

The logo for IZSAM G. Caporale Teramo is a stylized, curved shape composed of a grid of small squares. The squares are colored in a pattern of grey, red, green, and blue, forming a shape reminiscent of a stylized 'C' or a curved path. The text 'IZSAM G. CAPORALE TERAMO' is positioned to the right of the logo.

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

G. Garofolo

Dr. Giuliano Garofolo - [g.garofolo@izs.it](mailto:g.garofolo@izs.it)

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale'

Teramo 26 Febbraio 2015

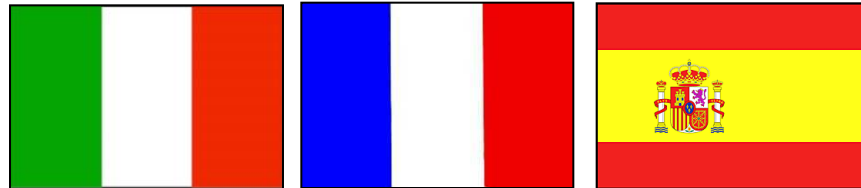
Centro Internazionale per la Formazione e l'Informazione Veterinaria "Francesco Gramenzi»





# BruEPIDA

 **Brucellosi**  
Centro di Referenza Nazionale



**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**

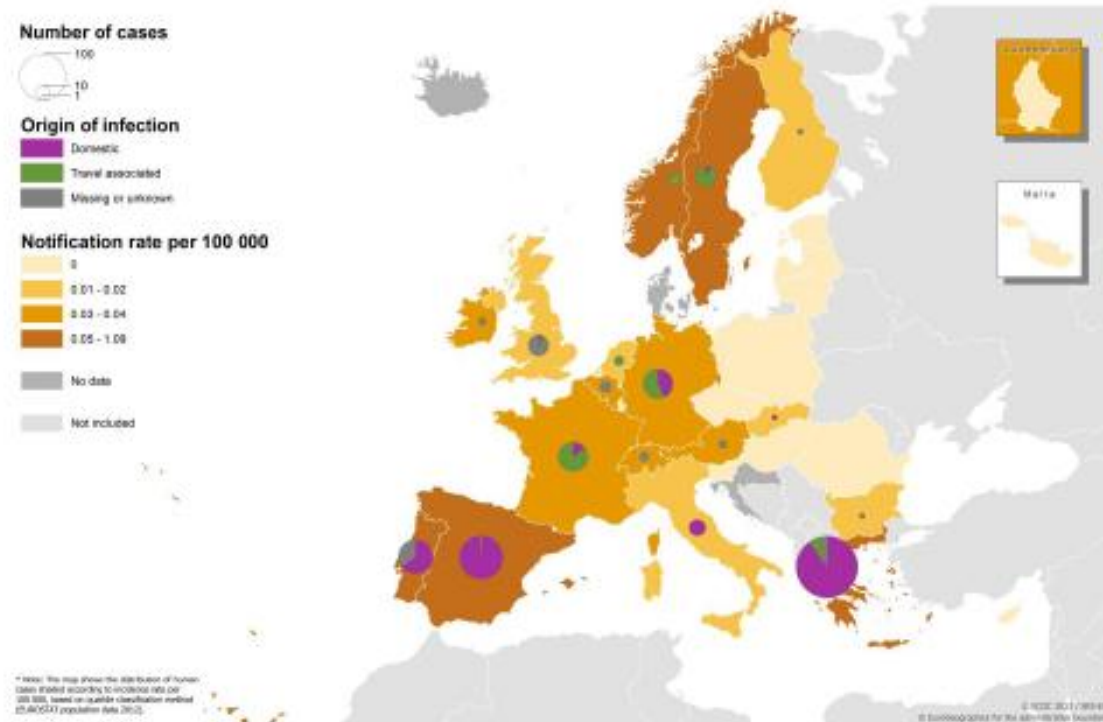
**Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del Molise “G. Caporale”. Centro di Referenza Nazionale ed OIE per le Brucellosi**

