

The logo for IZSAM G. Caporale Teramo is a large, stylized letter 'C' composed of a grid of small squares. The squares are colored in a pattern of grey, red, green, and blue, creating a sense of movement and depth. The text 'IZSAM G. CAPORALE TERAMO' is positioned to the right of the 'C' shape.

IZSAM G. CAPORALE  
TERAMO



Brucellosi

Centro di Referenza Nazionale

## BruEPIDA

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, 3 dicembre 2013

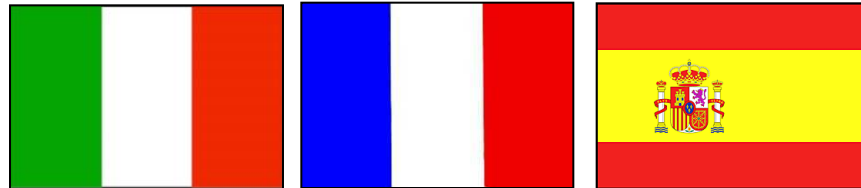
Centro Internazionale per la Formazione e l'Informazione Veterinaria "Francesco Gramenzi»





# 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**

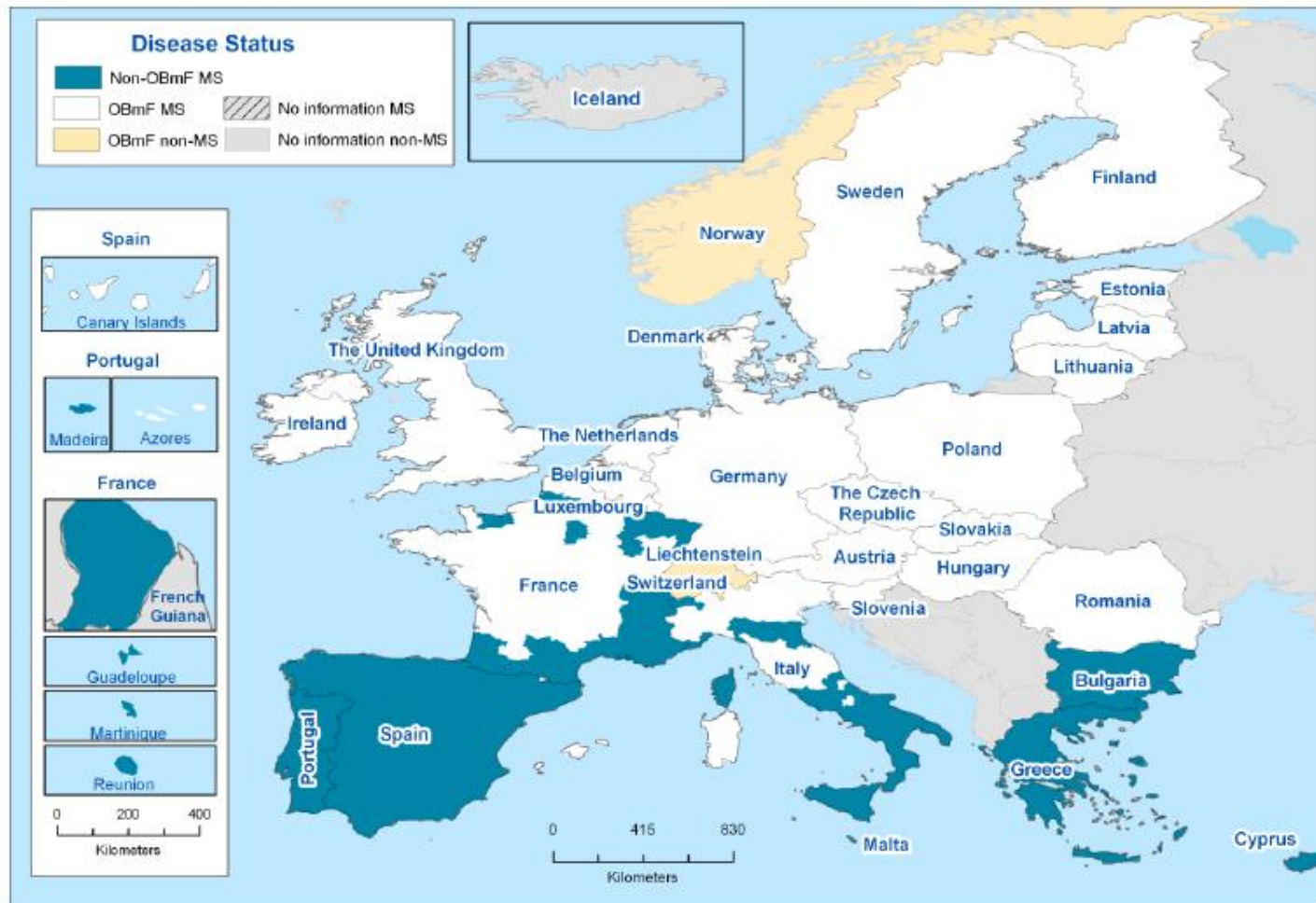
**Istituto Superiore di Sanità - Profilassi e controllo delle zoonosi batteriche - Dipartimento sanità pubblica veterinaria e sicurezza alimentare**



# B. melitensis in Europa


 Brucellosi  
 Centro di Ref

Figure BR8. Status of ovine and caprine brucellosis, 2010



# 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

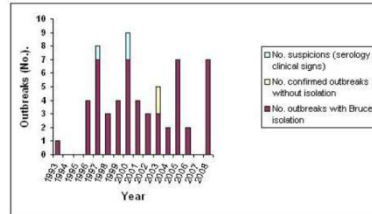
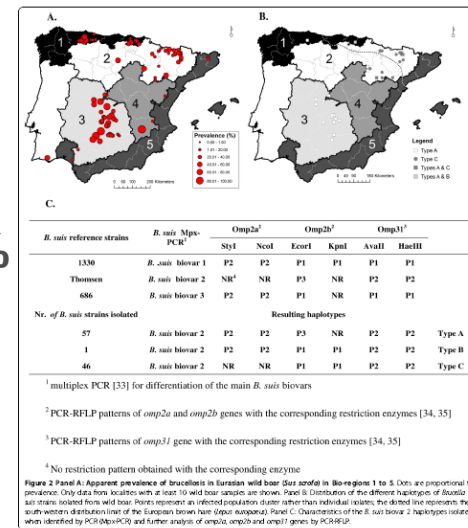


Figure 11. Outbreaks and suspicions of porcine brucellosis in France (1993-2008) (NRL data)

