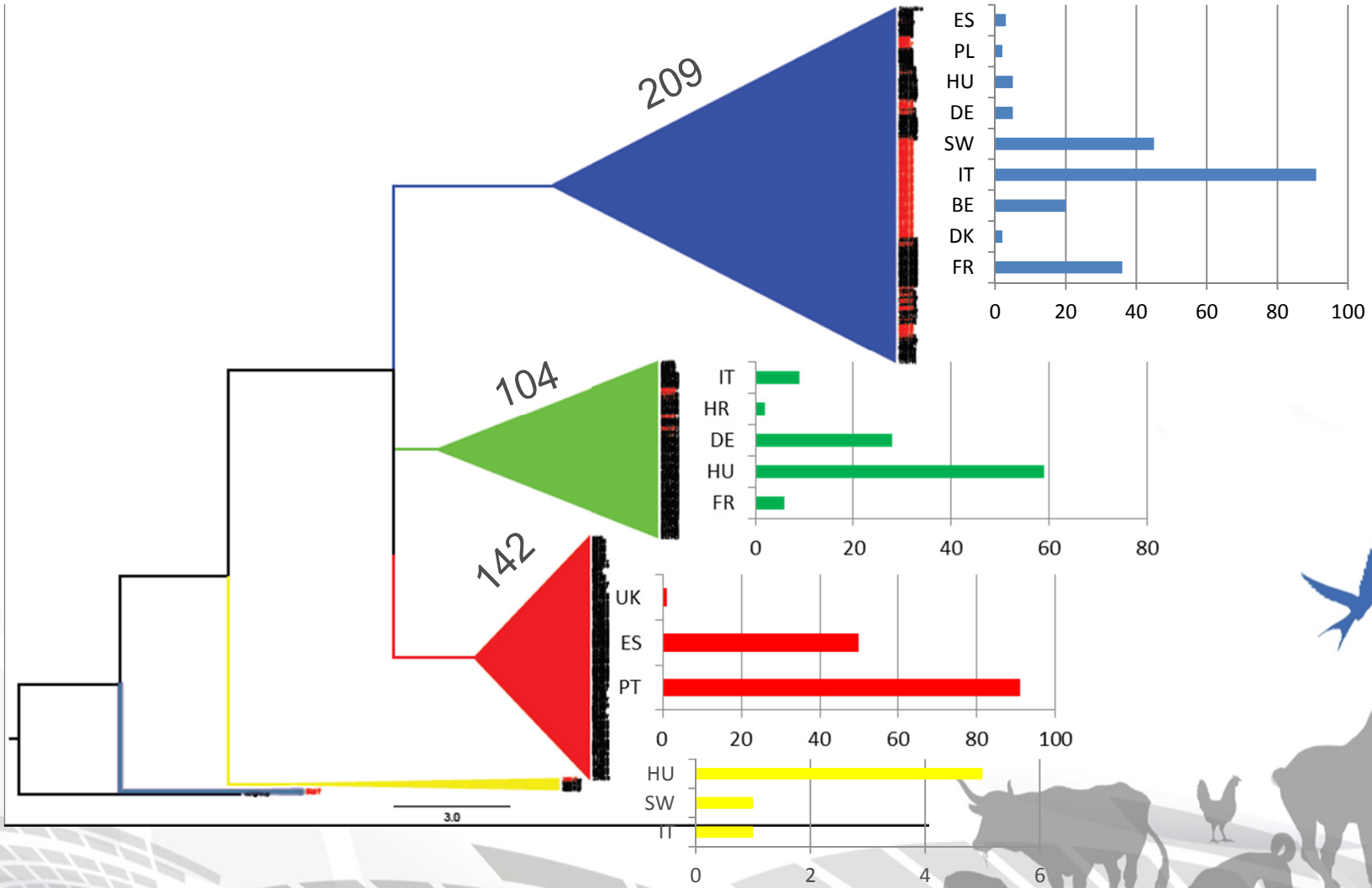
New MLVA weighted clustering



IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

New MLVA weighted clustering



WP4
WGS B. melitensis
WGS B. suis biovar 2
Standardizzazione nuovi metodi di genotipizzazione
Individuazione SNPs
Utilizzo di SNPs in saggi PCR
WP2

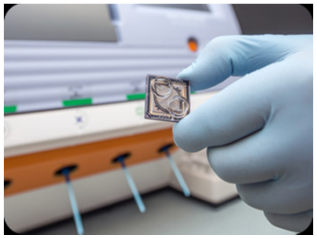
IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