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



# Brucellosi nell'uomo

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



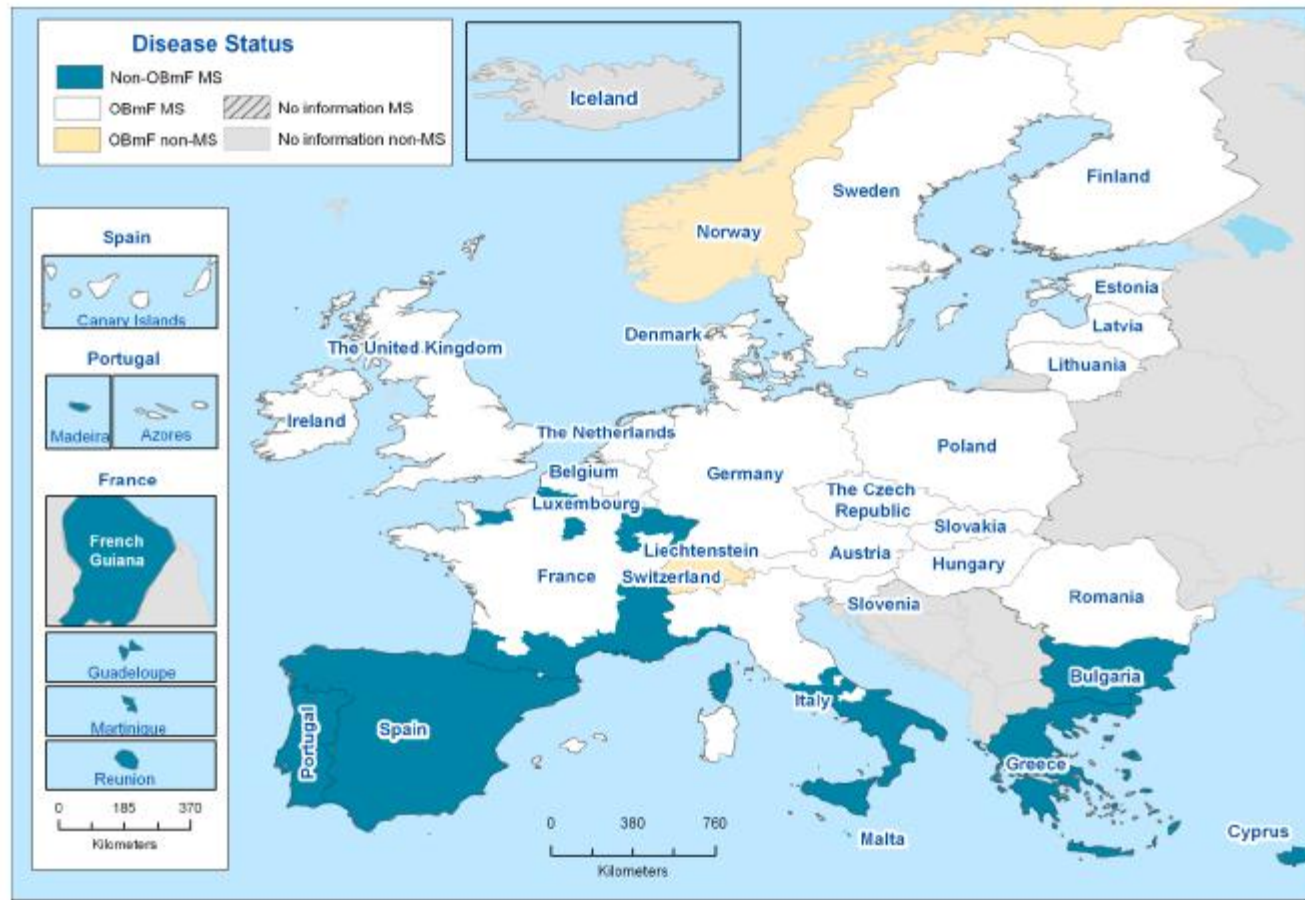
Note: The map shows the distribution of human cases shaded according to incidence rate per 100,000 based on quartile classification method (EUROSTAT population data 2012).



# Brucella melitensis in Europa


**Brucellosi**  
 Centro di Referenza Nazionale

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



# 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



# B. suis biovar 2 in Europa

Presente nella popolazione di Lepri e Cinghiali in tutta Europa

Scandinavia

Balcani



# Francia - Spagna *B. suis* biovar 2

 **Brucellosi**  
Centro di Referenza Nazionale



*Strain isolated*  
 *B. melitensis* biovar 3 (1 dépt)  
 *B. suis* biovar 2 (29 dépts)  
 Outbreak confirmed – no isolation  
 Clinics/serological suspicion

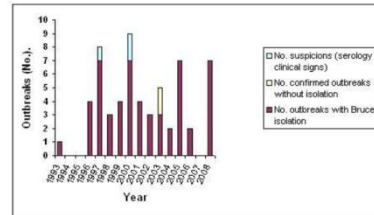
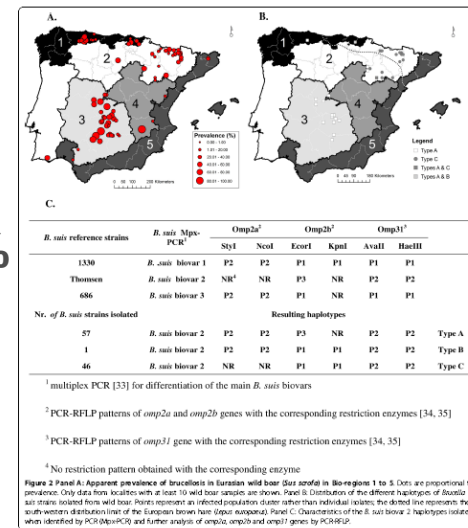


Figure 11. Outbreaks and suspicions of porcine brucellosis in France (1993-2008) (NRL data)