*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 wild ungulates., *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

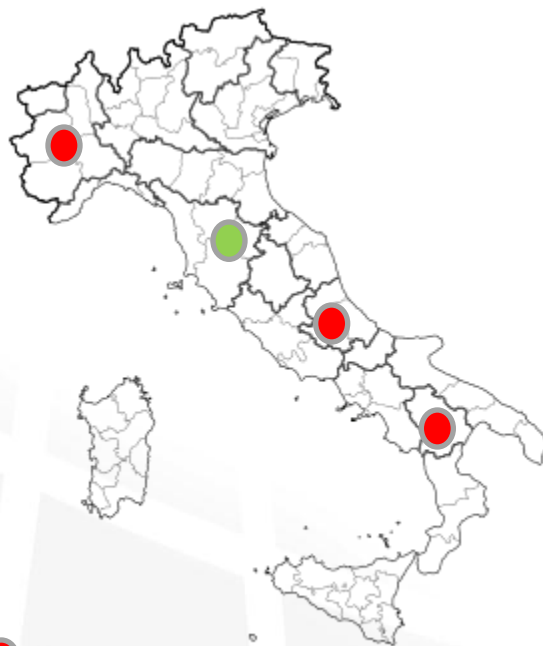
## Prevalence of *Leptospira* and *Brucella* Antibodies in Wild Boars (*Sus scrofa*) in Tuscany, Italy

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*)

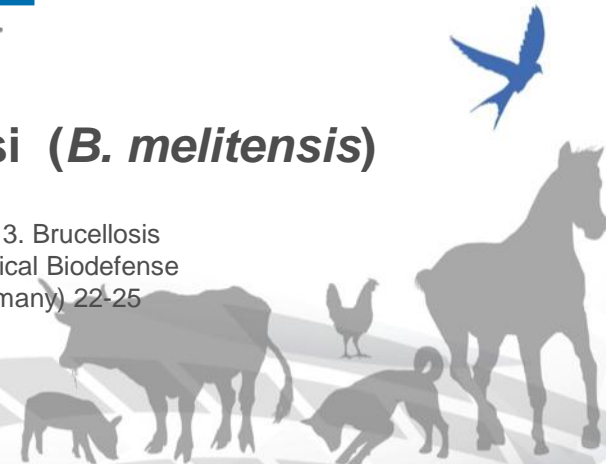
RAPID COMMUNICATIONS

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>

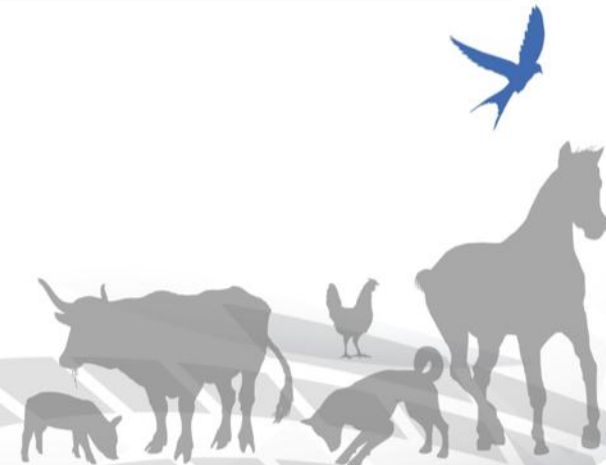
## 2012 Brucellosi in Svezia – 13 casi (*B. melitensis*)

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



# BruEPIDA 2013 (ITA-FRA-SPA)

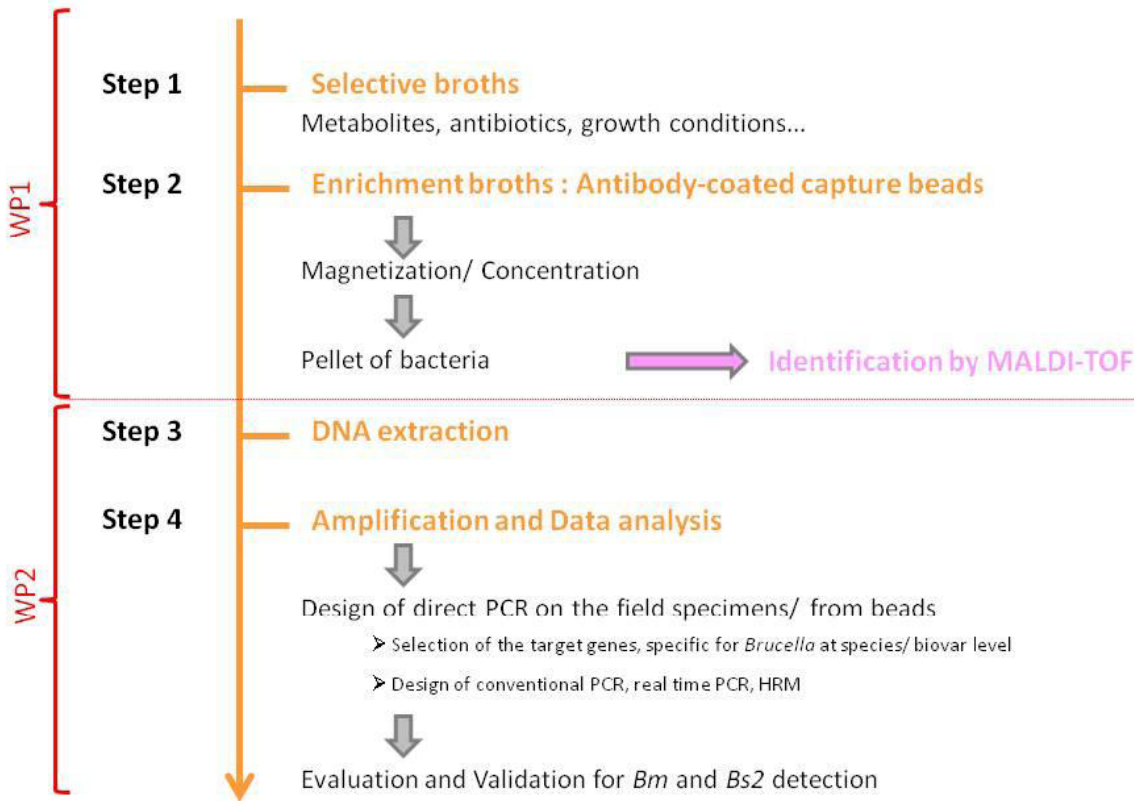
- Sviluppare un nuovo metodo di diagnosi diretto
- Sviluppare nuovi metodi molecolari PCR
- Sviluppare e perfezionare un metodo di genotipizzazione



