



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

ZOONOSI: EPIDEMIOLOGIA, SORVEGLIANZA E CONTROLLO

Focus su alcuni degli agenti zoonosici batterici più rilevanti per la Sanità Pubblica e la Sanità Pubblica Veterinaria



IZSLT– I, II, III edizione 2021

Andrea Caprioli

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DEL LAZIO E DELLA TOSCANA “M. ALEANDRI”

Unità Operativa Complessa Diagnostica Generale (U.O.C. D.O. DIG)



APPROVED: 19 January 2021

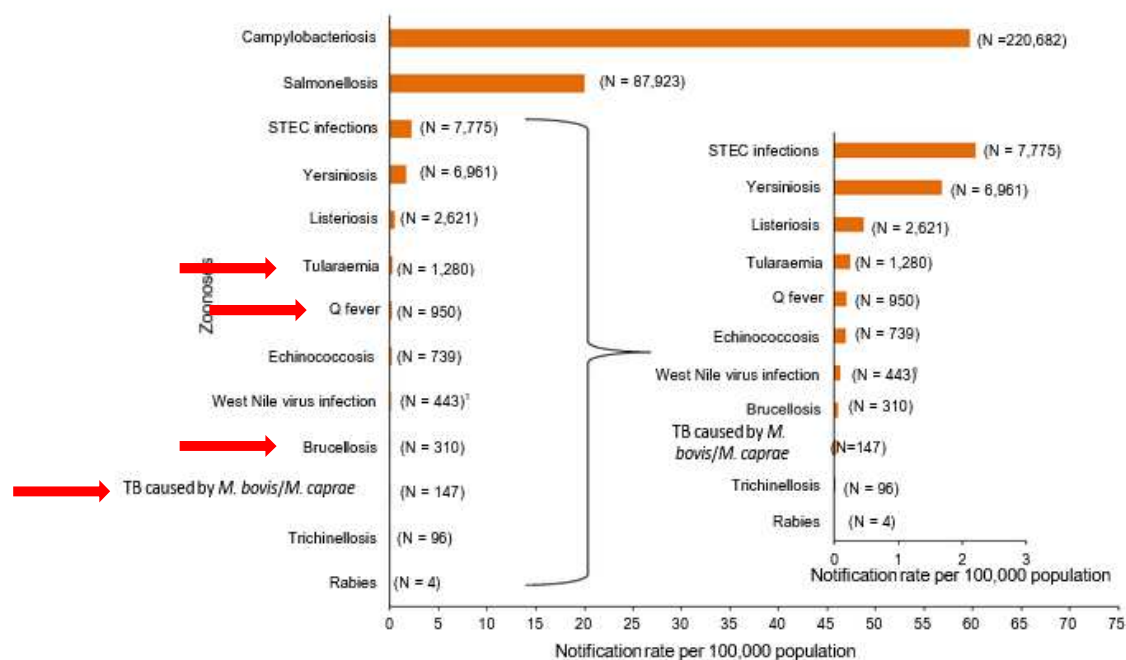
doi: 10.2903/j.efsa.2021.6406

The European Union One Health 2019 Zoonoses Report

European Food Safety Authority
European Centre for Disease Prevention and Control



EU One Health Zoonoses Report 2019



Results of zoonoses monitoring activities carried out in 2019 in **36 European countries** (28 Member States (MS) and 8 non-MS).

Note: The total number of confirmed cases is indicated between parentheses at the end of each bar.

¹ Exception: West Nile virus infection for which the total number of cases was used.

Figure 1: Reported numbers and notification rates of confirmed human zoonoses in the EU, 2019



Centro di Riferimento bi-regionale Agenti Zoonosici Speciali

Presso la sede centrale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M. Aleandri (IZSLT), all'interno della Direzione Operativa Diagnostica Generale, opera il **Centro di Riferimento bi-regionale Agenti Zoonosici Speciali** allo scopo di implementare e rendere operativo quanto disposto dalla Delibera 9 maggio 2003, n. 414 della Regione Lazio circa il potenziamento della Struttura Complessa Diagnostica Generale, in relazione agli agenti biologici zoonosici di particolare rilevanza in Sanità Pubblica Veterinaria.