*The EFSA Journal* (2009) 1144, 73-112

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

# ITALIA *B. suis biovar 2*

 **Brucellosi**  
Centro di Referenza Nazionale

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

*Journal of Wildlife Diseases*, 39(3), 2003, pp. 716-722  
© Wildlife Disease Association 2003

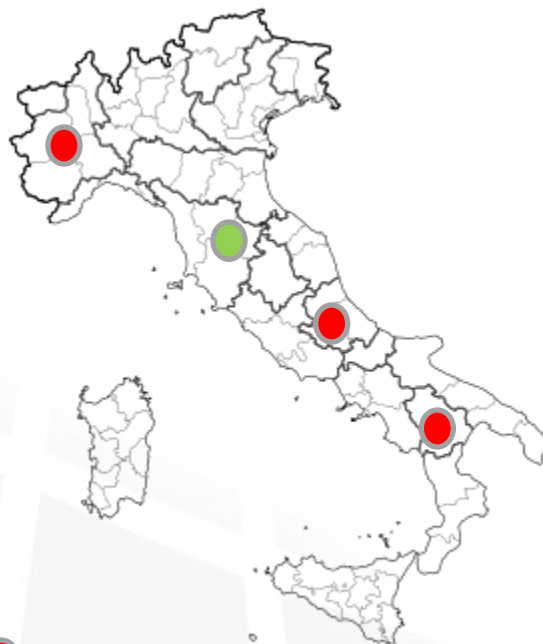
## Prevalence of *Leptospira* and *Brucella* Antibodies in Wild Boars (*Sus scrofa*) in Tuscany, Italy

Valentina V. Ebani,<sup>1</sup> Domenico Cerri,<sup>1</sup> Alessandro Poli,<sup>1,2</sup> and Ernesto Andreani<sup>1</sup> <sup>1</sup>Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Pisa, Viale delle Piagge, 2 I-56124 Pisa, Italy; <sup>2</sup> 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 Provvio, Daria Di Sabatino, Daniela Di Francesco, Katiuscia Zilli, Massimo Ancora & Manuela Tittarelli



 Presenza *B. suis biovar 2*

 Assenza *B. suis biovar 2*





# Problemi Riemergenti in Europa

 **Brucellosi**  
Centro di Referenza Nazionale



## 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*)

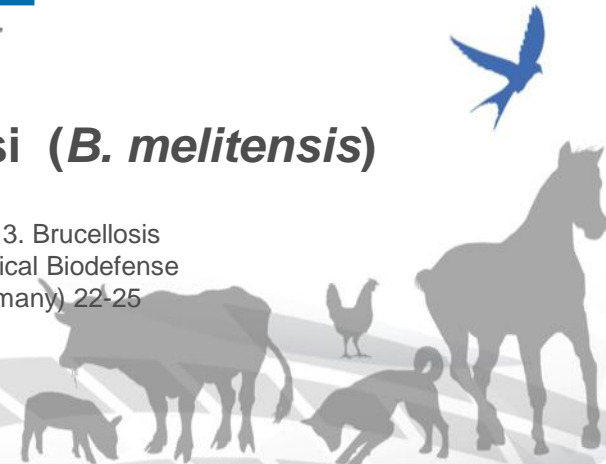
RAPID COMMUNICATIONS

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

A Mailles (a.mailles@invs.sante.fr), S Rautureau<sup>2</sup>, JM Le Horgne<sup>3</sup>, B Polgnet-Leroux<sup>2</sup>, C d'Arnoux<sup>4</sup>, G Dennetière<sup>5</sup>, M Faure<sup>6</sup>, J P Lavigne<sup>6</sup>, J P Bru<sup>6</sup>, B Garin-Bastujol<sup>6</sup>

