



ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO




CRN Brucellosi

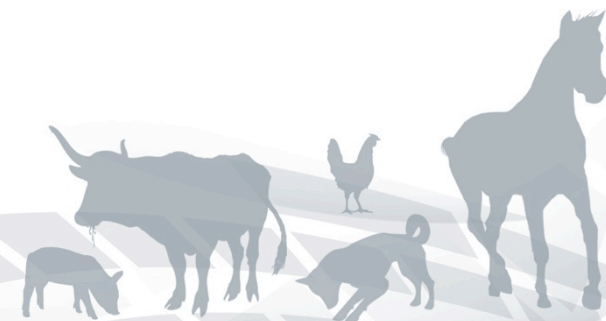
Centro di Referenza Nazionale

**Tipizzazione dei ceppi di campo di Brucella
isolati nella popolazione zootecnica in Italia
dal 2006 al 2011**

Elisabetta Di Giannatale - Zilli Katuscia
Teramo 11-12 ottobre 2012



- 
- ✓ I dati epidemiologici disponibili sui casi di Brucellosi in Italia e i dati sull'infezione negli animali, mostrano una generale tendenza alla riduzione della malattia
 - ✓ La brucellosi resta nei paesi del bacino del mediterraneo un importante problema di sanità pubblica per le infezioni umane ed è causa di ingenti danni economici





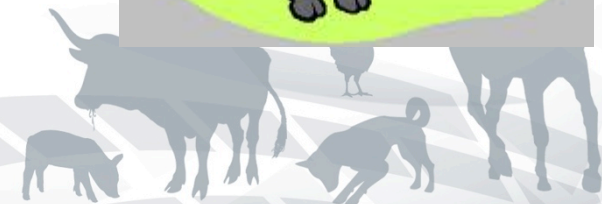
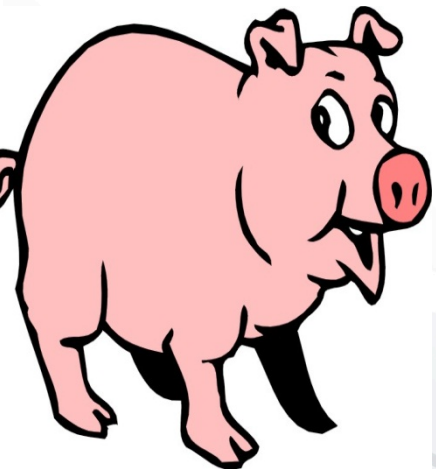
ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO



CRN Brucellosi

Centro di Riferenza Nazionale


Brucellosi: Principali Specie coinvolte in Italia





ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

 **CRN Brucellosi**
Centro di Referenza Nazionale

 **Nell'uomo e negli animali il quadro clinico non è specifico e la diagnosi deve essere supportata da indagini di laboratorio quali:**

- ✓ isolamento del microrganismo
- ✓ rilevazione dei loro antigeni
- ✓ rilevazione di materiale genetico
- ✓ rilevazione di anticorpi specifici o risposta cellulo-mediata.




Piani di eradicazione/sorveglianza



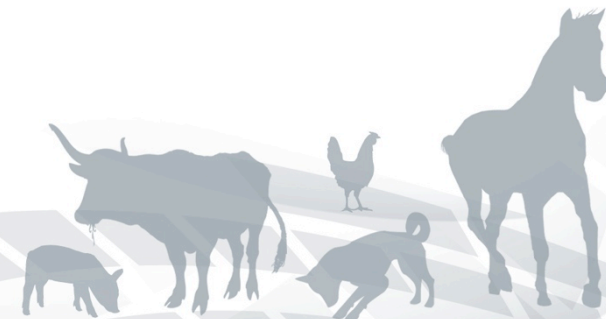
❖ Punto cardine per la riuscita dei piani di eradicazione della brucellosi è la costruzione di adeguati sistemi di sorveglianza

❖ un sistema di sorveglianza, ha lo scopo di determinare, in risposta alle malattie, le azioni immediate o a più lungo raggio e, attraverso l'analisi dei dati, le priorità delle azioni a lungo termine e progettare e valutare costi e benefici.



uno dei componenti principali di un sistema di sorveglianza è la raccolta passiva dei dati

❖ l'identificazione dei ceppi isolati in focolai di brucellosi è uno strumento essenziale per comprendere pienamente l'epidemiologia della malattia e fornire il supporto al rintraccio delle fonti di infezione, migliorando in tal modo i risultati di un programma nazionale di eradicazione.





ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

 **CRN Brucellosi**
Centro di Referenza Nazionale

EUROPEAN COMMISSION

HEALTH & CONSUMERS DIRECTORATE-GENERAL

Unit G5 - Veterinary Programmes

SANCO/10849/2012

Eradication programme for Bovine Brucellosis

*Programmes for the eradication, control and monitoring of
certain animal diseases and zoonoses*

Approved* for 2012 by Commission Decision 2011/807/EU

(Italy)

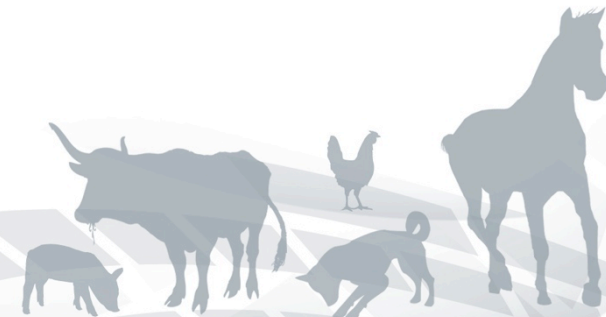
* in accordance with Council Decision 2009/470/EC



- **Brucella species**

❖ Su base genetica, il gruppo **Brucella** può essere considerato come variante di una singola specie che per ragioni storiche è identificata come *Brucella melitensis*.

❖ Tuttavia, nella pratica questo approccio non è ritenuto soddisfacente per cui si distinguono “**9 species**”.




