



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Workshop Indagini Epidemiologiche
Auditorium Bellani, Ministero della Salute

Roma 15 novembre

Indagini epidemiologiche e chiusura di un cluster di *Brucella melitensis* in Provincia di Frosinone: strategie per la conservazione della qualifica U.I.

Marcello Sala

Osservatorio Epidemiologico IZSLT



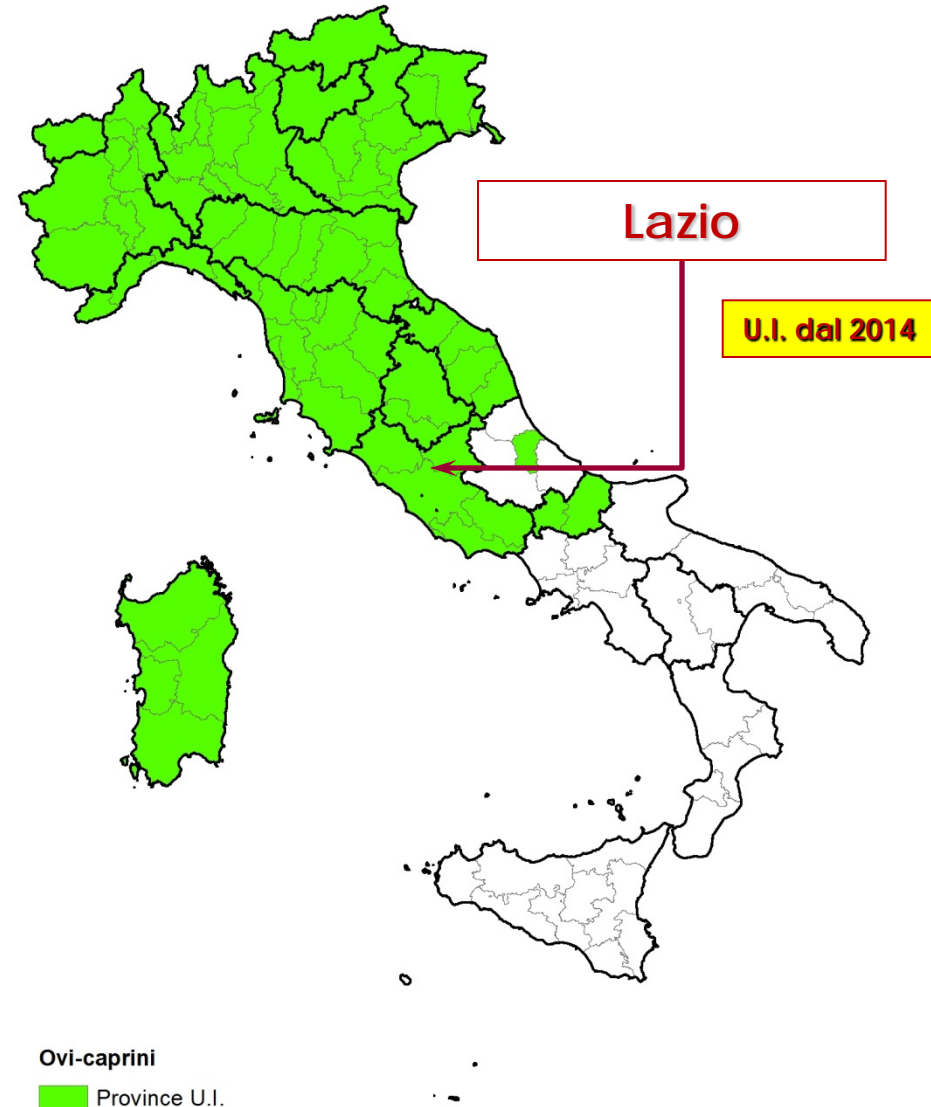
SCALETTA

- Background: stato sanitario di Frosinone
- Index case 2015 e cronologia
- Interventi e gestione: immediati e medio-lungo termine
- Indagini epidemiologiche ed “intelligence”
- Evidenze epidemiologia molecolare
- Criticità e conclusioni

Background: Regioni italiane U.I. brucellosi (*B. melitensis*)