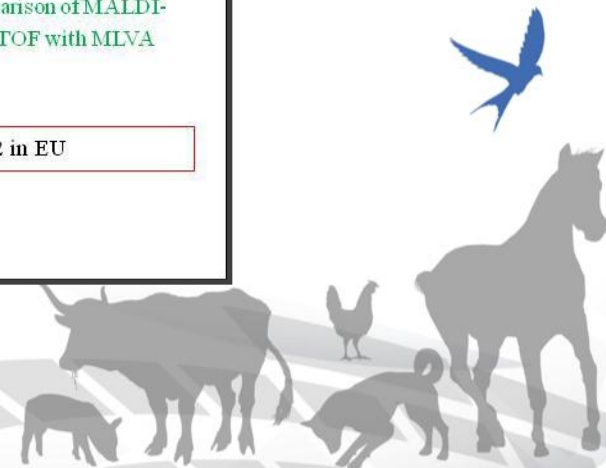
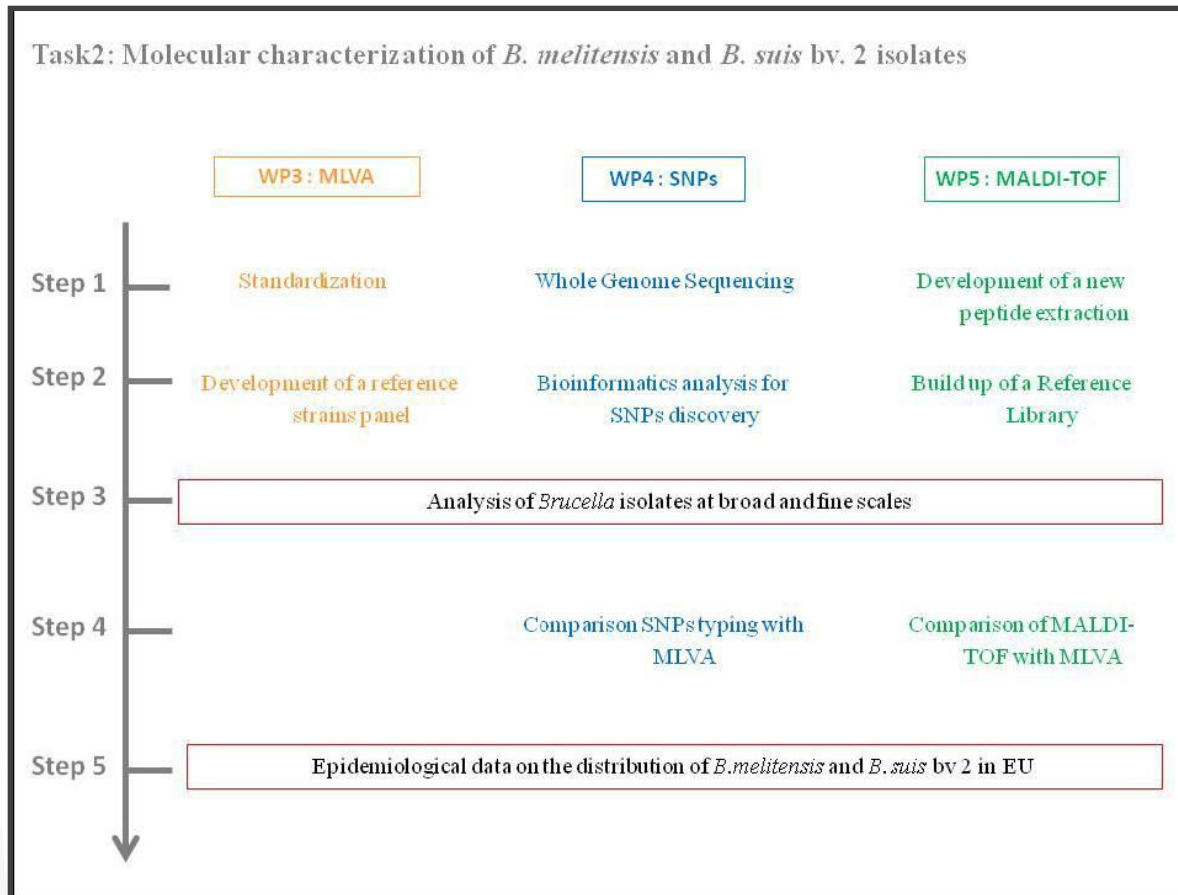


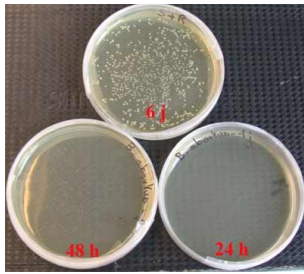
# BruEPIDA 2013 (ITA-FRA-SPA)