WP4

Ricerca SNPs da Whole Genome Sequencing

- Identificare i polimorfismi dei cluster circolanti in Francia, Spagna e Italia
- Delucidare la storia evolutiva di *B. suis biovar 2*
- Sviluppare saggi di PCR per l'identificazione rapida dei diversi genotipi circolanti



MLST MLVA RFLP

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

B. melitensis Italia

- 14 casi di brucellosi: – 11 pecore, 1 capra, 1 bovino, 1 uomo
- 1 di brucellosi importato dalla Siria: uomo
- 1 caso di brucellosi importato dalla Spagna – gregge infetto

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

Posizione geografica

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

B. melitensis from Italy

RESEARCH ARTICLE

Recovery of a Medieval *Brucella melitensis* Genome Using Shotgun Metagenomics

Gemma L. Kay,[a] Martin J. Sergeant,[a] Valentina Giuffra,[b,c] Pasquale Bandiera,[c] Marco Milanese,[d] Barbara Bramanti,[e] Raffaella Bianucci,[e,f,g] Mark J. Pallen[a]

Division of Microbiology and Infection, Warwick Medical School, University of Warwick, Coventry, United Kingdom[a]; Division of Paleopathology, Department of Translational Research on New Technologies in Medicine and Surgery, University of Pisa, Pisa, Italy[b]; Department of Biomedical Sciences[c] and Department of History,[d] University of Sassari, Sassari, Italy; Department of Biosciences, Centre for Ecological and Evolutionary Synthesis, University of Oslo, Oslo, Norway[e]; Department of Public Health and Pediatric Sciences, Laboratory of Physical Anthropology, University of Turin, Turin, Italy[f]; Anthropologie Bioculturelle, Droit, Ethique et Santé, Aix Marseille Université, Marseille, France[g]

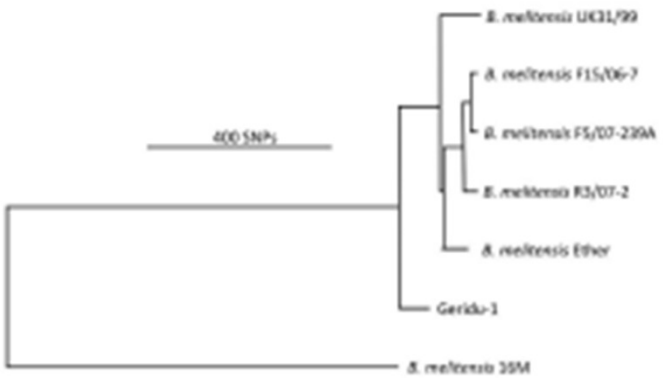


FIG 2 Phylogenetic tree showing the position of the medieval Geridu-1 strain within the Ether clade. Only those SNPs which correlated with sufficient coverage in the Geridu-1 alignment were included in the construction of the tree.

Gli isolati Italiani clusterizzano nel Clade Ether

***Brucella melitensis* bv. 3 str. Ether**
Strain also known as NCTC10509; ATCC 23458; BCCN R3. This is the *Brucella melitensis* biovar 3 reference strain originally isolated by Prof. G. Garini (Univ. di Firenze, Italy) from a goat in Italy in 1961 (Meyer and Morgan 1973).

IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

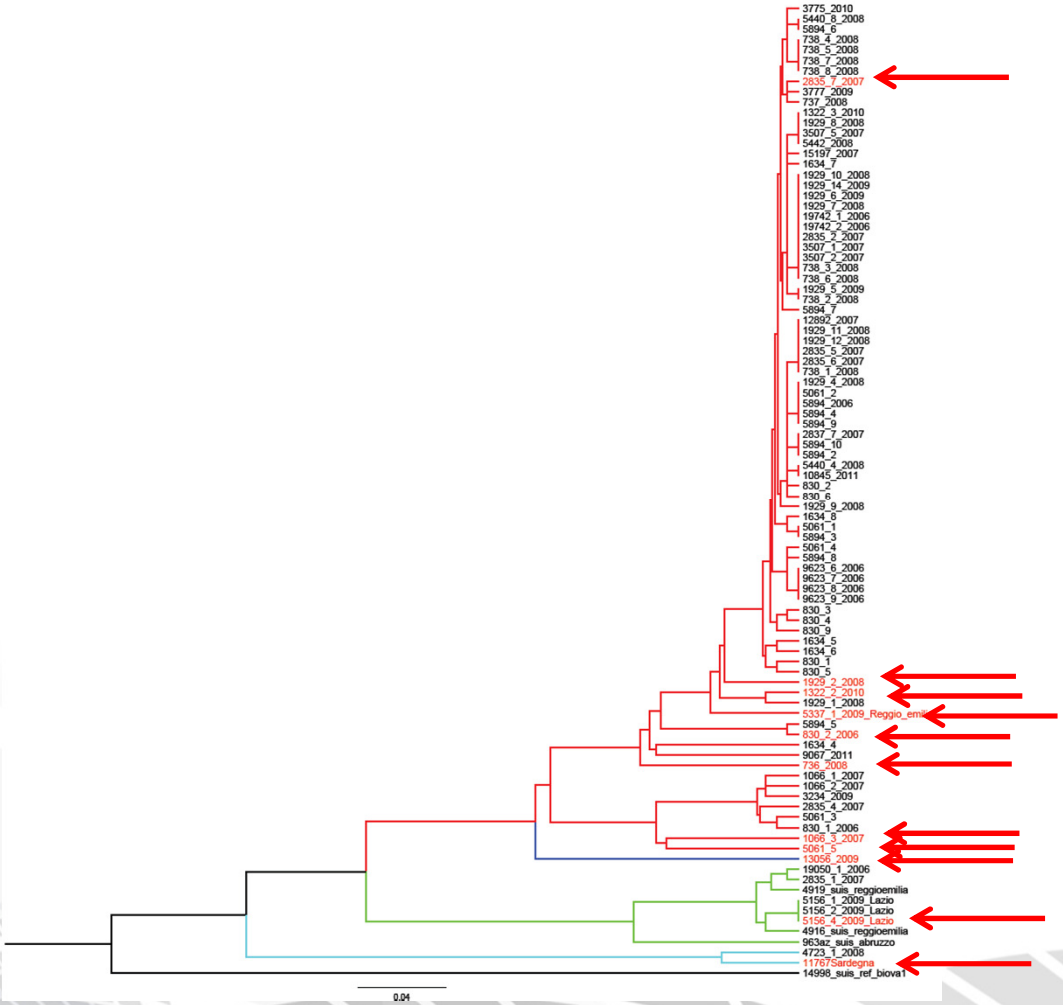
Brucellosi
Centro di Referenza Na

B. melitensis e B. suis biovar 2

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

Selezione NGS basata su MLVA



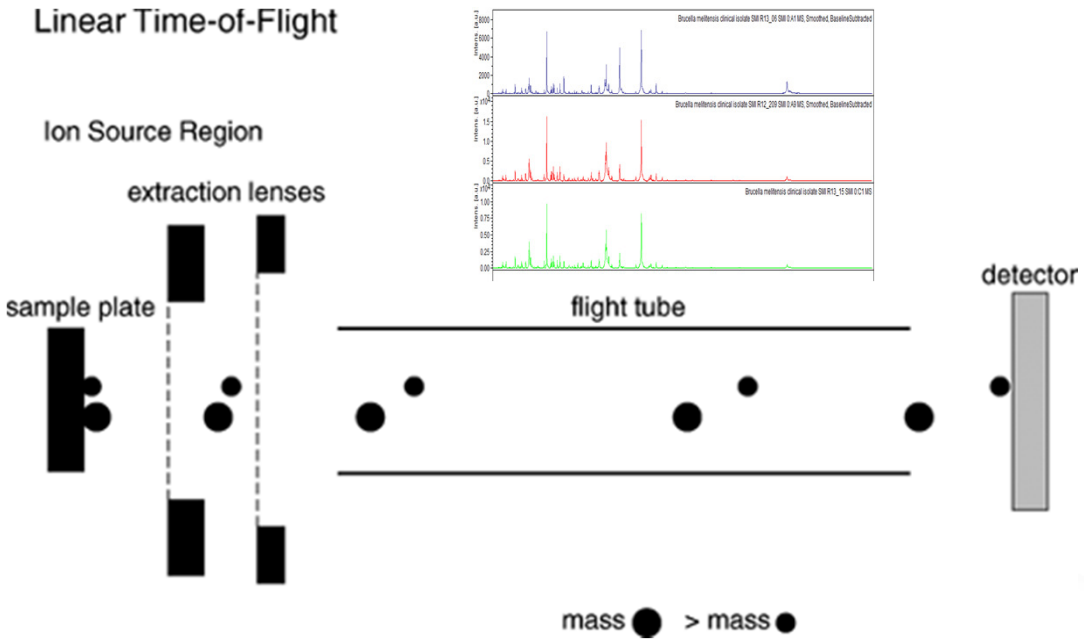
IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