**75
PROVINCE
UI**

**Commission Implementing Decision
2014/91/UE
of 14 February 2014**



Background: Province del Lazio UI brucellosi

Province UI: ovini-caprini

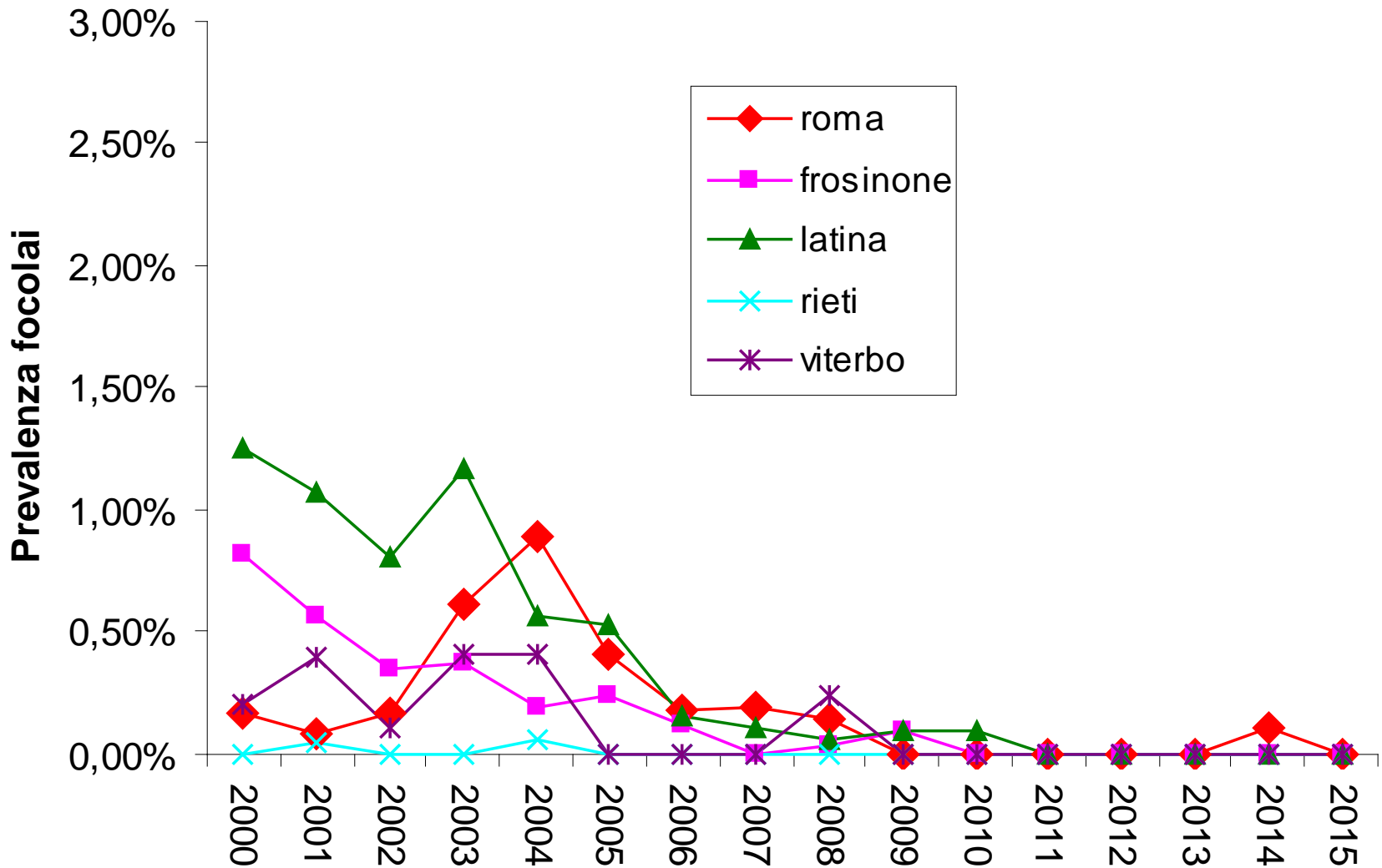
Rieti:	2004 (Dec. 2004/199/CE)
Viterbo:	2004 (Dec. 2004/199/CE)
Roma:	2008 (Dec. 2008/97/CE)
Latina:	2008 (Dec. 2008/97/CE)
Frosinone:	2014 (Dec. 2014/91/CE)

Province UI: : bovini-bufalini

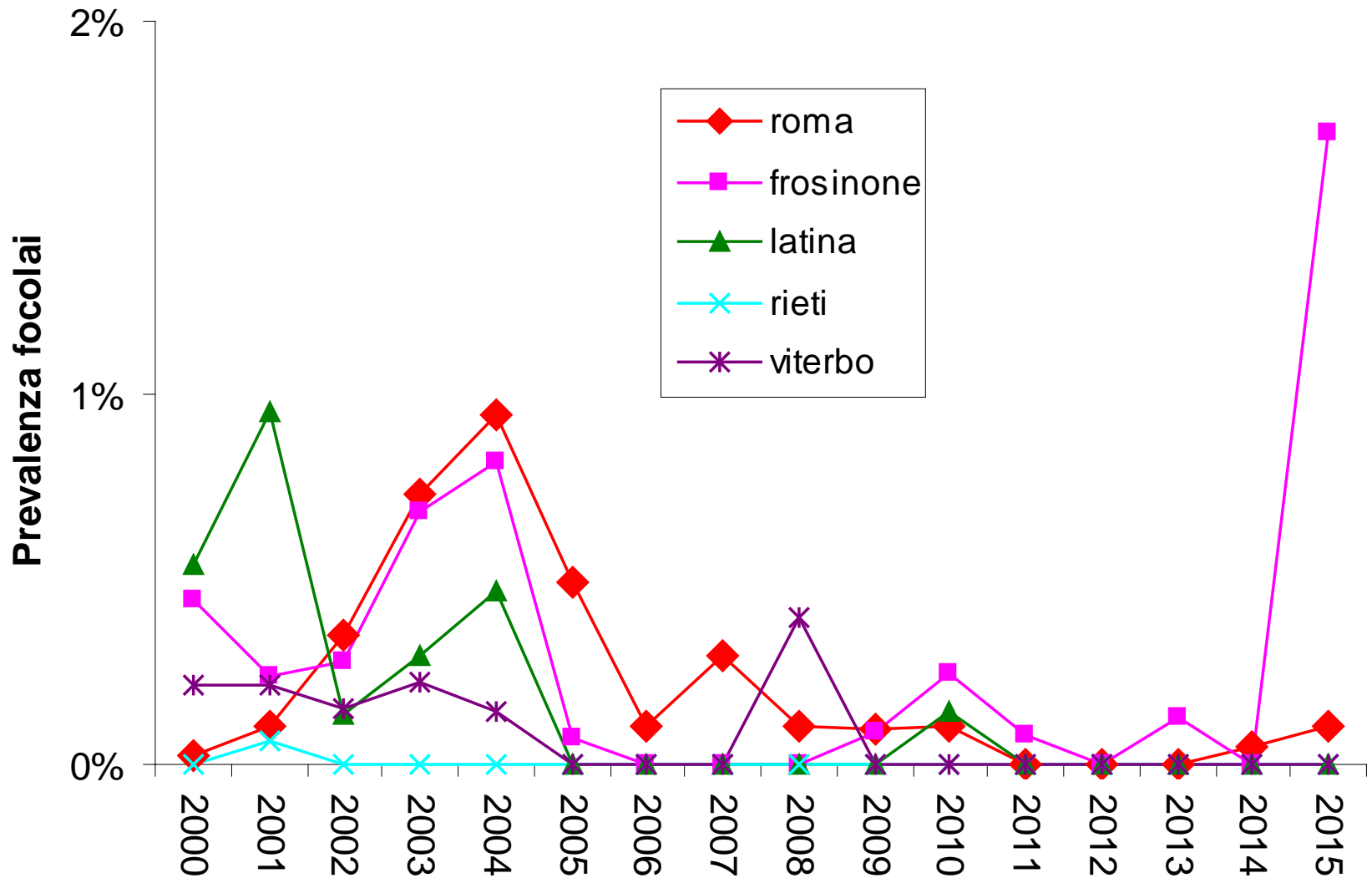
Rieti:	2009 (Dec. 2009/600/CE)
Viterbo:	2011 (Dec. 2011/277/CE)
Roma:	not Officially Free
Latina:	2011 (Dec. 2011/277/CE)
Frosinone:	2011 (Dec. 2011/277/CE)