## Task 1: Direct Diagnosis Strategy for *Brucella*




# BruEPIDA 2013 (ITA-FRA-SPA)





# 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 inibisce meno la flora contaminante



# Diagnosi diretta WP1 e WP2

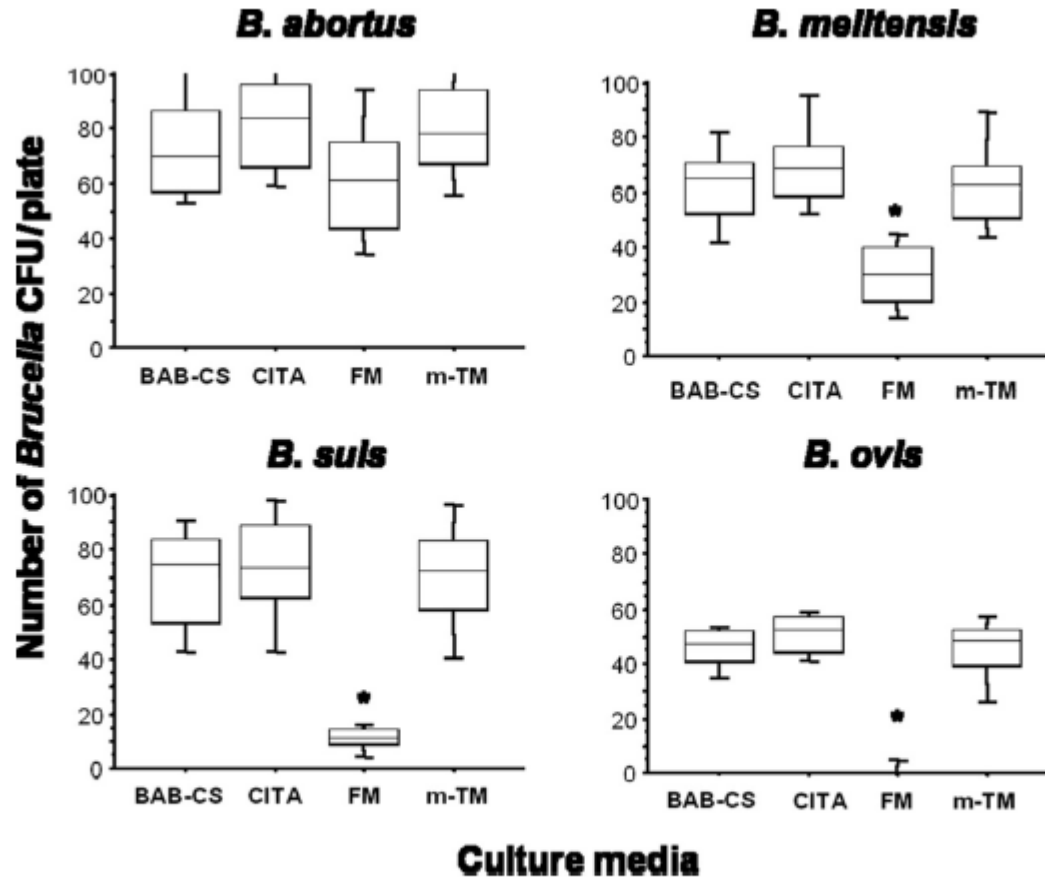




FIG. 1. Growth (number of CFU/plate) of representative *Brucella* species (see Table 1 for descriptions) on BAB-CS and three selective culture media: mTM (15), FM (15), and CITA (the new selective medium developed in this work). Statistical comparisons of means (numbers of CFU/plate) obtained for a given *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

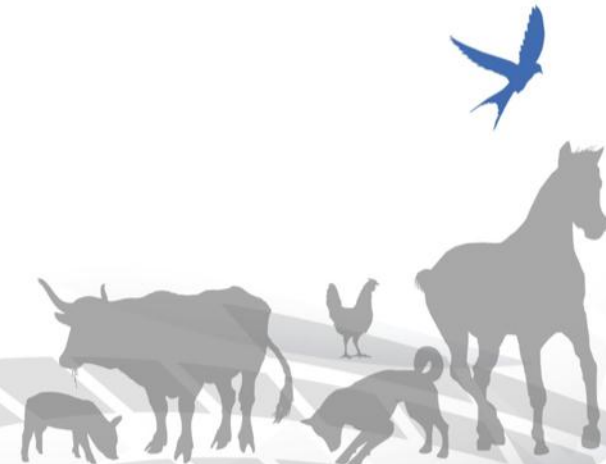
Effettuare prove di sensibilità tra i 3 laboratori

Brodo selettivo

Dynabeads sensibilizzate con LPS


PCR diretta

WP4

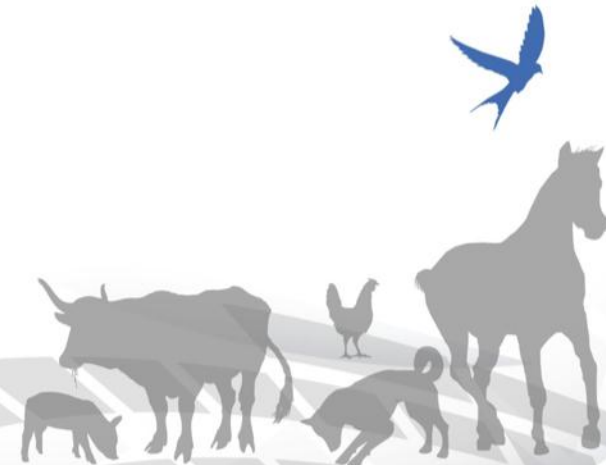


# Caratterizzazione molecolare

## WP3

- 
- 90% di identità nucleotidica tra le sei specie classiche (Hoyer e McCullough, 1968).
  - Relativamente pochi polimorfismi separano le specie, in particolare all'interno delle specie, i ceppi sono spesso difficili da distinguere.

Uno dei metodi molecolari migliori per ricercare preziose discriminazioni in Brucella è **Multi Locus Variable Number Tandem Repeat (VNTR) Analisi (MLVA)**



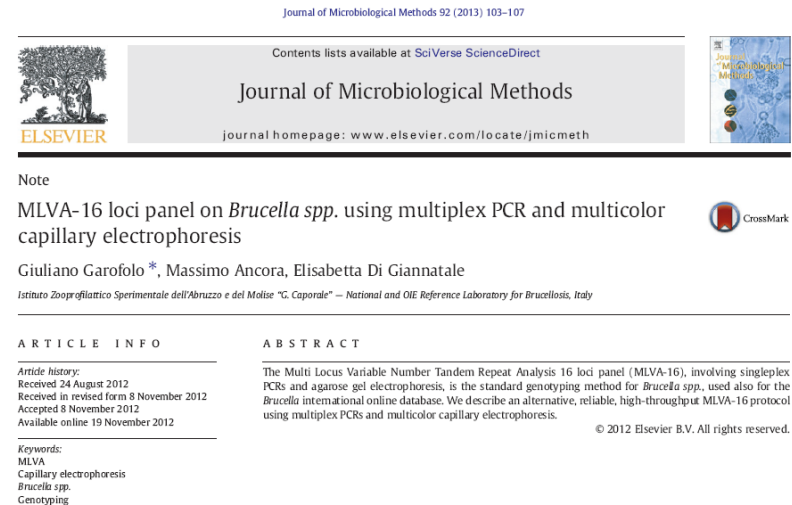
Scelta del pannello di loci

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.