Brucella species e biovars

- ✓ *B. abortus* (biovar 1,2,3,4,5,6,9) (bovini e bovidae)
- ✓ *B. melitensis* (biovar 1,2,3) (pecore e capre)
- ✓ *B. suis* (biovar 1-5) (suini, renne, roditori selvatici)
- ✓ *B. ovis* (ariete)
- ✓ *B. canis* (cani)
- ✓ *B. neotomae* (ratto del deserto)
- ✓ *B. ceti* (mammiferi marini)
- ✓ *B. pinnipedialis* (mammiferi marini)
- ✓ *B. microti* (arvicoli comuni)



Brucella spp. :identificazione presuntiva

- 
- Caratteristiche di crescita e morfologia delle colonie
 - Colorazione di Gram (mor)
 - Oxidasi tests
 - Catalasi test
 - Urea tests
 - Mobilità
 - Slide Agglutination test con anti-Brucella policlonal serum



Identificazione di specie e biovars di Brucellae

Identificazione fagica

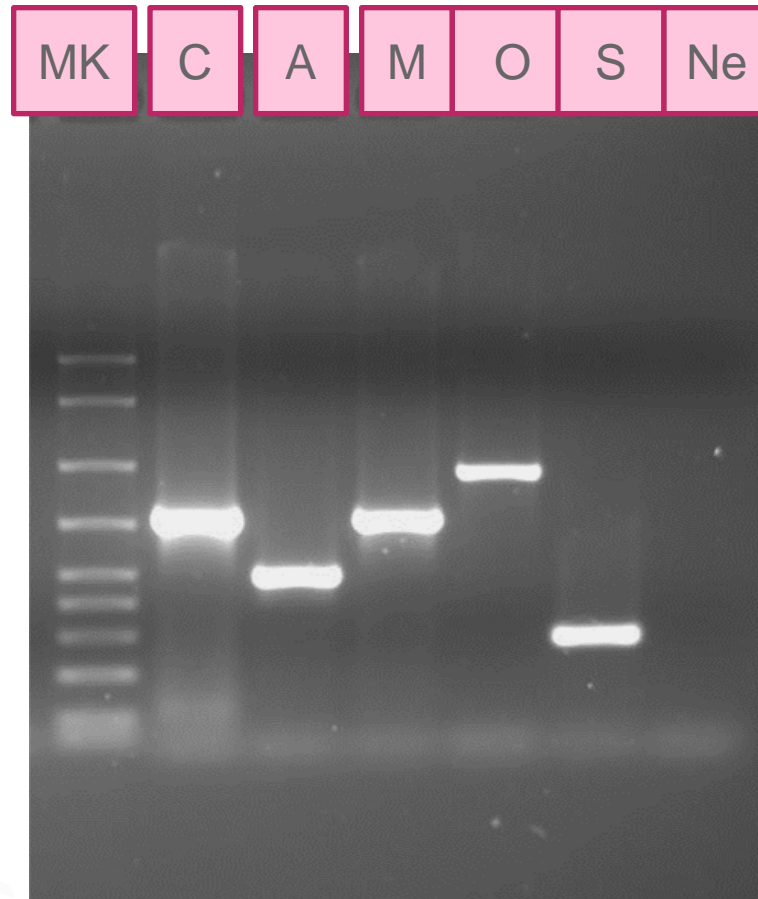
Identificazione molecolare

- ✓ Identificazione di specie: PCR –AMOS
- ✓ Identificazione di biovar: RFLP



Brucella species identification

A, M, O, S PCR multiplex



MK=Marker
C=champion
A=B. abortus
M=B. melitensis
O=B. ovis
S=B. suis
Ne=negative control



1-BRICKER B.J. & HALLING S.M. (1994). Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 2660–2666.

2-BRICKER B.J. & HALLING S.M. (1995). Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 1640–1642

Alcuni riferimenti bibliografici

- BRICKER B.J., EWALT D.R., OLSEN S.C. & JENSEN A.E. (2003). Evaluation of the *Brucella abortus* species specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella AMOS* polymerase chain reaction assay for cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **15**, 374–378.
- BRICKER B.J. & HALLING S.M. (1995). Enhancement of the Brucella AMOS PCR assay for differentiation of Brucella abortus vaccine strains S19 and RB51. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 1640–1642.
- EWALT D.R. & BRICKER B.J. (2000). Validation of the abbreviated AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of Brucella abortus field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51. *J. Clin Microbiol.*, 38, 3085–3086.
- EWALT D.R. & BRICKER B.J. (2003). Identification and differentiation of Brucella abortus field and vaccine strains by BaSS-PCR. In: *Methods in Molecular Biology, Volume 216: PCR Detection of Microbial Pathogens: Methods and Protocols*, Saches K. & Frey J., eds. Humana Press, Totowa, NJ, OCAMPO-SOSA A.A., AGÜERO-BALBÍN J. & GARCÍA-LOBO J.M. (2005). Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. *Vet. Microbiol.*, **110**, 41–51. USA, 97–108.