Background: Lazio trend BRC bovina-bufalina 2000-2015



Background: Lazio trend BRC ovina-caprina 2000-2015



Background: Il Lazio & la brucellosi

2014: tutta la Regione nelle condizioni di poter (finalmente) essere dichiarata Ufficialmente Indenne

La priorità erano:

- prevenire la re-introduzione dell'infezione
- identificare precocemente le nuove positività
- eliminare tempestivamente le fonti di infezione possibili o reali (positivi-focolai)
- gestire i fattori di rischio

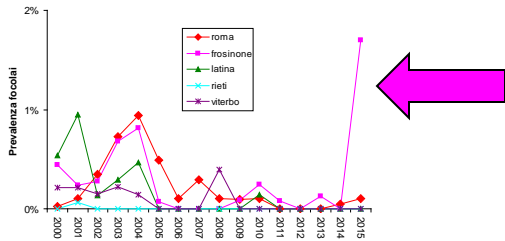
Background:

Programmazione controlli 2015

Province	2015 % farms to be tested VS total farms under the programme	
	Cattle	Sheep & goats
RM	50%	33%
LT	50%	33%
VT	50%	33%
RI	50%	33%
FR	50%	50%

➤ Con il controllo delle aziende a rischio: focolaio nei precedenti 24 mesi, transumanti-vaganti-bradi

Index case e cronologia: brucellosi ovicaprina Frosinone 2015-2016

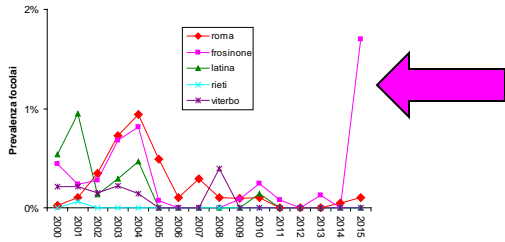


marzo '15 (distretto D)

- Tracing-back da un focolaio in provincia di Isernia (Molise) che aveva ricevuto alcune pecore adulte dal Lazio nel mese di luglio 2014.
- IL 30/03/2015 prelievo di sangue per controllo brucellosi sui capi ovini detenuti presso l'azienda 067FR041 sita in Sant'Apollinare (FR).

65 su 72 capi ovini testati FDC positivi (90,3%) -
Isolamento Brucella Spp.

Index case e cronologia: brucellosi ovicaprina Frosinone 2015-2016



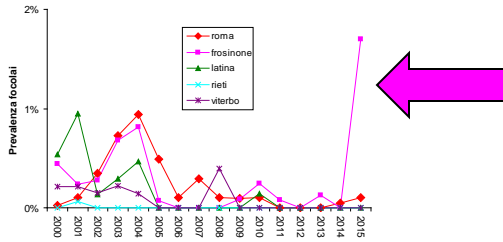
aprile '15 (distretto D)

- ✓ Sopralluogo ed indagine epidemiologica
- ✓ Evidenza di pascolo promiscuo tra capi dell'azienda Index e altre 3 aziende

2 aziende positive (**27%** e **87%**)

Isolamento *Brucella Spp*

Index case e cronologia: brucellosi ovicaprina Frosinone 2015-2016

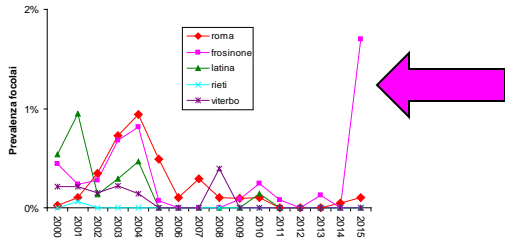


aprile '15 (distretto B e C)

- ✓ Prelievi per transumanza / profilassi di stato
- ✓ 2 aziende FDC positive **>90%**
- ✓ 1 azienda FDC positiva **3%**