## 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





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

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

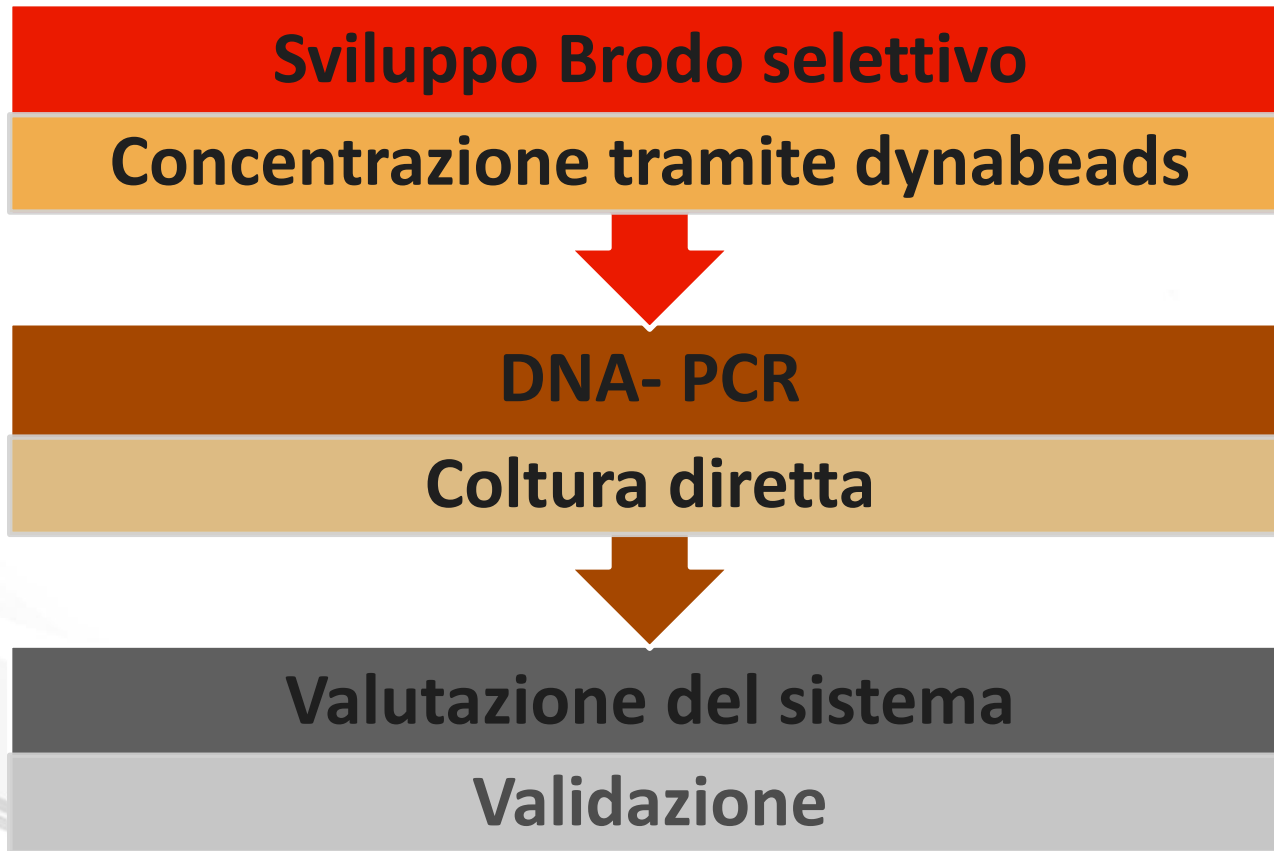


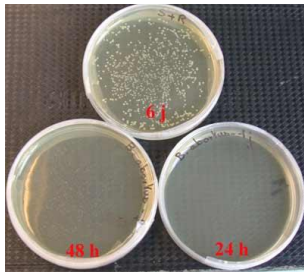
# BruEPIDA 2013 (ITA-FRA-SPA)



## Task-1

## Sviluppo di una strategia di diagnosi diretta





# 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



# Diagnosi diretta WP1 e WP2

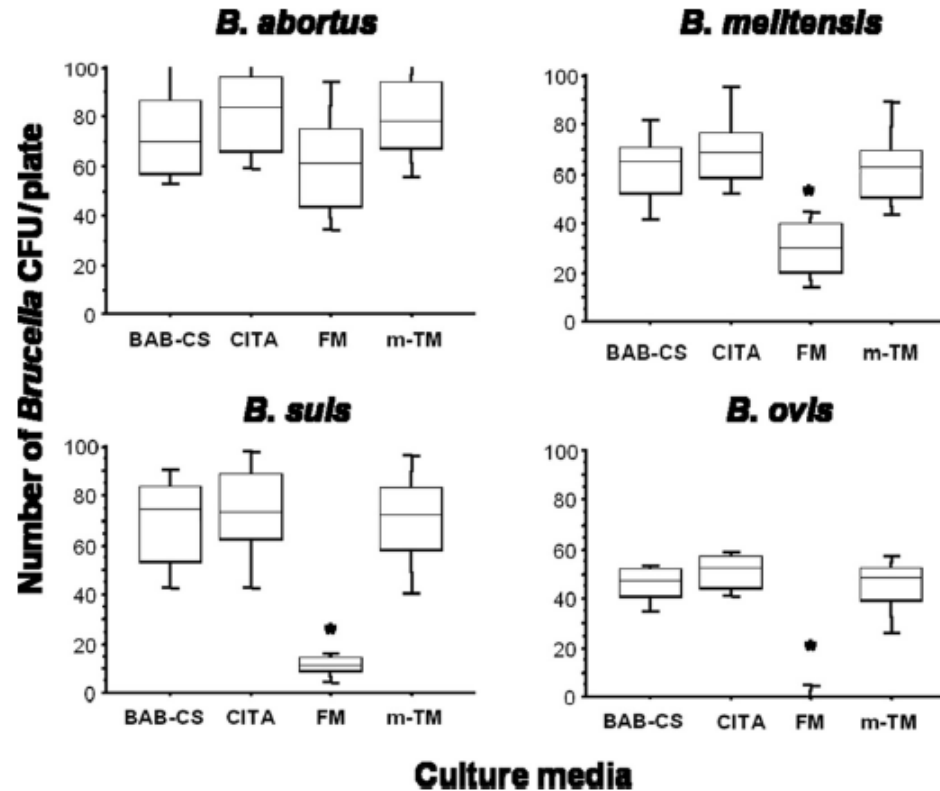




FIG. 1. Growth (number of CFU/plate) of representative *Brucella* species (see Table 1 for descriptions) on BAB-CS and three selective culture media: mTM (15), FM (15), and CITA (the new selective medium developed in this work). Statistical comparisons of means (numbers of CFU/plate) obtained for a given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