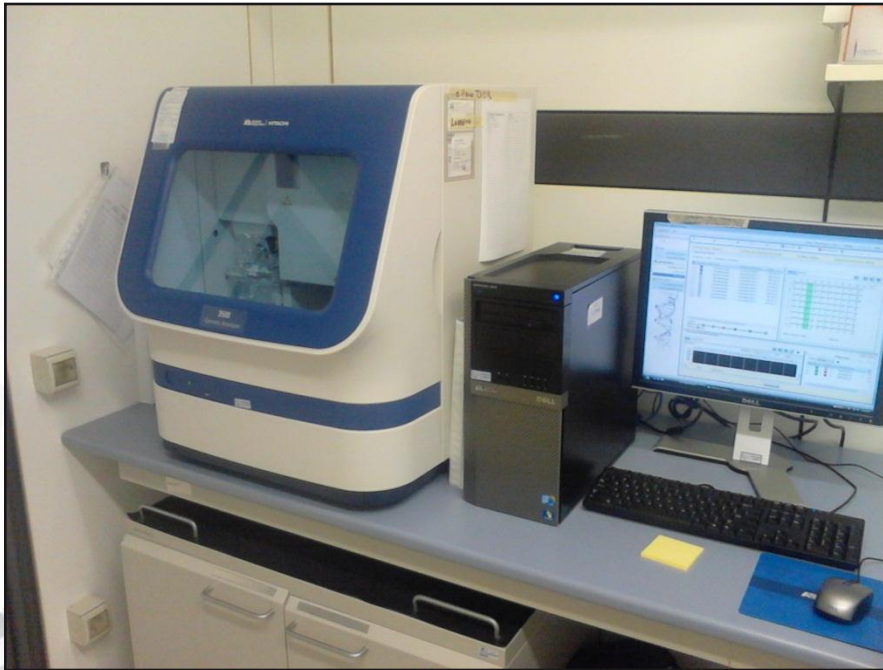


 **Brucellosi**  
Centro di Referenza Nazionale



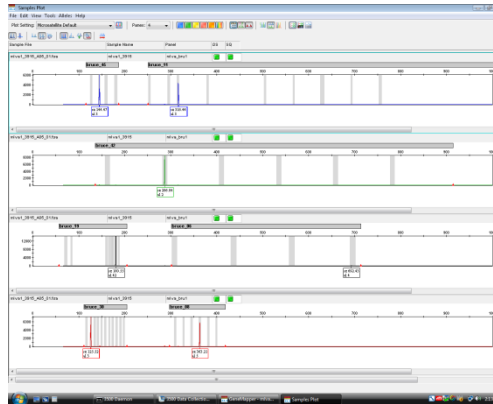
© R.G. Striano

# Workflow

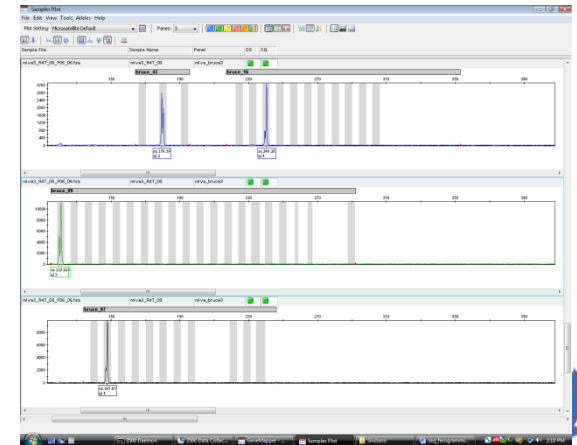
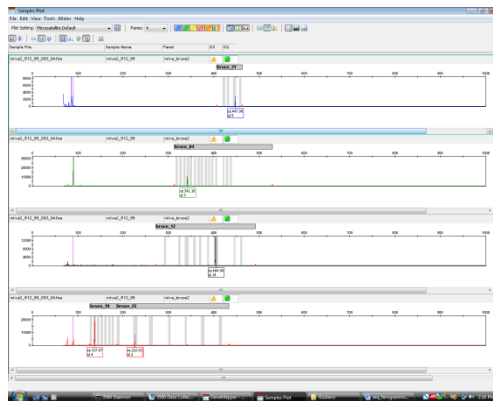


# Brucella MLVA 16 loci

 **Brucellosi**  
Centro di Referenza Nazionale



	Locus	Primer sequences (5' to 3')	PCR mix concentration	Allele size range
Multiplex 1	Bruce 30	F: PET- TGACCGCAAACCATATCCTTC R: TATGTGCAGAGCTTCATGTTCG	0,2 µM	<u>119-199</u>
	Bruce 08	F: PET- ATTATTCCGAGCTCGTGATTC R: ACAGAAGGTTTTCCAGCTCGTC	0,2 µM	<u>312-384</u>
	Bruce 11	F: 6FAM- CTGTTGATCTGACCTGCAACC R: CCAGACAACACTACGCTCTG	0,2 µM	<u>257-1076</u>
	Bruce 45	F: 6FAM- ATCTTGCCTTCCTCCACCAG R: CGGFAAATATCAATGGCTTGG	0,2 µM	<u>133-187</u>
	Bruce 19	F: NED - GAGCACCCGGACATGTCT R: ACTTCACCGTAACTGCTGGAT	0,2 µM	<u>79-205</u>
Multiplex 2	Bruce 06	F: NED - GATTGGCGGACGTTGAACT R: TAACCCGCTTCCACATAATCG	0,2 µM	<u>312-714</u>
	Bruce 42	F: VIC - CATCGCTCAACTATACCGTCA R: ACCGCAAAATTAACGCATCG	0,12 µM	<u>164-914</u>
Multiplex 3	Bruce 12	F: NED - CGGTAATCAATTTGCCCATGA R: GCCCAAGTCAACAGGAGITTC	0,2 µM	<u>302-452</u>
	Bruce 18	F: PET - TATGTAGGCAATAGGGCAGT R: GATGGTTGAGACATTTGGAAG	0,2 µM	<u>130-186</u>
	Bruce 55	F: PET - TCAGCCTTTTCGTATGTCTT R: AATCTGGGCTTCGAGTTGTCT	0,2 µM	<u>193-553</u>
	Bruce 21	F: 6FAM - CTCATGGCAACCAAAACA R: GTGGATACGCTCATCTCGTTG	0,2 µM	<u>431-463</u>
Multiplex 4	Bruce 04	F: VIC - CTGACGAGGGAAGCAATAAG R: TGGTTTTCCCAATATCAACA	0,2 µM	<u>313-473</u>
	Bruce 07	F: NED - GCTGACGGGGAAGACATCTAT R: ACCCTTTTCAGTCAAGGCAA	0,2 µM	<u>134-246</u>
	Bruce 09	F: VIC - GCGGATTTGTTCTCAGTTATC R: GGGAGTATGTTTGGTTGTACATAG	0,2 µM	<u>124-292</u>
	Bruce 43	F: 6FAM - TCTCAAGCCGATATGGAGAAT R: TATTTTCCGCTGGCCATAAAC	0,2 µM	<u>170-194</u>
	Bruce 16	F: 6FAM - ACGGGAGTTTTGTGTCTAAT R: GGCCATATCTTCCGCAATA	0,2 µM	<u>227-353</u>



# GoeBURST alghorithm PHYLOVIZ 1.0

Per rappresentare le possibili relazioni evolutive tra i vari ceppi identificati da profili allelici utilizzando l'algoritmo goeBURST, che è un perfezionamento dell'algoritmo eBURST, che E la sua espapermette di generare Minimun spanning tree(MST).  
Il software è free.