Isolamento *Brucella* Spp

Index case e cronologia: brucellosi ovicaprina Frosinone 2015-2016

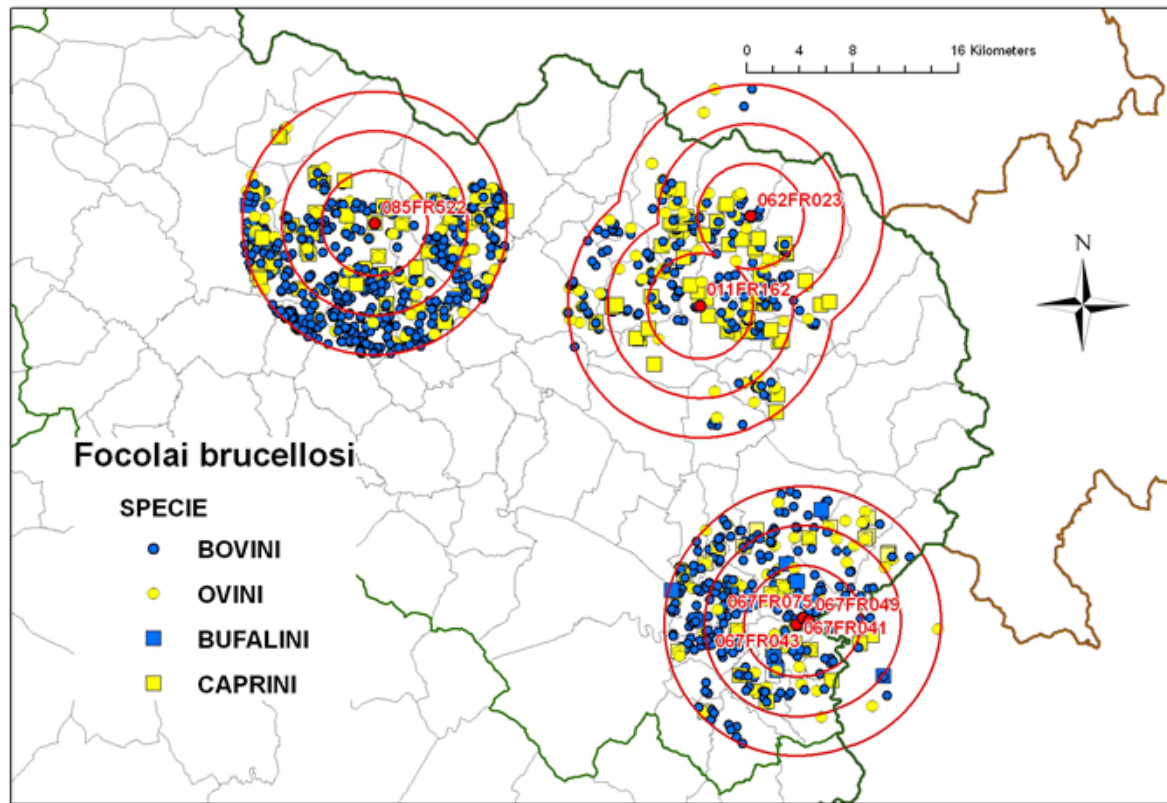


Prevenzione primaria fallita!

Piano di allerta (prevenzione secondaria)

- ✓ Indagini epidemiologiche
- ✓ Rintracci da focolaio
- ✓ Controllo a tappeto in aree attigue
- ✓ Procedura per sistematico isolamento e tipizzazione brucelle
- ✓ raccomandata rapida estinzione focolai

Interventi immediati: Frosinone 2015 maggio 2015 -Piano di Allerta



Buffer
progressivi
centrifughi 4-7-
10 Km da
focolai accertati

Tracing
sistematico
movimentazioni

Interventi immediati: Frosinone 2015 Piano di Allerta

aprile – settembre '15 (distretto B e C e D)

- ✓ Altri **4** focolai accertati
- ✓ Prevalenze FDC **1,8%-4%**

Isolamento Brucella Spp

Interventi medio termine: Frosinone 2015 Estensione controlli

Evidenza di epidemia (10 focolai aprile-settembre '15)

Estensione dei controlli al 100% delle aziende di Frosinone entro il 31/12/2015

Informazioni di movimentazioni non legali di capi da altra Regione e all'Interno della provincia

Attivazione organi inquirenti

Interventi medio termine: Frosinone 2015 Estensione controlli

ottobre– dicembre '15 (distretto B e C e D)

- ✓ Altri 7 focolai accertati
- ✓ Prevalenze FDC **4%-70%**

Isolamento Brucella Spp (4/7)

Risultati: Frosinone 2015

Species	n° FARMS registered	n° of farms with animals	N° of farms under the programme	N° farms to be tested	N° farms tested	% tested
Cattle	7.723	1.914	1.914	957	1.088	114%
Sheep&GOATS	1.908	1.629	1.629	815	817	100%

Species	N° farms positive	N° outbreaks*	N° farms single reactor suspended	Brucella isolation	brucella spp. identification	Brucella melitensis biovar 3	Prevalence outbreaks (denominators: N° under the programme)	Prevalence outbreaks (denominators: N° tested)
Cattle	3	2	1	1	1	1	0,10	0,18
Sheep&GOATS	19	15	4	12	12	12	0,92	1,84

17 focolai

Risultati: Frosinone 2015

- Le notifiche SIMAN –ADSN allertano MINSAL e UE
- Si osservano ritardi nella chiusura dei focolai (spt dopo O.M. 28/05/2015)
- Il Ministero chiede spiegazioni sui mancati ST. OUT
- 3 audizioni in Commissione UE in 5 mesi
- **Rischio perdita qualifica della provincia**
- **La Commissione blocca il conferimento delle qualifiche per altre province italiane**

Interventi lungo termine: Frosinone 2016 Estensione controlli

Disposto il controllo del 100% delle aziende di Frosinone entro il 31/12/2016

Priorità alle aziende non controllate nel 2015 al fine di definire

✓ delimitare estensione infezione

✓ Rimozione fonti

✓ "Salvare" la qualifica U.I.

Province	2016 % farms to be tested VS total farms under the programme	
	Cattle	Sheep & goats
RM	50%	33%
LT	50%	33%
VT	50%	33%
RI	50%	33%
FR	100%	100%

Risultati: Frosinone 2016

al 31/10/16

Species	n° FARMS registered	n° of farms with animals	N° of farms under the programme	N° farms to be tested	N° farms tested	% tested
Cattle	7.731	4.233	1.868	1.868	975	52%
Sheep&GOATS	1.885	1.547	1.547	1.547	1.003	65%

Species	N° farms positive	N° outbreaks*	N° farms single reactor suspended	Brucella isolation	brucella spp. identification	Brucella melitensis biovar 3	Prevalence outbreaks (denominators: N° under the programme)	Prevalence outbreaks (denominators: N° tested)
Cattle	1	1	0	1	1	1	0,05	0,10
Sheep&GOATS	3	1	2	1	1	1	0,06	0,10

2 focolai prevalenze FDC < 1%

Isolamento di Brucella Spp.