# 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

# Diagnosi diretta WP1 e WP2

• Testare fonti di carbonio alternativi agli esosi

1. Carbone
2. Glicerolo
3. Glutammato

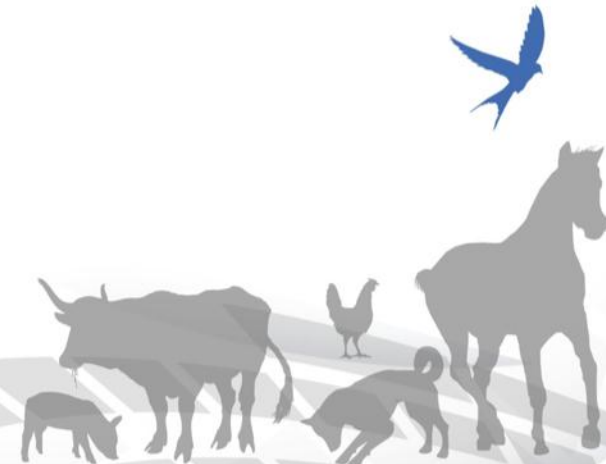
Effettuare prove di sensibilità tra i 3 laboratori

Brodo selettivo

Dynabeads sensibilizzate con LPS

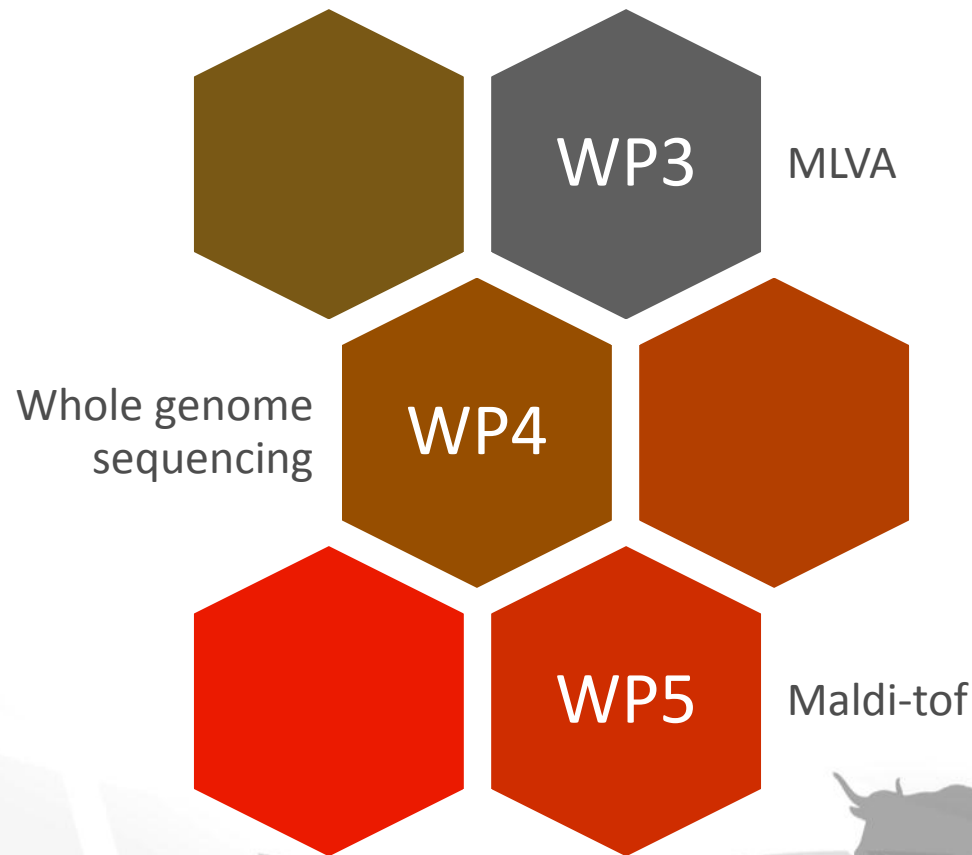
PCR diretta

WP4



# BruEPIDA 2013 (ITA-FRA-SPA)

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







# WP3-MLVA-16

 **Brucellosi**  
Centro di Referenza Nazionale

Scelta del pannello di loci

Scelta dei materiali di riferimento

Scelta degli algoritmi di analisi

Gentipizzazione Bm e Bs2

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.