Francisco AP, Vaz C, Monteiro PT, Melo-Cristino J, Ramirez M, Carrico JA. PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. BMC Bioinformatics 2012;13:87



# Analisi Cluster NJ or UPGMA



PAUP\*

Sinauer Associates, Inc. Publishers  
Sunderland, Massachusetts



PAUP

## PAUP\* Version 4

...tools for inferring  
and interpreting  
phylogenetic trees

Analyze

- ♦ Molecular sequences
- ♦ Morphological data
- ♦ Other data types

Using

- ♦ Maximum likelihood
- ♦ Parsimony
- ♦ Distance methods



Profili allelici



## Panel manager Stabilire bin per tutti i loci

<http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/>

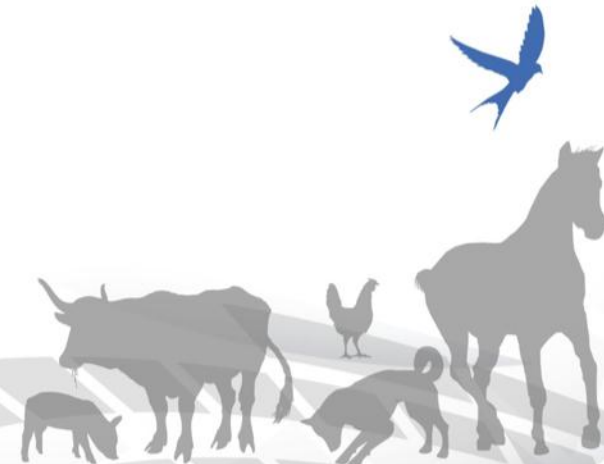
**Brucella**

[Creation date: 2013-04-02 16:11:24](#)

Contributing database	Creator	Strains Number	Creation Date	Last Modification
Brucella_in_silico	Christophe Tourterel	<u>18</u>	2013-05-15 15:08:20	2013-05-15 14:08:20
<input checked="" type="checkbox"/> Brucella_ITALIA_1	Giuliano Garofolo	<u>208</u>	2013-06-11 14:52:41	2013-09-19 16:36:24
<input checked="" type="checkbox"/> Brucella_Portugal	Cristina Ferreira	<u>181</u>	2013-06-11 14:53:42	2013-06-12 08:16:09
<input checked="" type="checkbox"/> Brucella2013	Gilles Vergnaud	<u>170</u>	2013-11-06 11:30:09	2013-11-06 11:44:47
<input checked="" type="checkbox"/> Brucella2012	Gilles Vergnaud	<u>1597</u>	2013-11-07 10:34:05	2013-11-07 10:44:47

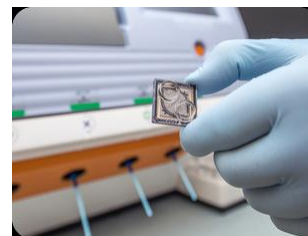
**Reverse selection**

[Coordinated by: Christophe Tourterel](#)