Risultati: Frosinone 2015-2016

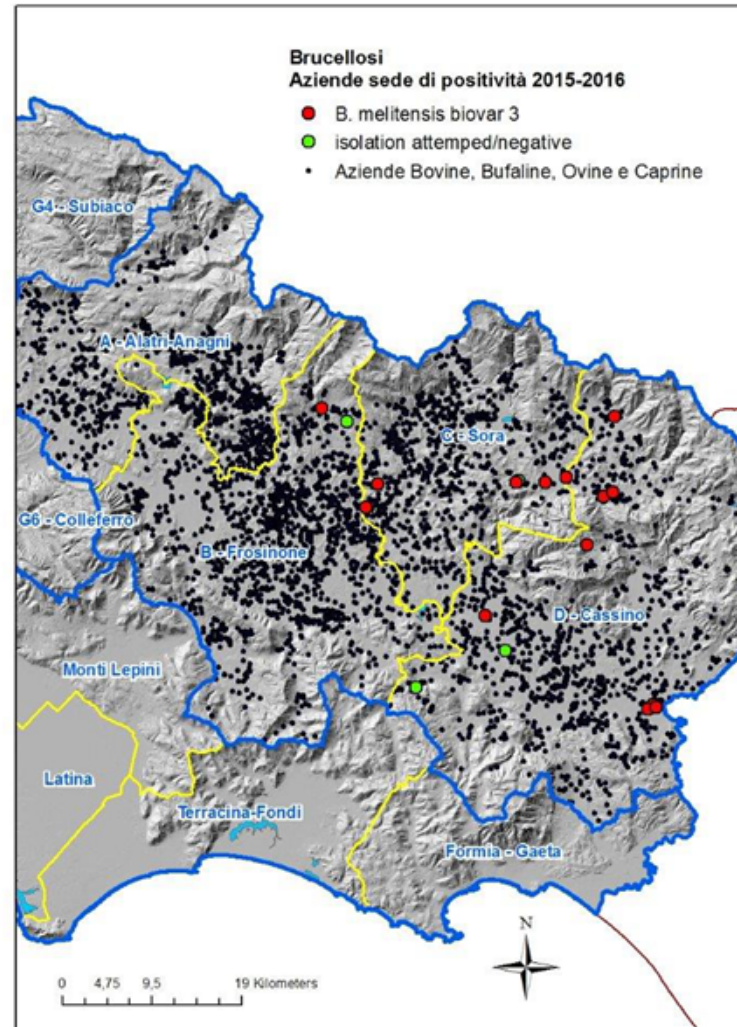
al 31/10/16

	Notified Outbreaks (N=19)			Other Positive farms (N=6)			ALL FARMS (N=25)		
	N° Tested (cumulative)	N° CFT Positive	culled	N° Tested (cumulative)	N° CFT Positive	culled	N° Tested (cumulative)	N° CFT Positive	culled
TOTAL SHEEP	2.382	732	2.004	2.304	12	15	4.686	744	2.019
TOTAL GOATS	252	18	252	76	4	4	328	22	256
TOTAL CATTLE	210	51	241	7	0	0	217	51	241
TOTAL	2.844	801	2.497	2.387	16	19	5.231	817	2.516

Casi attesi in provincia U.I. = 0



FR: focolai BRC 2015-2016



Gestione dei focolai: Frosinone 2015-2016

2015 (N=17)

13 aziende: **isolamento *Brucella spp.*** (N=12 ovi-cap; N= 1 Bov)

- 12 Stamping out (11 ovi-cap; 1 Bov)
- 1 abbattimento positive e risanamento

4 aziende: **Isolamento *Brucella* tentato ma negativo** (3 ovi-cap; 1 Bov)

- 3 Stamping out (2 ovi-cap; 1 Bov)
- 1 abbattimento positive e risanamento (ovi-cap)

2016 (N=2)

2 aziende: **isolamento *Brucella spp.*** (1 ovi-cap; 1 Bov)

- 2 Stamping out

Frosinone 2015-2016:

Indagini epidemiologiche - "intelligence"

- "Compilazione" delle Indagini epidemiologiche in tutti i focolai e nelle aziende sede di positività
- Formalmente gli atti sono stati compiuti! (allegato PDF in SIMAN) seppure con ritardi
- Eseguita valutazione puntuale da parte dell'OEVN con richiesta approfondimenti
- Attivazione ascolto di "canali informali" – intelligence

Frosinone 2015-2016: Indagini epidemiologiche - "intelligence"

Nel corso delle prime attività di emergenza vengono riportate "Informazioni" su un flusso illegale di partite di agnelli da regioni endemiche per BRC

In secondo momento vengono attivate le autorità inquirenti

Frosinone 2015-2016:

Indagini epidemiologiche - "intelligence"

Criticità alla lettura delle indagini epidemiologiche (ci deve essere qualcuno che le legge! .. E che le usa)

- Nessun aborto segnalato – rimonte interne
- Origine dell'infezione ???
- Elenco movimentazioni incomplete
- Completezza e dettaglio censimenti
- Informazioni accessorie ma fondamentali "mute" sulla scheda

Le valutazioni si estendono ben oltre le 48 ore dalla notifica del focolaio – soprattutto in occasione di eventi epidemici



Allevamento di razza **SARDA** (BDN)..

Rimonta esclusivamente interna

Dichiarazioni allevatore



..con agnelle/pecore **COMISANE** ...

Sul terreno



..e riproduttore presente **SUFFOLK** ...!!