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](http://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

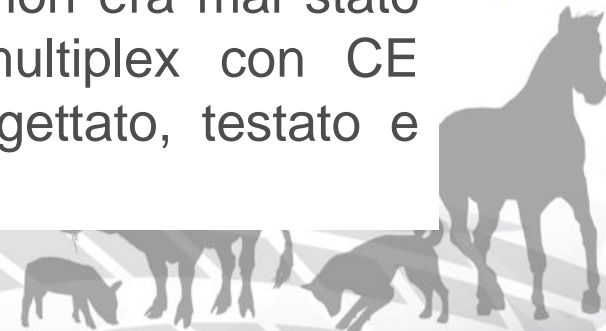
Article history:  
Received 24 August 2012  
Received in revised form 8 November 2012  
Accepted 8 November 2012  
Available online 19 November 2012

Keywords:  
MLVA  
Capillary electrophoresis  
*Brucella* spp.  
Genotyping

#### ABSTRACT

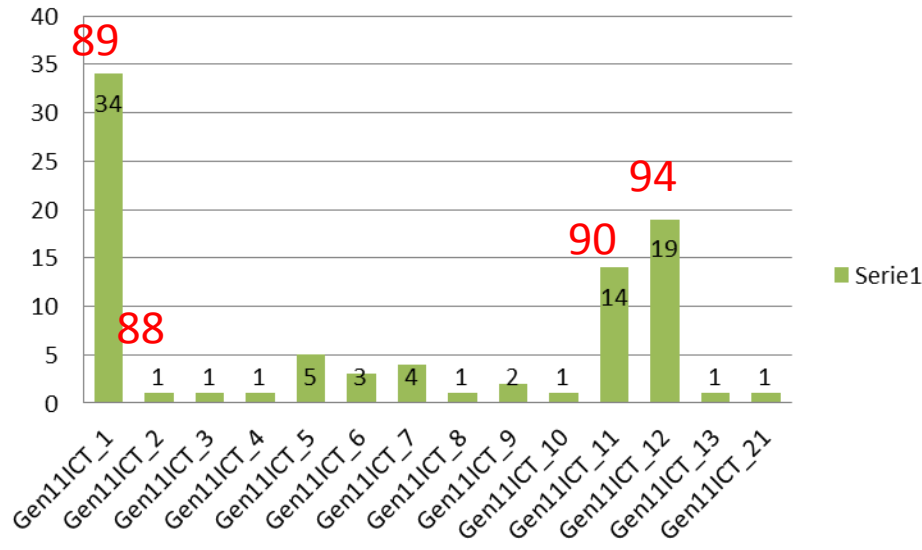
The Multi Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis 16 loci panel (MLVA-16), involving singleplex PCRs and agarose gel electrophoresis, is the standard genotyping method for *Brucella* spp., used also for the *Brucella* international online database. We describe an alternative, reliable, high-throughput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

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.