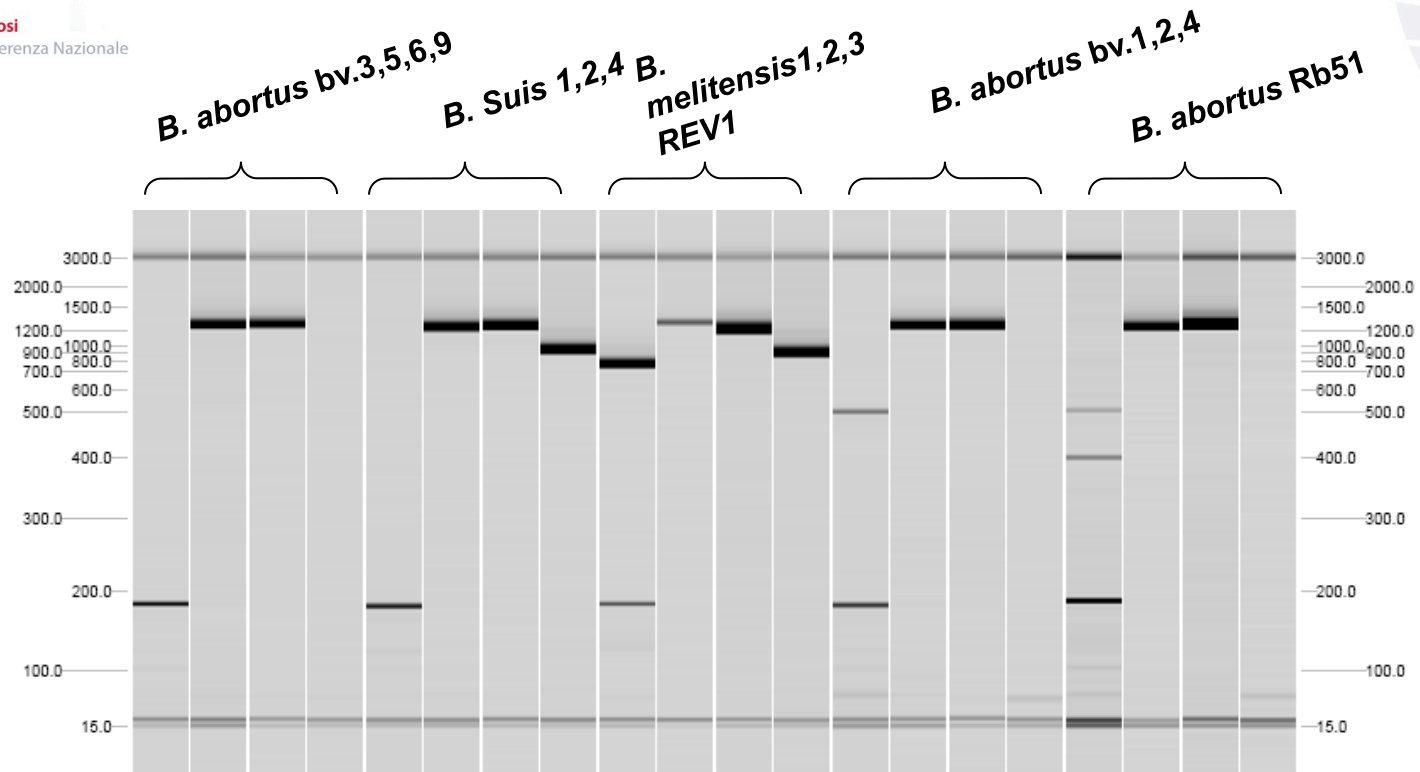
ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO



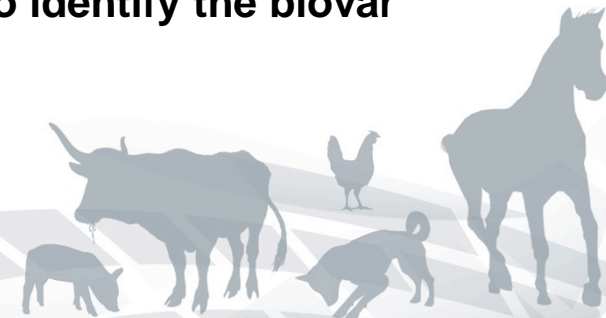
CRN Brucellosi

Centro di Referenza Nazionale

PCR products derived from different *Brucella* strains by using A.M.O.S., Omp2a, Omp2b, Omp31 primers



positive results for PCR A.M.O.S. *Brucella* → RFLP to identify the biovar





ISTITUTO G. GALVANI REGIONALE
TERAMO

CRN Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)-Identification of biovar

- Amplificazione Omp 2a e Omp 2b
- Amplificazione Omp 31
- Digestione con enzimi di restrizione

Species	Omp 2a	Omp 2b	Omp 31
B.abortus	Hinf 1	Taq 1	
B.melitensis	Pst 1	Hinf 1	
B.suis	Nco1		Ava 2



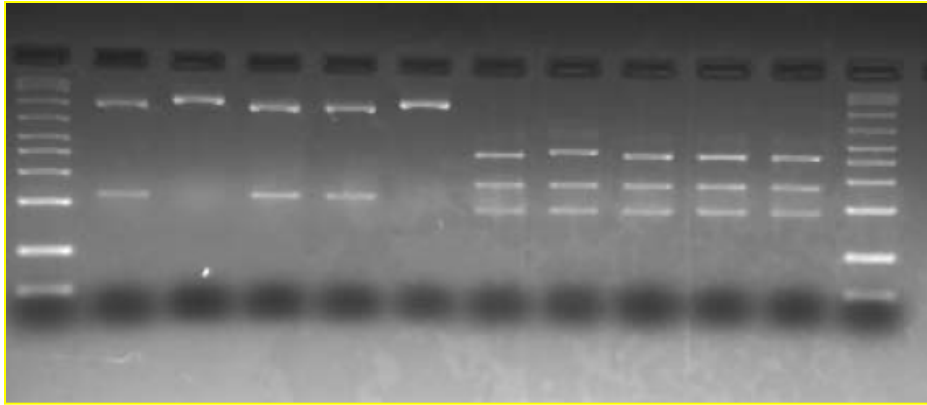


ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM

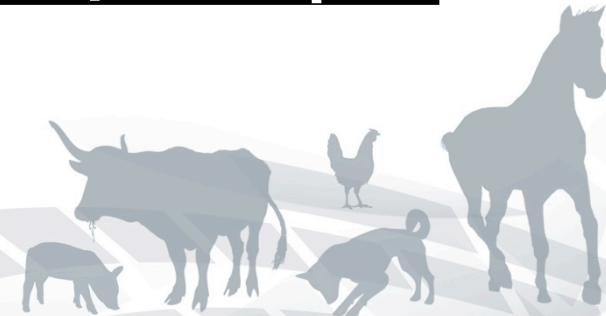
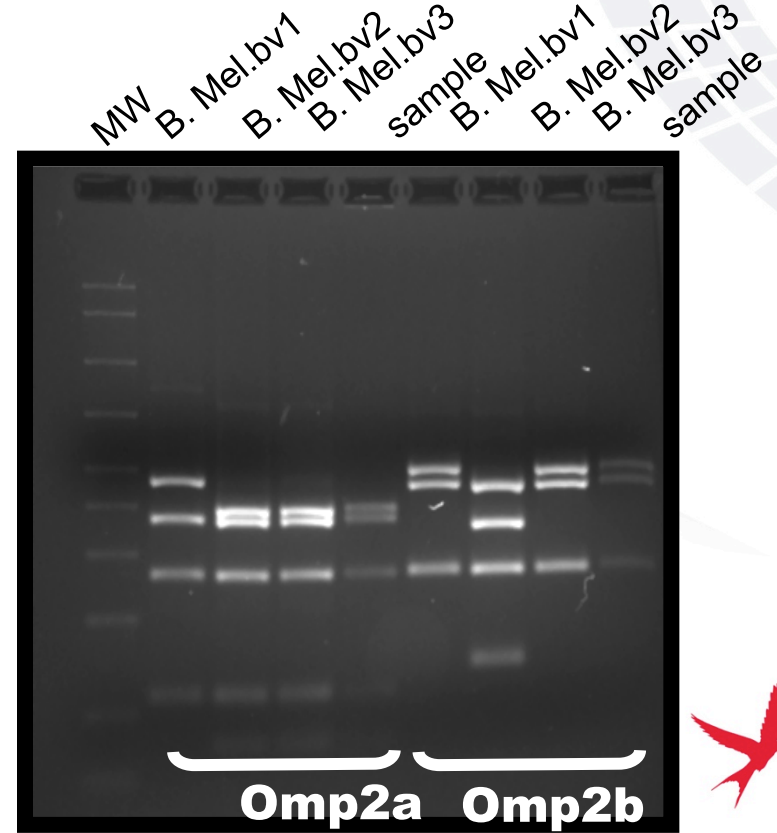
 **CRN Brucellosi**
Centro di Riferenza Nazionale