Sul terreno

Frosinone 2015-2016:

Indagini epidemiologiche - “intelligence”

Esempio

Richieste approfondimenti

- Fenotipo dei capi allevati non congruenti con i riproduttori presenti
- Il numero di allevi incompatibili col numero di riproduttori
 - ✓ Eccesso (sospetto introduzioni “non controllate”)
 - ✓ Difetto (aborti non notificati? – cessioni non tracciate?)
- Incongruenza progressivi delle marche auricolari, età reale dei capi ed età riportate sul registro anagrafico
- **Evidenze di assenza di tracciabilità (non solo individuale ma anche di gruppi interi)**



Evidenze epidemiologia molecolare *Brucella melitensis* Biovar 3

25 isolati di brucella da 13 focolai 2015-2016

- 23 isolati da 11 focolai 2015 (N=16 ovini N= 4 capre; N= 3 bovini)
- 2 dai 2 focolai 2016 (N=1 ovini; N= 1 bovini)

Analizzati dal Centro Nazionale di Referenza IZSAM-COVEPI

Epidemiologia molecolare : overall 2015-2016 Frosinone *Brucella melitensis* Biovar 3

Multi Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis 16 loci panel
(MLVA-16)

Panel 8 loci = genotype 49

Panel 11 loci = genotype 87 (*B. melitensis* – “West mediterranean” lineage)

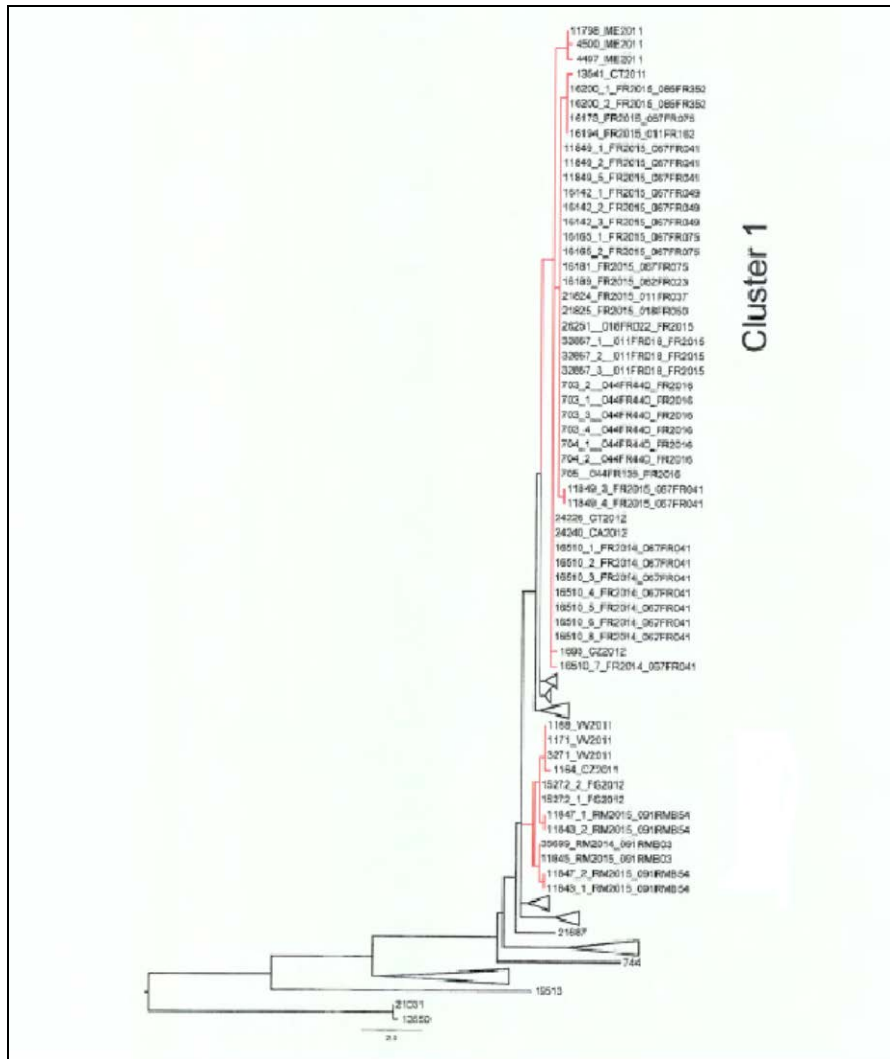
Panel 16 loci = genotype 4

Reference: COVEPI – Brucellosis NRL

prot. N. N°1676 - 2016 Feb. 16 - Prot. N° 17168 – 2016 Oct. 12

Evidenze epidemiologia molecolare

Brucella melitensis Biovar 3



2015 : CLUSTER 1

Isolati da 11 focolai

Phylogenetic tree
(UPGMA)

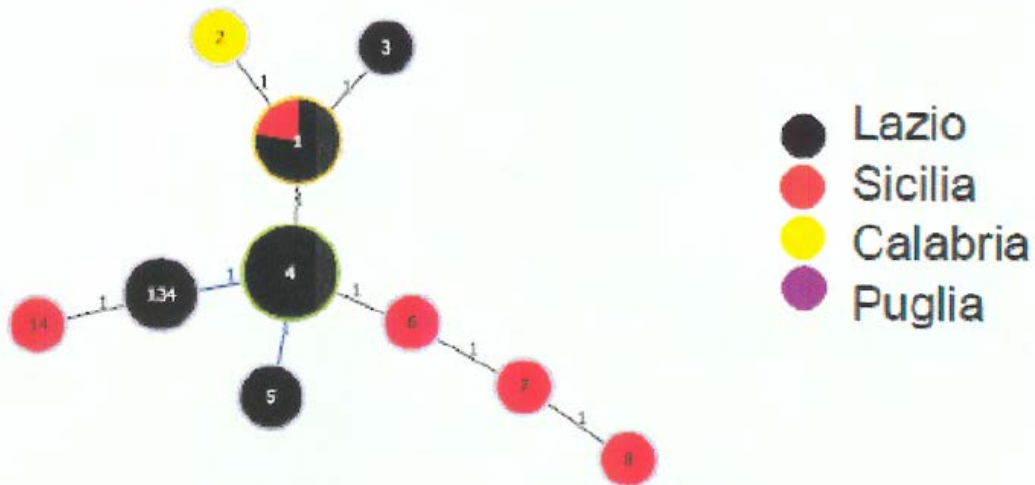
Reference:

COVEPI – Brucellosis NRL
Prot. N°1676 - 2016 Feb. 16

Evidenze epidemiologia molecolare

Brucella melitensis Biovar 3

Cluster 1



Reference:

COVEPI – Brucellosis NRL Prot.
N°1676 - 2016 Feb. 16

2015 : CLUSTER 1

Isolati da 11 focolai

**Minimum spanning tree
(goe-Burst method)**

Connessioni a singolo locus tra i genotipi di Frosinone e quelli archiviati nel database del Centro di referenza

Evidenze epidemiologia molecolare

Brucella melitensis Biovar 3 – genotipo 4

NUM_REGISTRO	CODICE_AZIENDA	ANNO	PROV	Comune	Genotipo 8 loci**	Genotipo 11 loci**	Genotipo 16 loci*	Codice MLVA
11849_1	067FR041	2015	FR	SANT'APOLLINARE	49	87	4	3-6-3-14-1-1-3-3-7-42-8-5-6-8-6-3
11849_2	067FR041	2015	FR	SANT'APOLLINARE	49	87	4	3-6-3-14-1-1-3-3-7-42-8-5-6-8-6-3
11849_5	067FR041	2015	FR	SANT'APOLLINARE	49	87	4	3-6-3-14-1-1-3-3-7-42-8-5-6-8-6-3
16142_1	067FR049	2015	FR	SANT'APOLLINARE	49	87	4	3-6-3-14-1-1-3-3-7-42-8-5-6-8-6-3
16142_2	067FR049	2015	FR	SANT'APOLLINARE	49	87	4	3-6-3-14-1-1-3-3-7-42-8-5-6-8-6-3
16142_3	067FR049	2015	FR	SANT'APOLLINARE	49	87	4	3-6-3-14-1-1-3-3-7-42-8-5-6-8-6-3
16165_1	067FR075	2015	FR	SANT'APOLLINARE	49	87	4	3-6-3-14-1-1-3-3-7-42-8-5-6-8-6-3
16165_2	067FR075	2015	FR	SANT'APOLLINARE	49	87	4	3-6-3-14-1-1-3-3-7-42-8-5-6-8-6-3
16181	067FR075	2015	FR	SANT'APOLLINARE	49	87	4	3-6-3-14-1-1-3-3-7-42-8-5-6-8-6-3
16189	062FR023	2015	FR	SAN DONATO VAL DI COMINO	49	87	4	3-6-3-14-1-1-3-3-7-42-8-5-6-8-6-3
21824	011FR037	2015	FR	ATINA	49	87	4	3-6-3-14-1-1-3-3-7-42-8-5-6-8-6-3
21825	018FR050	2015	FR	CASALVIERI	49	87	4	3-6-3-14-1-1-3-3-7-42-8-5-6-8-6-3
26251	018FR022	2015	FR	CASALVIERI	49	87	4	3-6-3-14-1-1-3-3-7-42-8-5-6-8-6-3
703_2	044FR440	2016	FR	MONTE SAN GIOVANNI CAMPANO	49	87	4	3-6-3-14-1-1-3-3-7-42-8-5-6-8-6-3
703_1	044FR440	2016	FR	MONTE SAN GIOVANNI CAMPANO	49	87	4	3-6-3-14-1-1-3-3-7-42-8-5-6-8-6-3
703_3	044FR440	2016	FR	MONTE SAN GIOVANNI CAMPANO	49	87	4	3-6-3-14-1-1-3-3-7-42-8-5-6-8-6-3
703_4	044FR440	2016	FR	MONTE SAN GIOVANNI CAMPANO	49	87	4	3-6-3-14-1-1-3-3-7-42-8-5-6-8-6-3
704_1	044FR440	2016	FR	MONTE SAN GIOVANNI CAMPANO	49	87	4	3-6-3-14-1-1-3-3-7-42-8-5-6-8-6-3
704_2	044FR440	2016	FR	MONTE SAN GIOVANNI CAMPANO	49	87	4	3-6-3-14-1-1-3-3-7-42-8-5-6-8-6-3
705	044FR135	2016	FR	MONTE SAN GIOVANNI CAMPANO	49	87	4	3-6-3-14-1-1-3-3-7-42-8-5-6-8-6-3
32867_1	011FR018	2015	FR	ATINA	49	87	4	3-6-3-14-1-1-3-3-7-42-8-5-6-8-6-3
32867_2	011FR018	2015	FR	ATINA	49	87	4	3-6-3-14-1-1-3-3-7-42-8-5-6-8-6-3
32867_3	011FR018	2015	FR	ATINA	49	87	4	3-6-3-14-1-1-3-3-7-42-8-5-6-8-6-3
17270	056FR239	2016	FR	PONTECORVO	49	87	4	3-6-3-14-1-1-3-3-7-42-8-5-6-8-6-3
17271	077FR005	2016	FR	TERELLE	49	87	4	3-6-3-14-1-1-3-3-7-42-8-5-6-8-6-3

Genotipi MLVA separati per i pannelli 1, 2a e 2b con i relativi valori allelici per gli isolati analizzati.