# MLVA global epidemiology *B. melitensis*

 Brucellosi  
Centro di Referenza Nazionale



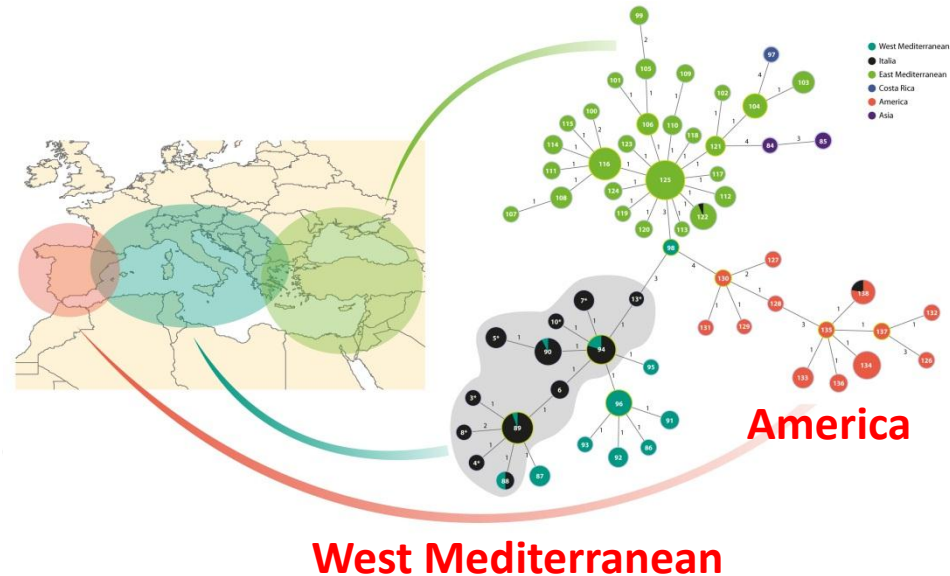
200 strains from 2011,2012, 2013

East Mediterranean

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

1 MLVA11 genotype East Mediterranean

1 MLVA11 genotype America

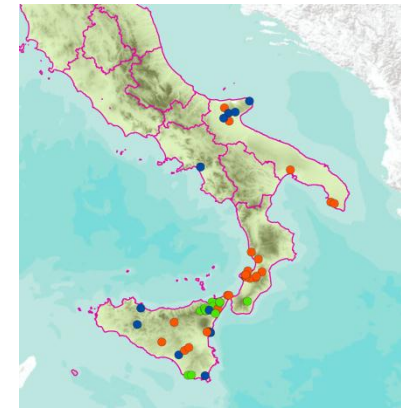
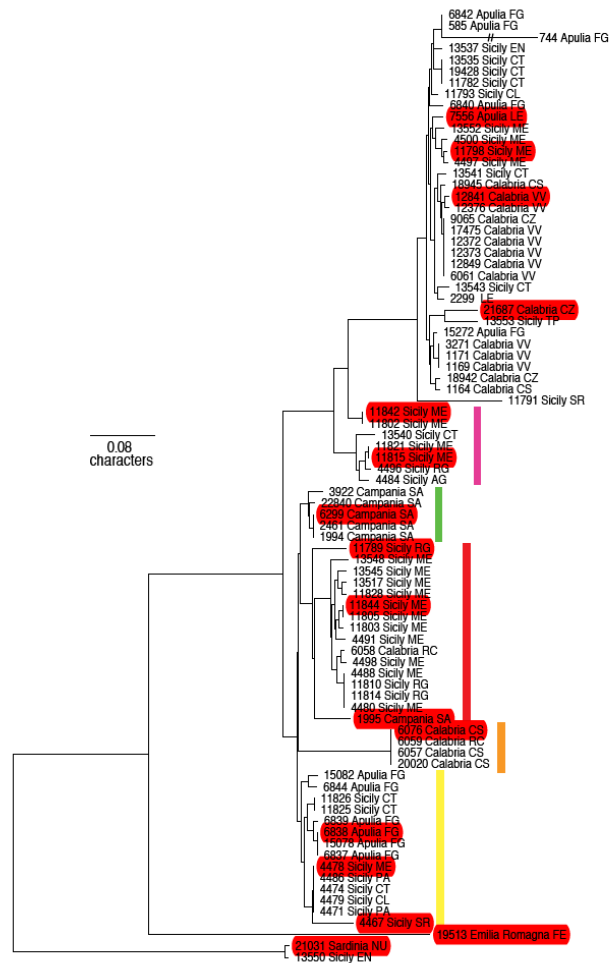