M W
B. Suis bv. 1
B. Suis bv. 2
B. Suis bv. 3
B. Suis bv. 4
B. suis bv.5
B. Suis bv. 1
B. suis bv.2
B. Suis bv. 3
B. Suis bv., 4
B. Suis bv. 5
M W



Omp2a

Omp31



Clusters

B. abortus bv.3,5,6,9

B. abortus bv.1,2,4

B. suis 1,3,4

B. suis bv.2,5



Prove differenziali



Prove aggiuntive per i clusters

- ❖ Richiesta di CO₂ per la crescita
- ❖ Agglutinazione su vetrino con anti-A, anti-M and anti-R monospecific sera
- ❖ Produzione di H₂S
- ❖ Crescita in agar fucsina basica e tionina (20µg/ml)





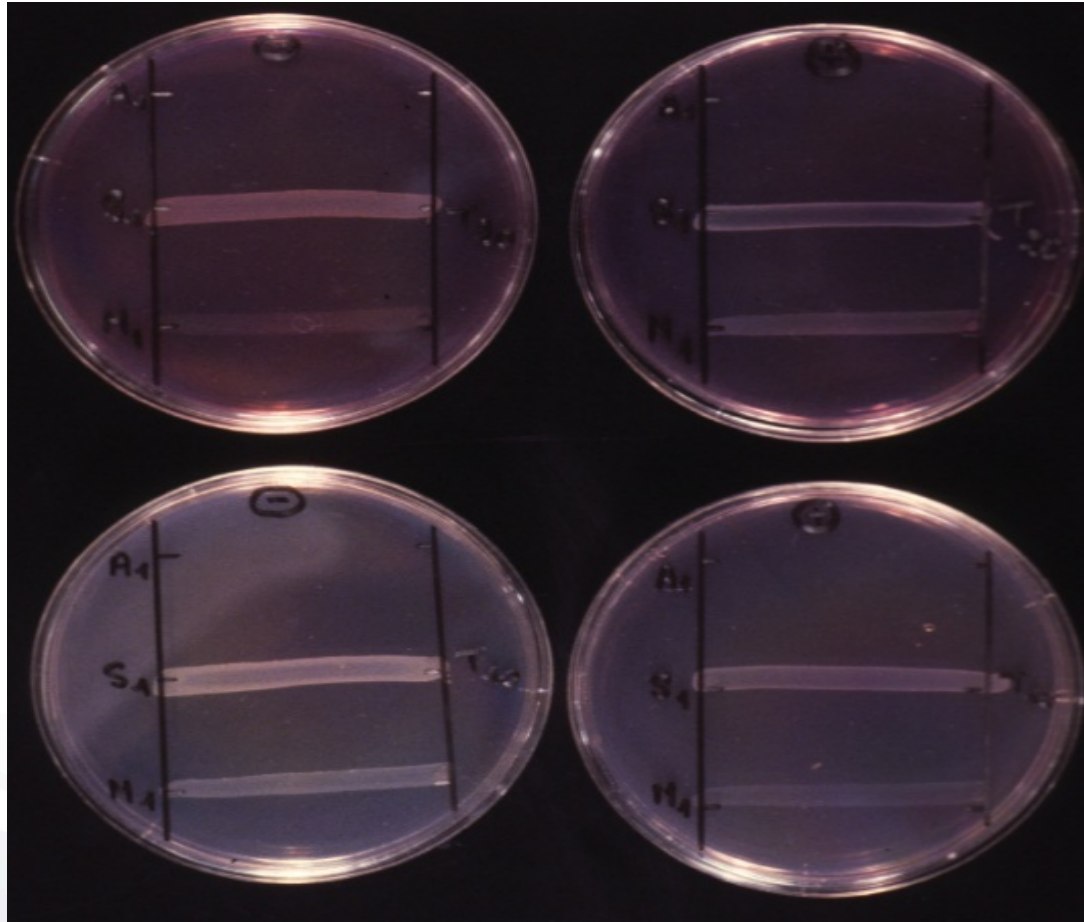
ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO



CRN Brucellosi

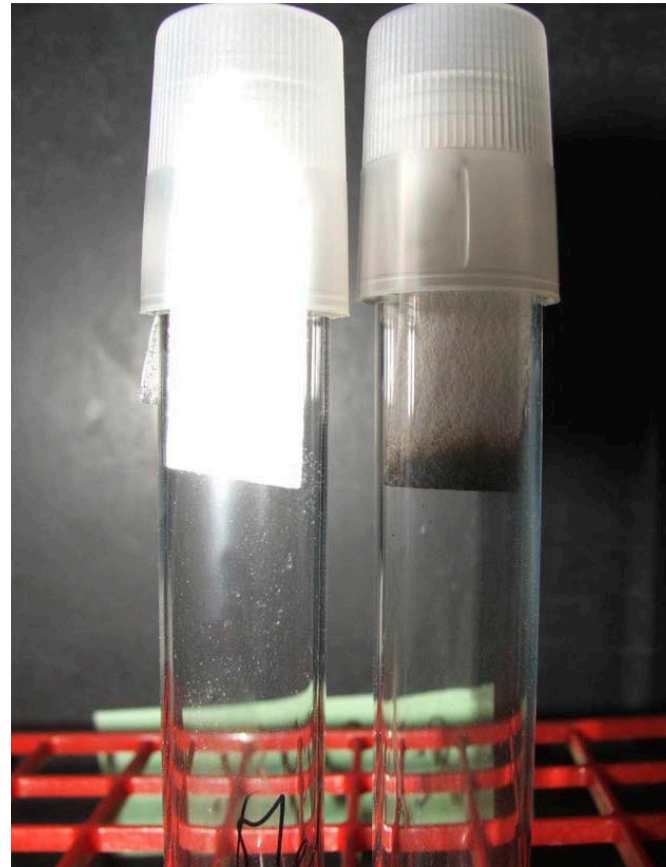
Centro di Referenza Nazionale

Crescita su tionina a fucsina agar



Rilevazione di H₂S

Con cartine di acetato di
piombo
(x3 giorni consecutivi)

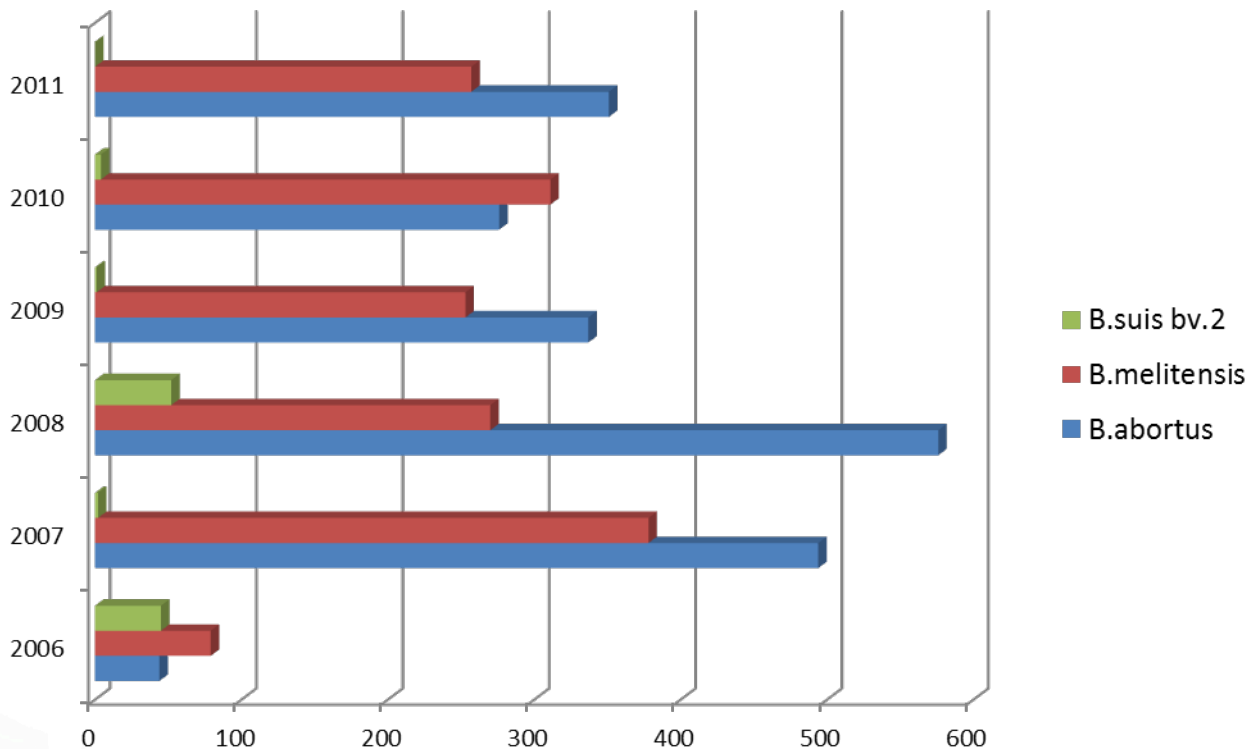




ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Specie di Brucella identificate in Italia (2006-2011)