Posizione geografica

Abbiamo selezionato 12 isolati di B. suis bv2

WP5-MALDI-TOF MS



È una spettrometria di massa comunemente indicato con l'acronimo **MALDI** (dall'inglese **Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization**). La tecnica MALDI è indicata per l'analisi di composti di origine biologica quali proteine, zuccheri etc.). In microbiologia MALDI-TOF MS si basa sulla caratterizzazione dei profili proteici del microorganismo e loro successivo confronto un database di riferimento.

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

WP5 MALDI-TOF

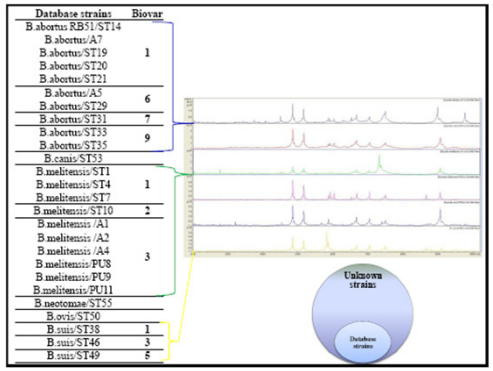
- Verificare il possibile utilizzo

1. Strumento diagnostico - WP2
2. Metodo di genotipizzazione – WP3/4

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

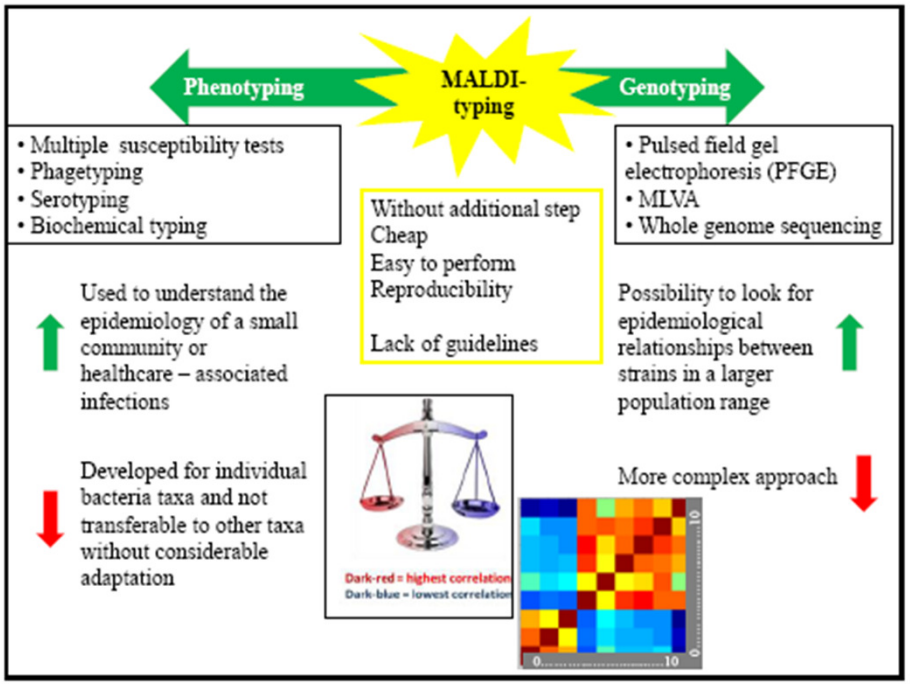
Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

MALDI-TOF – dati preliminari



Identificazione a livello di specie 93% esatto

B. suis 4/5
B. melitensis 53/53
B. abortus 39/39



IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

Grazie per l'attenzione

anses

cita

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Si ringrazia
Elisabetta Di Giannatale
Manuela Tittarelli
Massimo Scacchia
Katiuscia Zilli
Massimo Ancora
Cesare Cammà
Tiziana Persiani
Lorena Sacchini
Alessandra Alessiani
Francesca Marotta
Ilenia Platone
Gabriella Di Serafinio
Virginie Mick
Marine Jay
Chema Blasco
Pilar Muñoz Álvaro
Paolo Pasquali
Rosanna Adone
Michela Sali
Flavio De Maio