* nomenclatura in accordo con il database del LRN per le brucellosi

**nomenclatura in accordo con database internazionale <http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/>

2015-2016

**Identità perfetta tra gli
isolati di Frosinone**

Reference: COVEPI – Brucellosis NRL
Prot. N° 17168 – 2016 Oct. 12

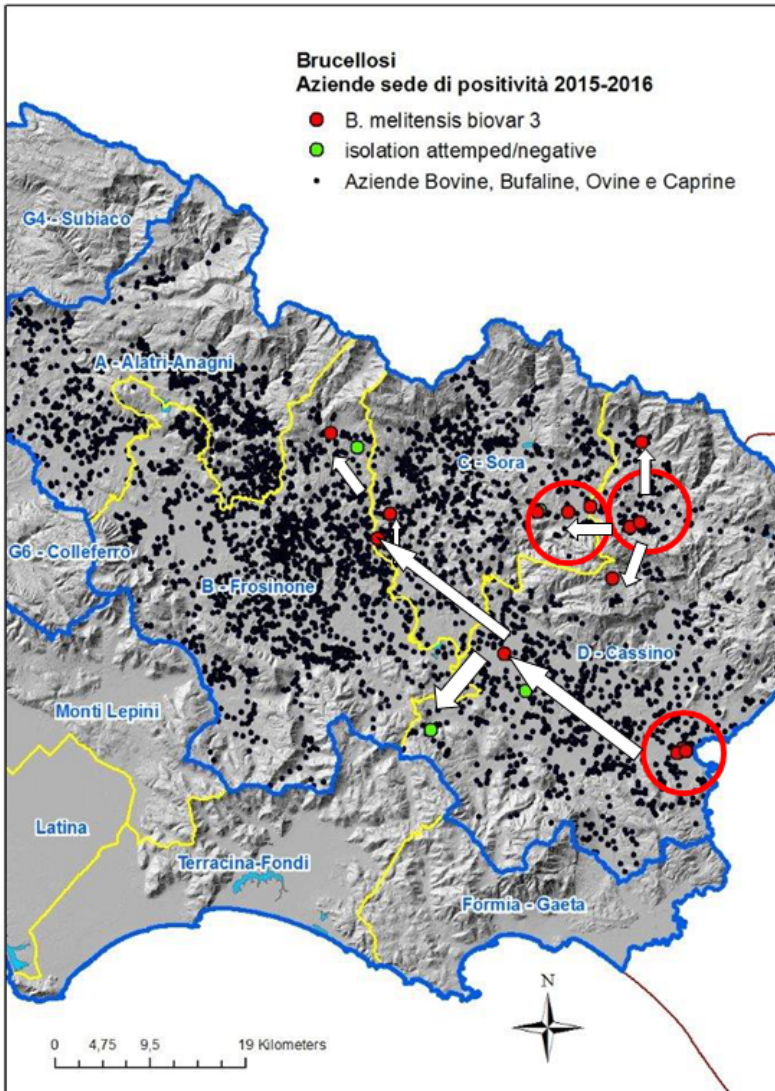
Origine dell'infezione

Integrazione e convergenza delle evidenze epidemiologiche-intelligence-epid. molecolare

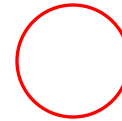
- Introduzione primaria (almeno 24 mesi prima) della brucellosi da una fonte comune mediante la movimentazione illegale di agnelloni/e da regioni endemiche (indagine in corso) **origine**
- Trasmissione locale secondaria mediante movimentazione (anche illegale) dei capi, e contatti diretti anche a pascolo **trasmissione inter-aziendale**
- Interessamento di tutte le specie sensibili (promiscuità) **precora** → **capra** → **bovino**
trasmissione intra-aziendale

FR: focolai BRC 2015-2016

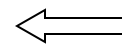
Ipotesi re-introduzione - diffusione



I. partite infette



II. Promiscuità –
contatti diretti



III. Movimentazione /
cessione singoli capi
infetti



Criticità e conclusioni

- Ritardi – disomogeneità nella gestione dei focolai – persistenza fonti di infezione
- Molto critica la tracciabilità dei capi (BDN-Registri) – forte limitazione all’indagine epidemiologica e prevenzione II-III (blocco diffusione)
- Tutti i focolai 2015 & 2016 sono stati chiusi eccetto 1 (in corso) in seguito a ricorso al TAR. Il giudice ha rigettato il ricorso a fine settembre 2016 – ULTERIORE RICORSO
- Ad oggi nessuna evidenza di diffusione ad altre province del Lazio o altre Regioni
- Individuata probabile origine dell’infezione ma...
- ...ancora non definiti i canali di trasmissione secondaria
- NON possiamo considerare il rischio scongiurato

Criticità e conclusioni

- La compilazione dell'indagine epidemiologica E' UN ATTO OBBLIGATORIO (SIMAN) ma **NON può essere puramente formale**
- La valutazione epidemiologica necessita di più tempo
- Indagine rimodulata nei giorni / settimane successivi agli eventi diagnostici e determina..
-progressivi e simmetrici adeguamenti degli interventi in funzione delle evidenze acquisite
- Opportunamente rappresentati al MINSAL

!Ruolo degli Osservatori Epidemiologici!

Criticità e conclusioni

- L'isolamento deve essere SEMPRE tentato in caso di positività sierologica - Il mancato isolamento NON costituisce prova di assenza dell'infezione
- La tipizzazione sistematica degli isolati consente di comprendere la dinamica epidemiologica territoriale – importante collaborazione con CRN Brucellosi
- Può essere decisiva per accertare o ipotizzare l'origine dell'infezione
- E' uno strumento di definizione del rischio contingente e pregresso e di gestione del rischio futuro
- Può salvare lo stato di indennità di una provincia (insieme alla tempestiva gestione dei focolai)

Ringraziamenti

IZSLT Sezione di Latina:

Dr. Giorgio Saralli, Dr. Giampaolo Bruni, Dr. Antonio Fagiolo

IZSLT – D.O. Diagnostica Generale

Dr. Antonio Battisti, Dr.ssa Alessia Franco, Dr. Andrea Caprioli

IZSAM G. Caporale – COVEPI – CRN Brucellosi

**Direzione Regionale Assetto Istituzionale, Prevenzione e
assistenza territoriale- Area Sanità Veterinaria -Regione Lazio**

Dr.ssa Valeria Ficarelli

I colleghi dei SV distrettuali Area A e B - ASL Frosinone



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DEL LAZIO E DELLA TOSCANA
"M. ALEANDRI"

Grazie per l'attenzione



BRUCELLOSI LAZIO 2012-2016



Gestione dei focolai: Frosinone 2015-2016

Year suspicion	Number of outbreaks	Year - confirmation		Year - extinction	
		2015	2016	2015	2016
2015	17	13	4	10	7
2016	2	0	2	0	2
2015-2016	19	13	6	10	9

Criticità :

Tempi di estinzione (rimozione fonti di infezione)

Le modalità di estinzione dei focolai non tempestive