 **CRN Brucellosi**
Centro di Riferenza Nazionale



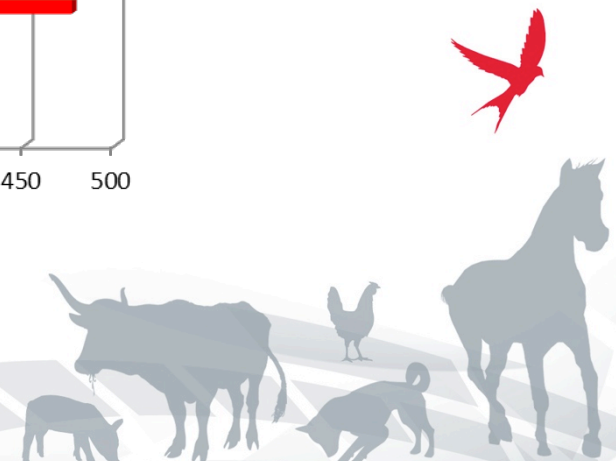
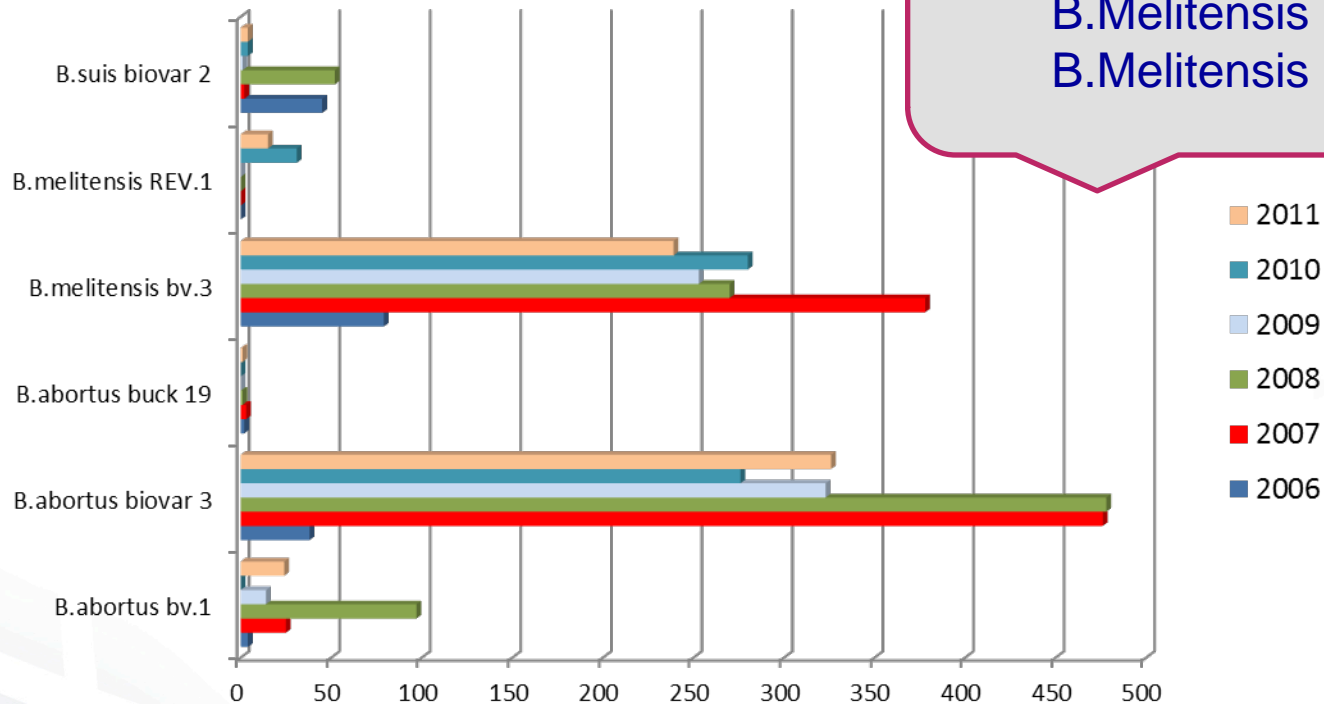
Numero di ceppi



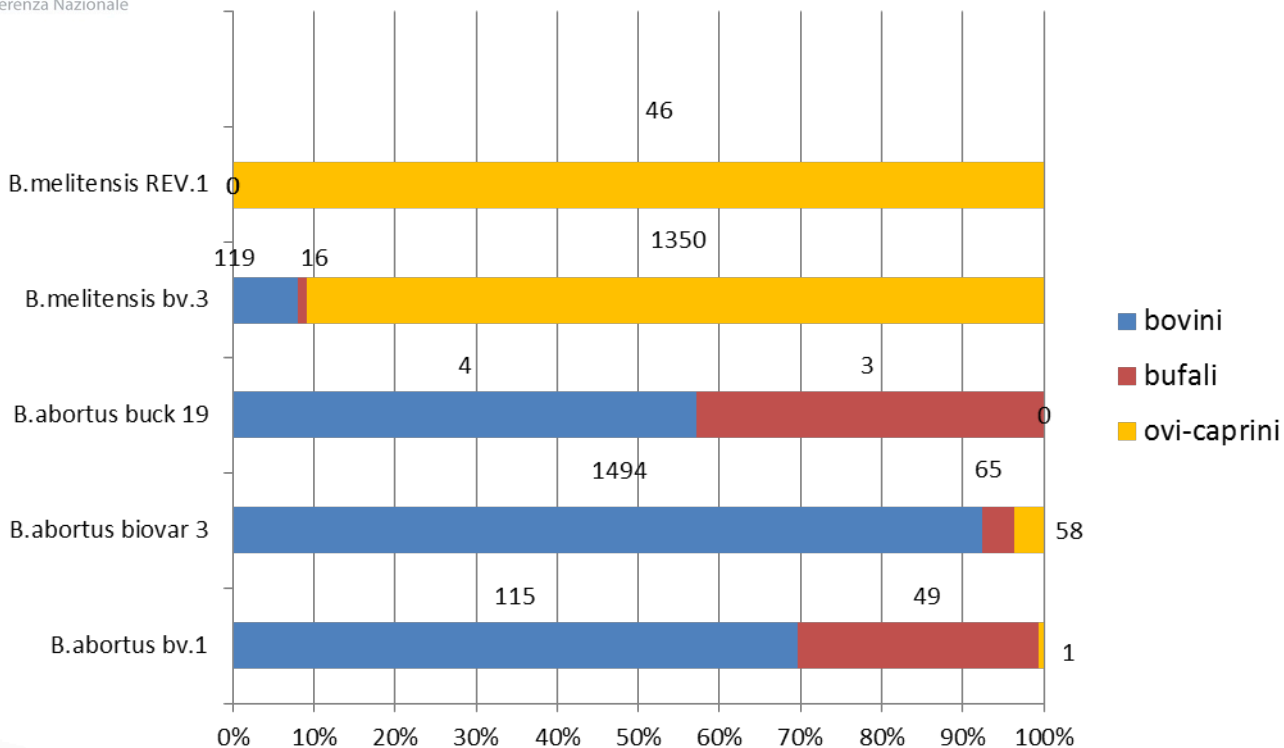
Brucella biovars identificate in Italia (2006-2011)