# 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

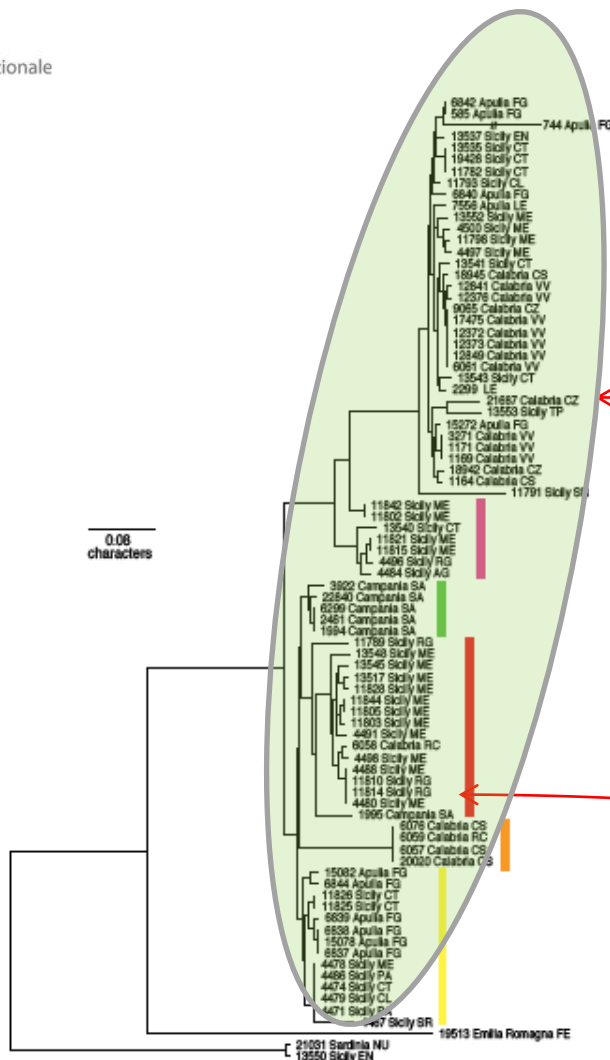


**MLST MLVA RFLP**



# B. melitensis MLVA vs MLST

 Brucellosi  
Centro di Referenza Nazionale



ST 11

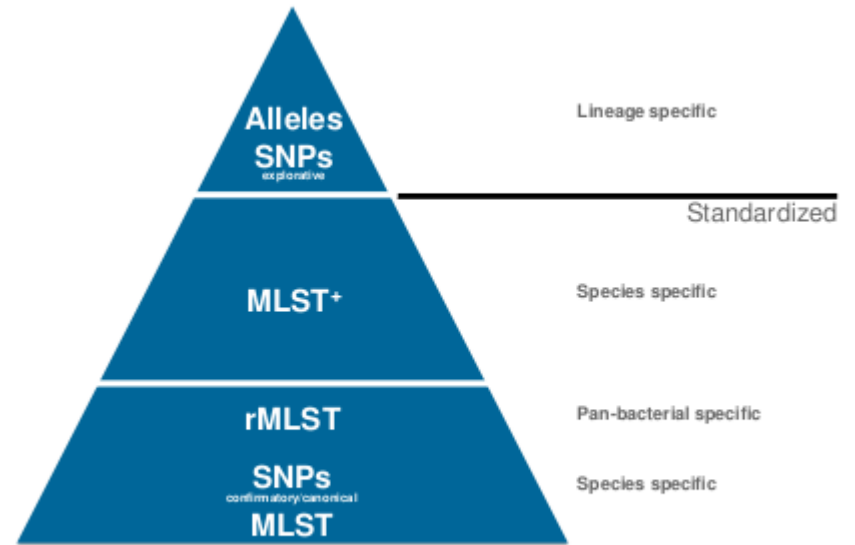
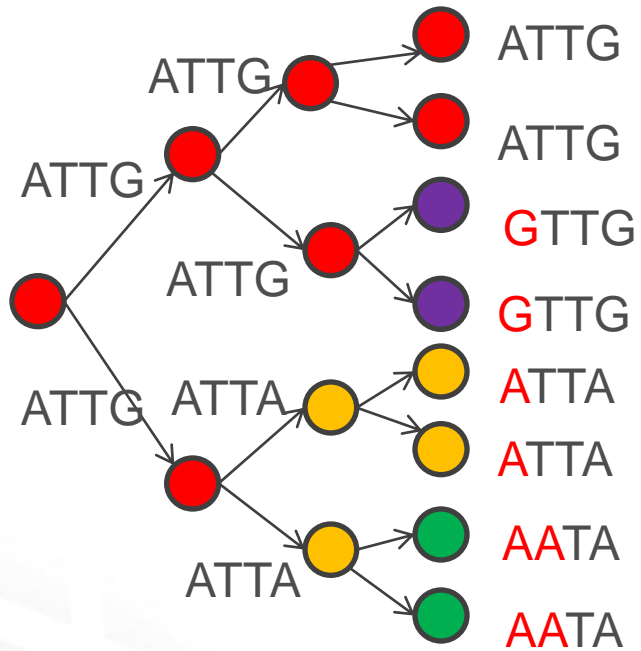
99%