West Mediterranean

America

# Analisi clusters MLVA16 *B. melitensis*

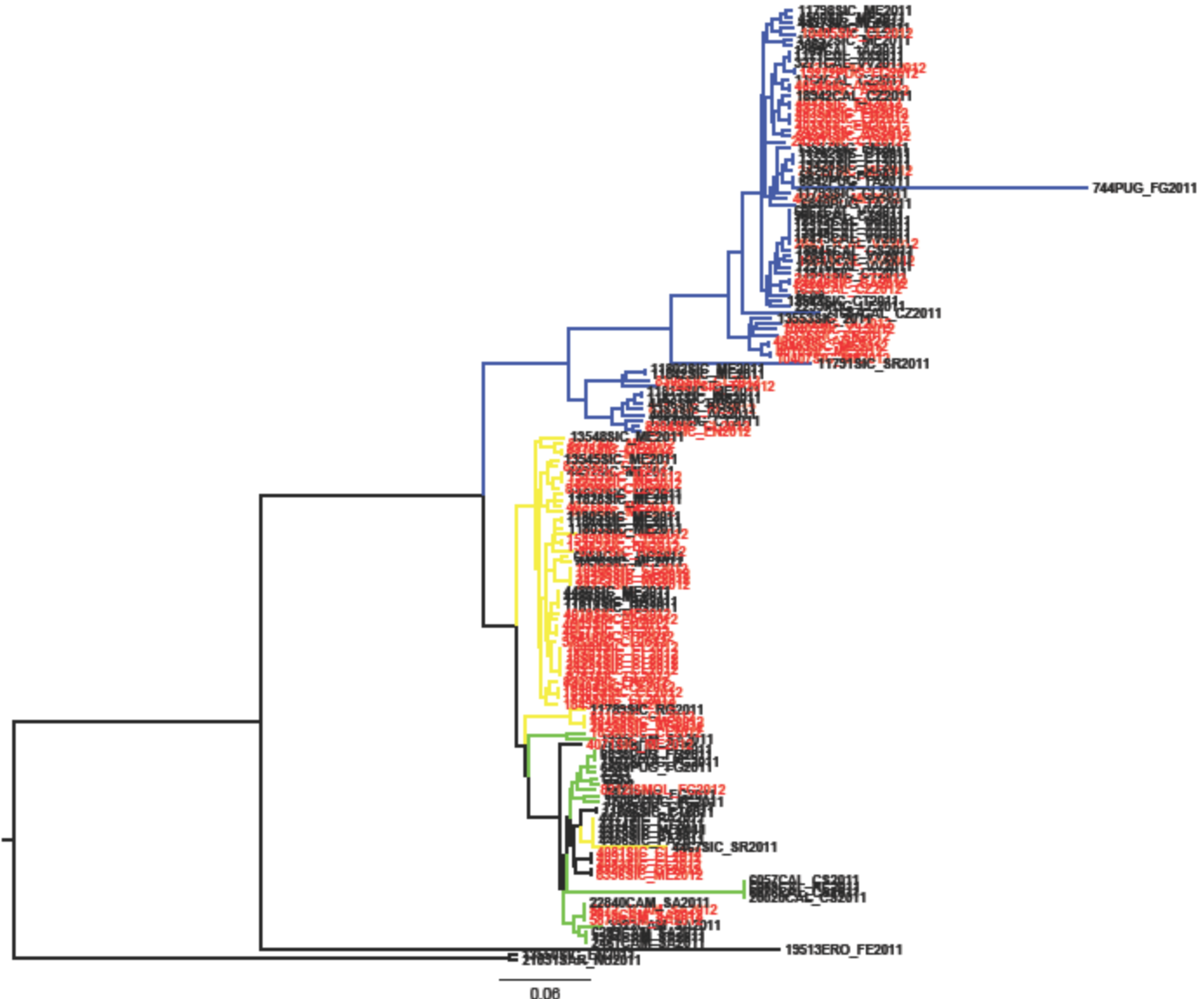
## Results





# MLVA16 *B. melitensis*

 Brucellosi  
Centro di Ref



**WP4**

**WGS *B. melitensis***

**WGS *B. suis* biovar 2**

**Standardizzazione nuovi metodi di genotipizzazione**

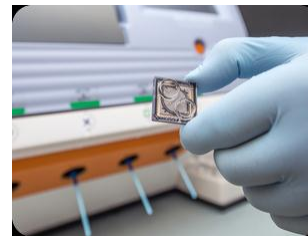
**Individuazione SNPs**

**Utilizzo di SNPs in saggi PCR**

**WP2**

# Ricerca SNPs da Whole Genome Sequencing

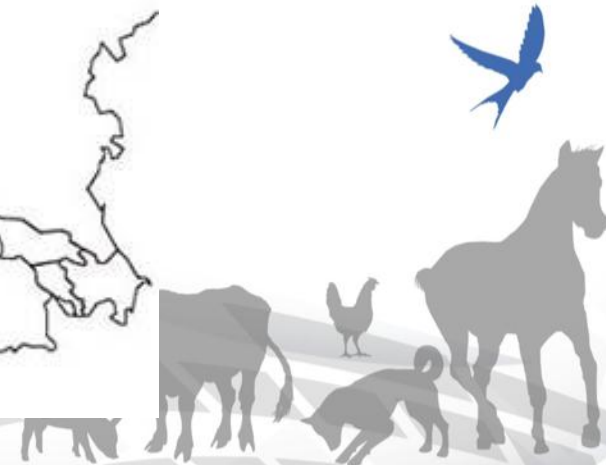
- Identificare i polimorfismi dei cluster circolanti in Francia, Spagna e Italia
- Delucidare la storia evolutiva di *B. suis biovar 2*
- Sviluppare saggi di PCR per l'identificazione rapida dei diversi genotipi circolanti



**MLST MLVA RFLP**



# B. melitensis e B. suis biovar 2



# WP5-MALDI-TOF MS

Linear Time-of-Flight

Ion Source Region

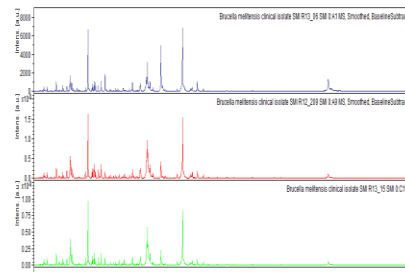
extraction lenses

sample plate

flight tube

detector

mass ● > mass ●



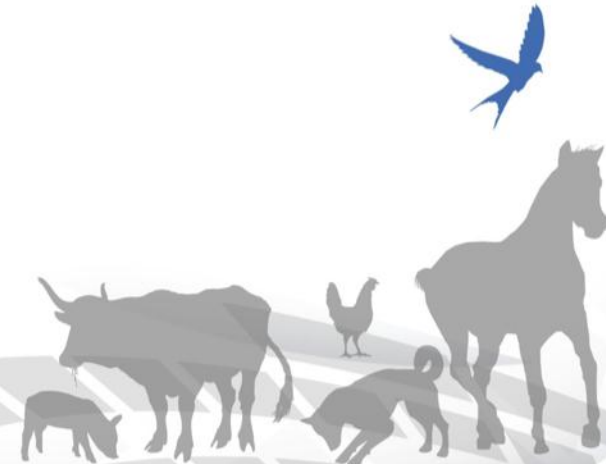
È una spettrometria di massa comunemente indicato con l'acronimo MALDI (dall'inglese Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization). La tecnica MALDI è indicata per l'analisi di composti di origine biologica quali proteine, zuccheri etc.). In microbiologia MALDI-TOF MS si basa sulla caratterizzazione dei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





# 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

# Grazie per l'attenzione



*Si ringrazia*  
*Elisabetta Di Giannatale*  
*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*