 **CRN Brucellosi**
Centro di Referenza Nazionale

2011
B.Melitensis bv 1
B.Melitensis bv 2



Distribuzione Brucella in animali

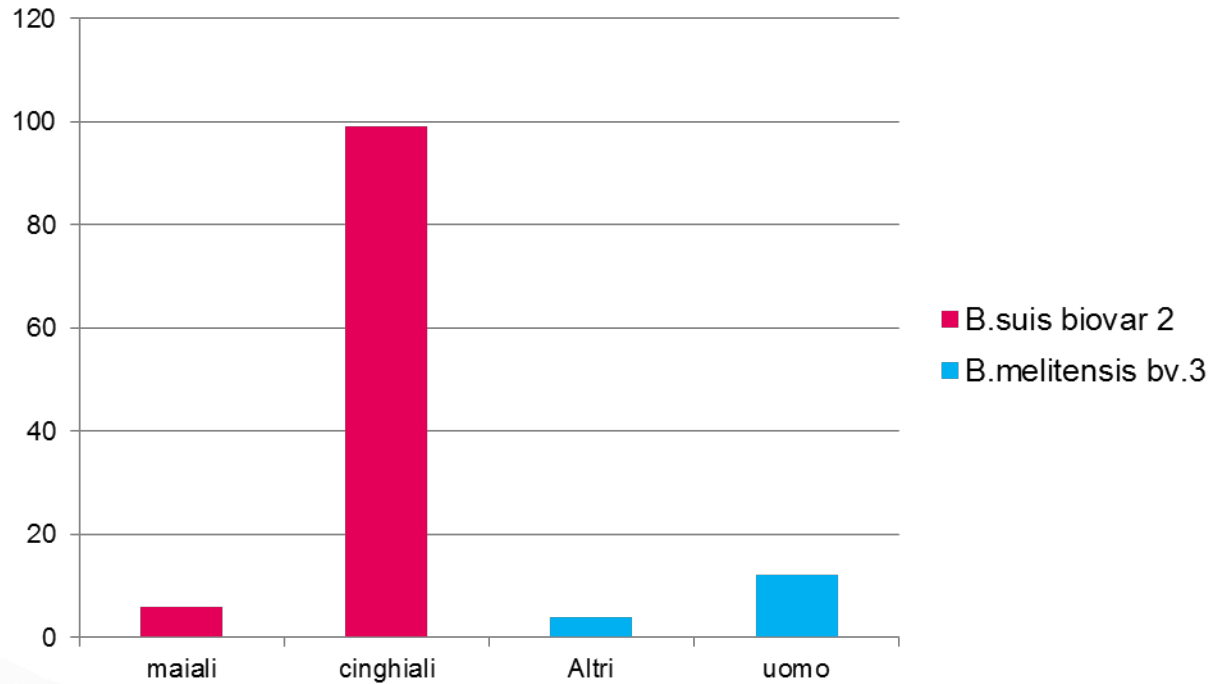




ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

 **CRN Brucellosi**
Centro di Riferenza Nazionale

Cinghiali, maiali, uomo , altri



Distribuzione geografica dei ceppi di brucella isolati da bovini e bufali in Italia (2006-2011)



ISTITUTO NAZIONALE
TERAMO

CRN Brucellosi
Centro di Riferimento Nazionale



Marche
Bovini
B. abortus biov. 3

Lazio
Bovini
B. abortus biovar 1
B. abortus biovar 3
B. melitensis biovar 3

Campania
Bovini
B. abortus biovar 1
B. abortus biovar 3
B. melitensis biovar 3
Bufali
B. abortus biovar 1
B. abortus biovar 3
B. melitensis biovar 3

Sicilia
Bovini
B. abortus biovar 1
B. abortus biovar 3

Lombardia-Emilia-Romagna
Bovini
B. abortus biovar 3

Abruzzo
Bovini
B. abortus biovar 3
B. melitensis biovar 3

Molise
B. abortus biovar 3
B. melitensis biovar 3
B. abortus biovar 1

Puglia
Bovini
B. abortus biovar 1
B. abortus biovar 3
B. abortus buck 19
B. melitensis biovar 3
Bufali
B. abortus biovar 3

Calabria
B. abortus biovar 1
B. abortus biovar 3
B. melitensis biovar 3

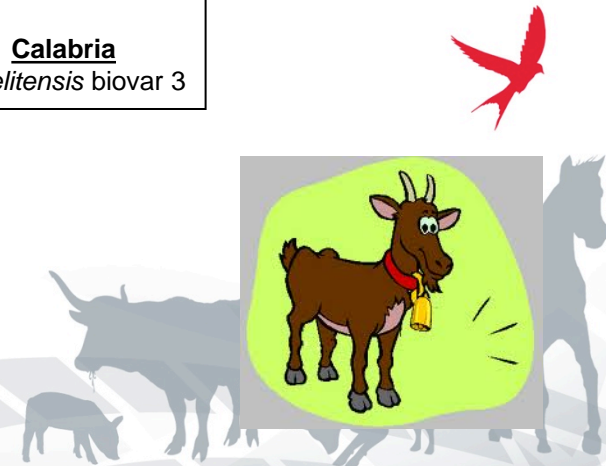
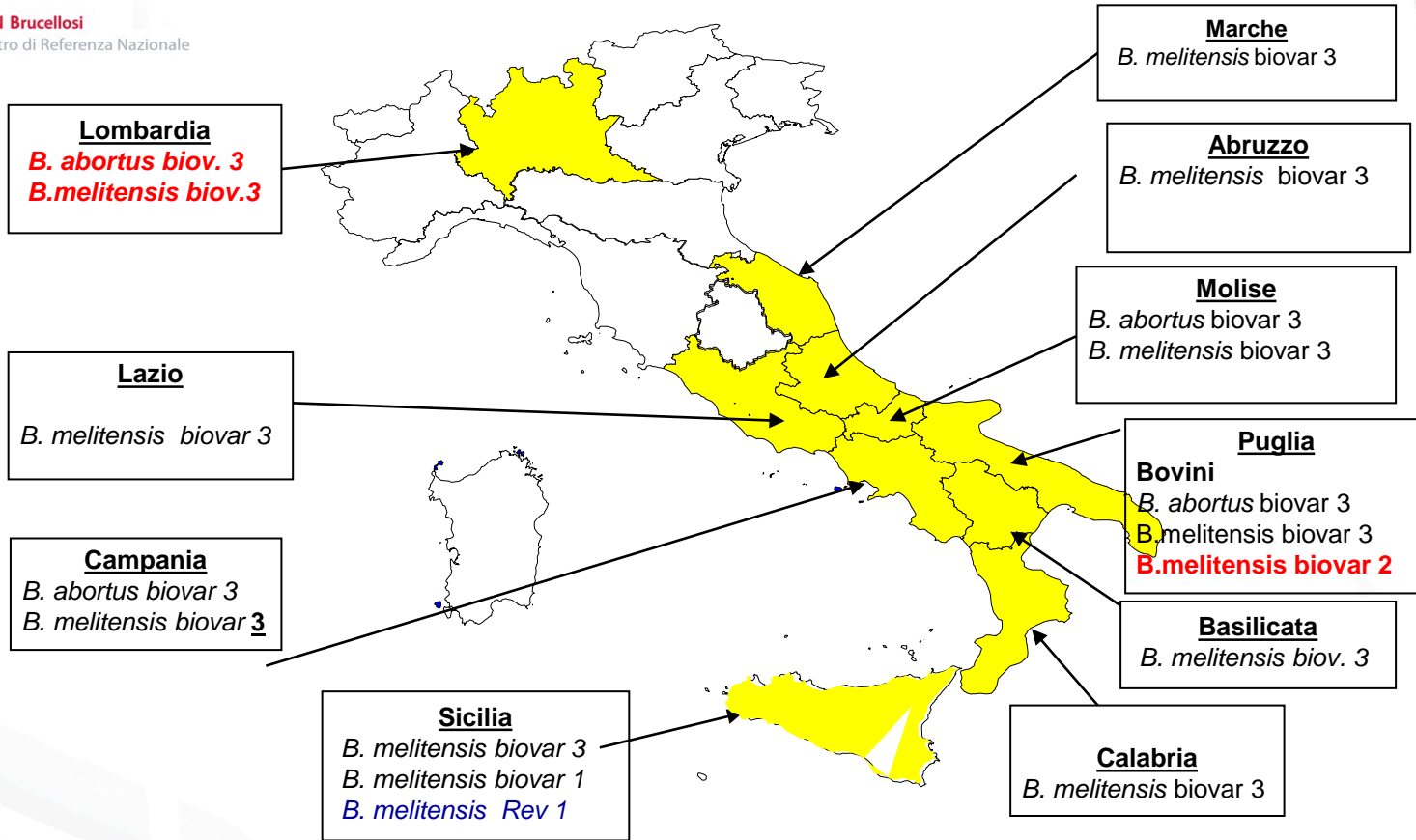




ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Distribuzione geografica dei ceppi di Brucella isolati da pecore e capre in Italia (2006-2011)

 **CRN Brucellosi**
Centro di Referenza Nazionale

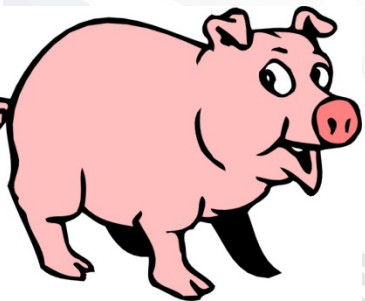
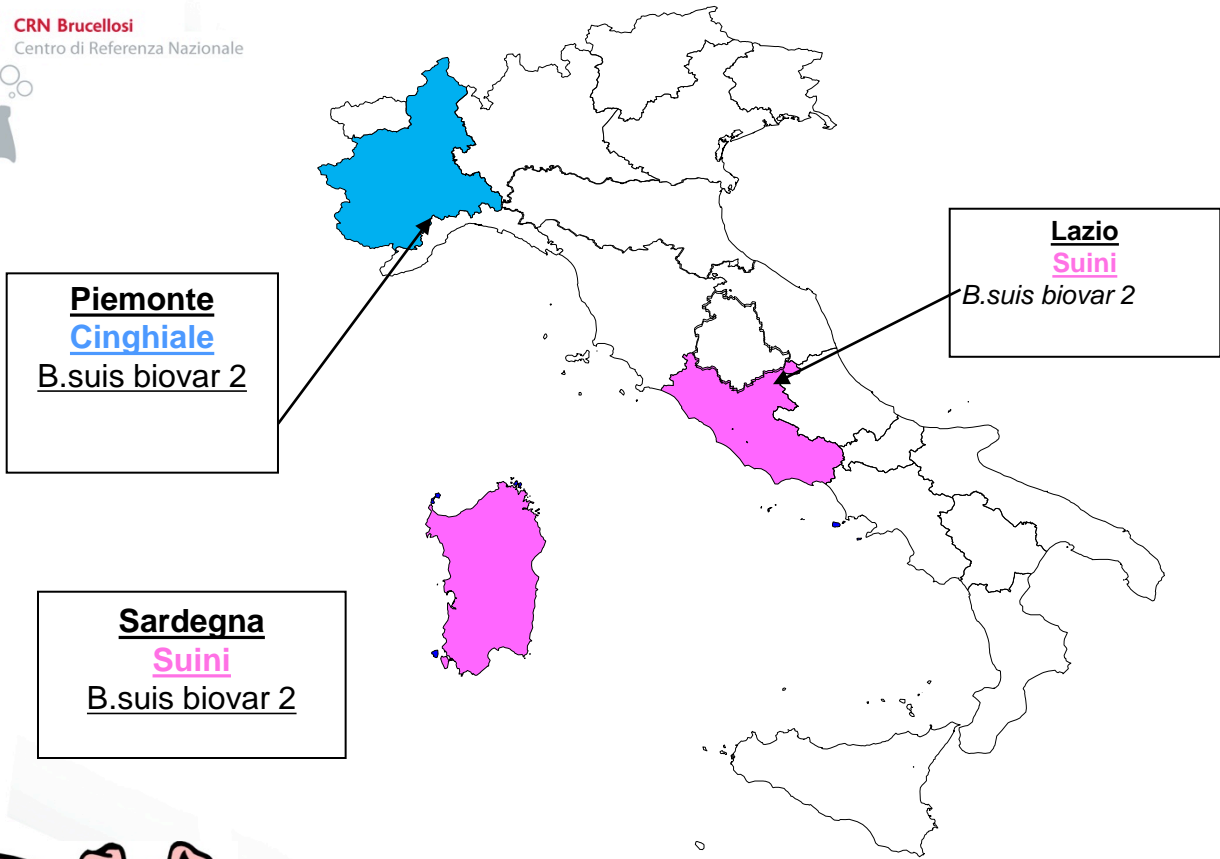




ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Distribuzione geografica dei ceppi di Brucella isolati da maiali e cinghiali in Italia (2006-2011)

 **CRN Brucellosi**
Centro di Referenza Nazionale





ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO



Grazie per
l'attenzione