ST nuovo

ST nuovo

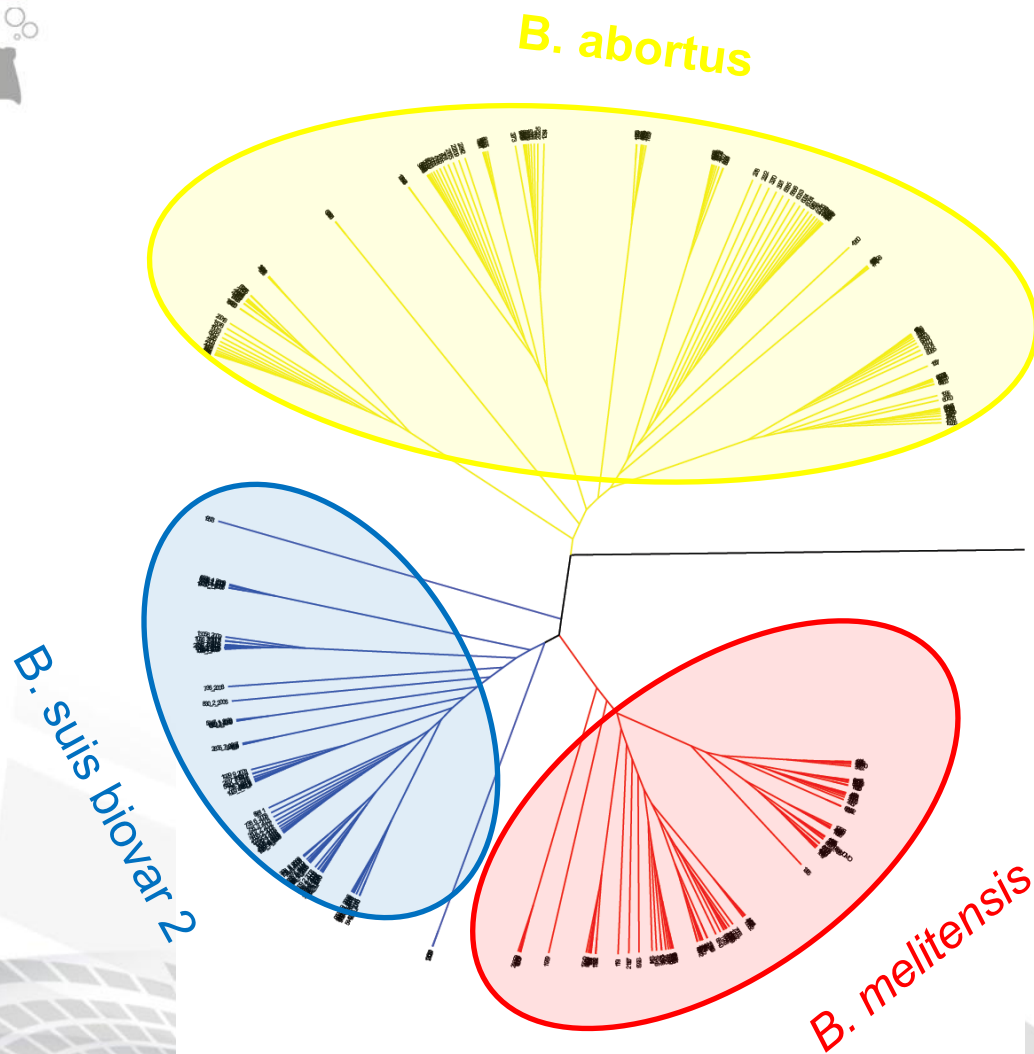
= 250 isolati





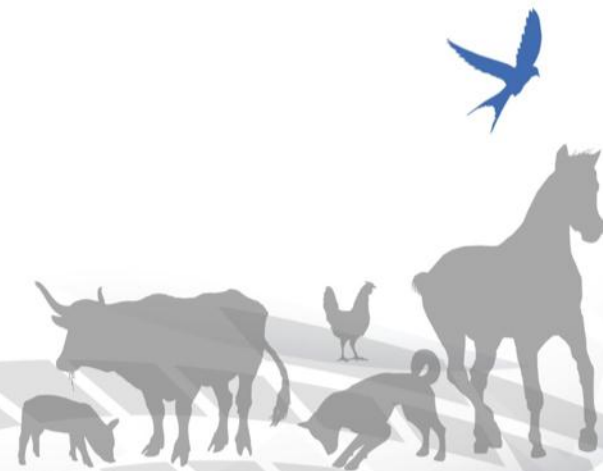


# *B. melitensis* *B. abortus* *B. suis* biovar 2



MLVA-16  
MLST

500 isolati



# B. melitensis e B. suis biovar 2



**WP4**

**WGS *B. melitensis***

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

**Standardizzazione nuovi metodi di genotipizzazione**

**Individuazione SNPs**

**Utilizzo di SNPs in saggi PCR**

**WP2**

# WP5-MALDI-TOF MS

Linear Time-of-Flight

Ion Source Region

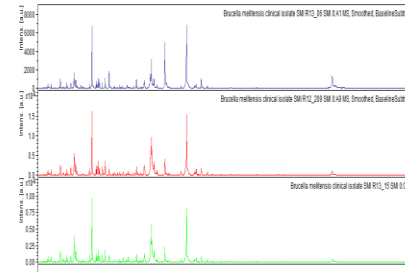
extraction lenses

sample plate

flight tube

detector

mass ● > mass ●

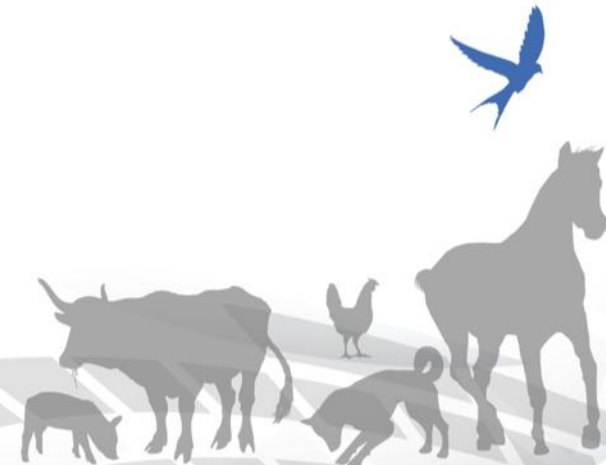


È una spettrometria di massa comunemente indicato con l'acronimo MALDI (dall'inglese Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization). La tecnica MALDI è indicata per l'analisi di composti di origine biologica quali proteine, zuccheri etc.). In microbiologia MALDI-TOF MS si basa sulla caratterizzazione dei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

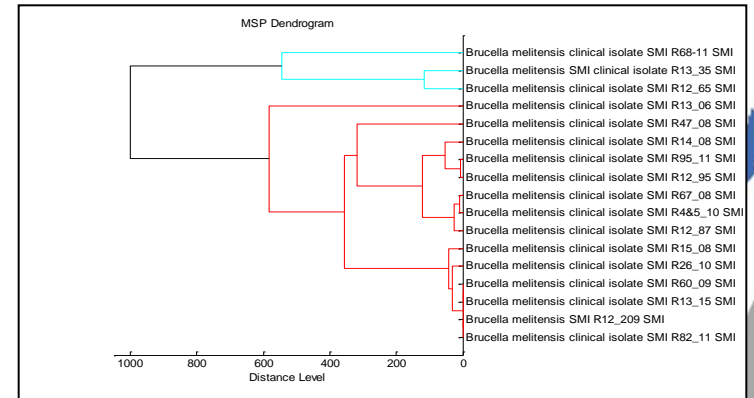
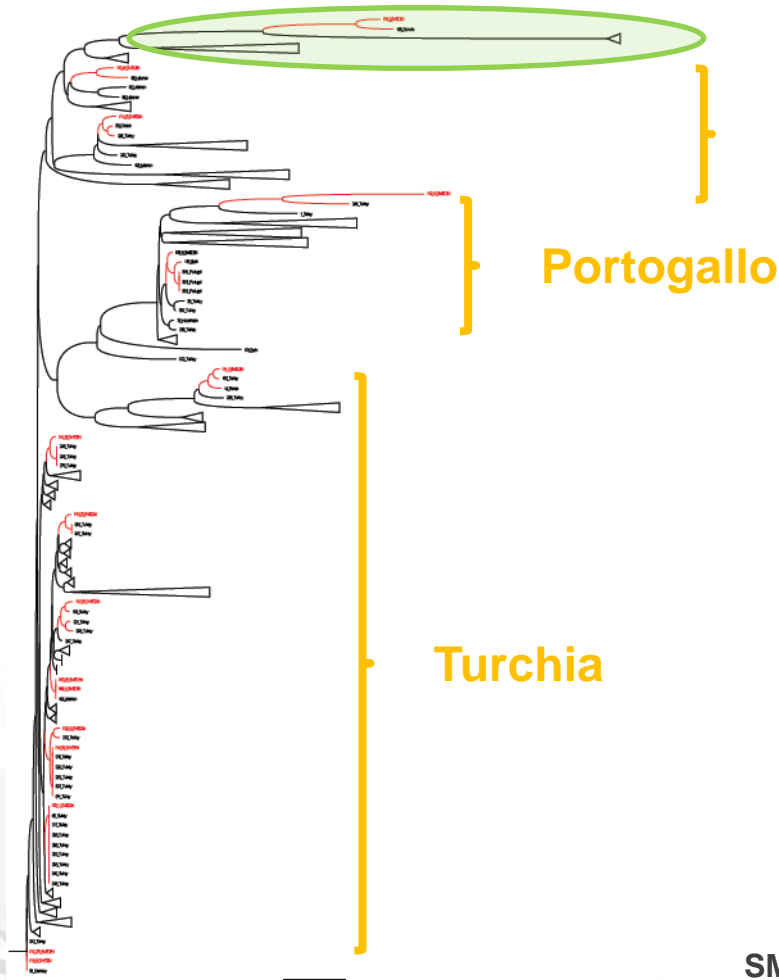


# WP5 MALDI-TOF

## MLVA vs MALDI-TOF



**13 casi brucellosi**



**800 isolati**



IZSAM G. CAPORALE  
TERAMO

 Brucellosi  
Centro di Referenza Nazionale

# RISULTATI ??

*Si ringrazia  
Elisabetta Di Giannatale  
Massimo Scacchia  
Katuscia Zilli  
Massimo Ancora  
Cesare Gammà  
Tiziana Persiani  
Lorena Sacchini  
Alessandra Alessiani  
Francesca Marotta  
Ilenia Platone  
Gabriella Di Serafinio*

## 2014-2017

*Grazie per l'attenzione*