<http://www.izslt.it>

File Modifica Visualizza Cronologia Segnalibri Strumenti Aiuto

avicolas@yahoo.com - Yahi... ProMED-mail B_anthraxis1.jpg (immagin... IZSLT - SIL One_Health_Triad.jpg (imm... SINVA... bacillus anthracis - Cerca c... Qualita - Istituto Zooprofilattico... Istituto Zooprofilattico Sperimen...

www.izslt.it/centri-di-riferenza/centri-di-eccellenza/ 133%

Più visitati IZSLT - SIL Yahoo - accesso Skype Sistema Informativo V...


I miei siti Istituto Zooprofilattico Sperimentale de... Ciao, Andrea Caprioli

QUALITÀ LINK INTERNI CONVENZIONI RICERCA FORMAZIONE INTERNA VERBALI OIV PROFILO

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

HOME AMMINISTRAZIONE DOMANDE FREQUENTI VALUTA I NOSTRI SERVIZI DOVE SIAMO CONTATTI

L'ISTITUTO
LE SEDI
CENTRI DI RIFERENZA
Centri di Riferenza Nazionali
Altri centri specialistici
SERVIZI E MODULISTICA
FORMAZIONE E BIBLIOTECA
OSSERVATORIO EPIDEMIOLOGICO
RICERCA E COOPERAZIONE INTERNAZIONALE
SICUREZZA ALIMENTARE
SANITÀ E BENESSERE ANIMALE
COMUNICAZIONE
NEWS



ALTRI CENTRI SPECIALISTICI

A livello territoriale operano centri specialistici su specifiche materie, soprattutto a valenza regionale. Rappresentano unità dove vengono svolte attività specialistiche in settori individuati dalle amministrazioni regionali o dagli istituti stessi.

Presso la sede di Roma dell'Istituto sono presenti i seguenti centri riconosciuti dalla Regione Lazio:

- Centro di Riferimento regionale per gli Enterobatteri Patogeni
- Osservatorio Epidemiologico Veterinario Regionale
- Centro Studi per la Sicurezza Alimentare
- Centro di Riferimento Agenti Zoonosici Speciali**

Sono inoltre presenti le seguenti unità specialistiche

- Il Centro di Medicina Integrata Veterinaria presso la sezione di Arezzo
- L'Unità operativa di Apicoltura presso la sede di Roma
- Laboratorio di Ittiopatologia ed acquacoltura, presso la sezione di Pisa

Indirizzo

10:19 23/10/2018

<https://www.izslt.it/agentizoonosicispeciali/>

HOME

BRUCELLOSI

TUBERCOLOSI BOVINA E BUFALINA

CARBONCHIO EMATICO (ANTRACE)

FEBBRE Q

CLAMIDIOSI/PSITTACOSI

MORVA

TULAREMIA

E. COLI VEROCITOTOSSICI (STEC O VTEC)

CAMPYLOBACTER TERMOTOLLERANTI ZOONOSICI E SALMONELLA SPP.

ALTRE ZOONOSI

SORVEGLIANZA DI AGENTI BIOLOGICI POTENZIALMENTE UTILIZZATI A FINI DI Bioterrorismo

CONTATTI

CENTRO DI RIFERIMENTO BI-REGIONALE AGENTI ZOONOSICI SPECIALI

Presso la sede centrale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M. Aleandri (IZSLT), all'interno della Direzione Operativa Diagnostica Generale, opera il **Centro di Riferimento bi-regionale Agenti Zoonosici Speciali** allo scopo di implementare e rendere operativo quanto disposto dalla Delibera 9 maggio 2003, n. 414 della Regione Lazio circa il potenziamento della Struttura Complessa Diagnostica Generale, in relazione agli agenti biologici zoonosici di particolare rilevanza in Sanità Pubblica Veterinaria.

Attribuzioni:

Il Centro di Riferimento, nell'ambito regionale di sua competenza (Regioni Lazio e Toscana), ha il compito di:

- eseguire, implementare e consolidare le attività relative alla diagnosi ed alla caratterizzazione di agenti zoonosici classificati nel gruppo di pericolo 3 (es. *Brucella spp.*, *Mycobacterium tuberculosis complex*, *Bacillus anthracis* –agente eziologico del carbonchio ematico (antrace nell'uomo)-, *Francisella tularensis* – agente eziologico della tularemia-, *E. coli verocitotossici Enteroemorragici -EHEC- come E. coli O157*, *Burkholderia mallei* –agente eziologico della morva-), anche attraverso tecniche di diagnosi e caratterizzazione biomolecolari;
- eseguire, implementare e consolidare le attività relative alla diagnosi, nelle fasi della produzione primaria, ed alla caratterizzazione di altri agenti zoonosici di maggior impatto in Sanità Pubblica Veterinaria (es. *Campylobacter zoonosici*, *Chlamydiaceae* –agenti eziologici di clamidiosi/psittacosi-, *Coxiella burnetii* –agente eziologico della Febbre Q-, *Yersinia spp.*, ceppi di *Staphylococcus aureus* particolarmente virulenti, MRSA, *Salmonella spp.*, etc.), anche attraverso tecniche di diagnosi e caratterizzazione biomolecolari approfondite per scopi di epidemiologia molecolare, tracing back, source attribution;
- fornire consulenza, supporto tecnico-scientifico ed expertise alle Autorità Competenti del Sistema Sanitario Nazionale, Regionale, Locale (Ministero della Salute, Regione, ASL) in termini di: gestione di focolai legati alle suddette infezioni, sorveglianza, valutazioni epidemiologiche e di controllo, produzione di pareri tecnico-operativi e stesura di linee guida, supporto degli obiettivi di Sanità Pubblica Veterinaria;
- collaborare e coordinarsi con gli Osservatori Epidemiologici Veterinari Regionali e con gli altri laboratori dell'IZSLT nell'ambito delle attività sopra elencate;
- perseguire un continuo adeguamento delle risorse tecnico-scientifiche, gestionali ed aggiornamento delle metodiche di laboratorio di competenza e delle Procedure Operative, secondo Standards Internazionali correnti (es. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals <http://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>);
- sviluppare e condurre attività di ricerca e di formazione-informazione sui temi/ambiti di competenza.

Il Centro di riferimento, nelle sue attività, opera a vantaggio della Sanità Animale e della Sanità Pubblica Veterinaria, in una prospettiva di "One Health", avvalendosi della collaborazione di una rete nazionale, principalmente costituita dalla rete degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IIZZSS),

Nel menu' sono riportate le specifiche attività svolte relativamente alle malattie sostenute dai singoli agenti zoonosici

Il Centro di Riferimento, nell'ambito regionale di sua competenza (Regioni Lazio e Toscana), ha il compito di:



- eseguire, implementare e consolidare le attività relative alla **diagnosi ed alla caratterizzazione di agenti zoonosici classificati nel gruppo di pericolo 3** (es. *Brucella spp.*, *Mycobacterium tuberculosis complex*, *Bacillus anthracis* –agente eziologico del carbonchio ematico (antrace nell'Uomo)-, *Francisella tularensis* – *Coxiella burnetii*, etc...

Il Centro di Riferimento, nell'ambito regionale di sua competenza (Regioni Lazio e Toscana), **ha il compito di:**

- Fornire **consulenza, supporto tecnico-scientifico ed expertise** alle Autorità Competenti del Sistema Sanitario Nazionale, Regionale, Locale (Ministero della Salute, Regione, ASL) in termini di: gestione di focolai legati alle suddette infezioni, sorveglianza, valutazioni epidemiologiche e di controllo, produzione di pareri tecnico-operativi e stesura di linee guida, supporto degli obiettivi di Sanità Pubblica Veterinaria,



Il Centro di Riferimento, nell'ambito regionale di sua competenza (Regioni Lazio e Toscana), **ha il compito di:**

- perseguire un **continuo adeguamento** delle risorse tecnico-scientifiche, gestionali ed aggiornamento delle metodiche di laboratorio di competenza e delle Procedure Operative, secondo Standards Internazionali correnti (es. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals <http://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>);
- sviluppare e **condurre attività di ricerca e di formazione-informazione** sui temi/ambiti di competenza.



Il Centro di Riferimento, nell'ambito regionale di sua competenza (Regioni Lazio e Toscana)

Nelle sue attività, opera a vantaggio della Sanità Animale e della Sanità Pubblica Veterinaria, in una prospettiva di “**One Health**”, avvalendosi della collaborazione di una rete nazionale, principalmente costituita dalla rete degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZZSS), dei Centri di Riferenza Nazionali per gli agenti batterici zoonosici, ed in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità.



Il Centro di Riferimento, nell'ambito regionale di sua competenza (Regioni Lazio e Toscana)

Gestisce, inoltre, le attività di **diagnosi diretta e di sorveglianza di agenti biologici di Classe pericolo 3 potenzialmente utilizzati a fini di bioterrorismo** (es. *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*).



Focus su alcuni degli agenti zoonosici batterici

➤ Brucellosi

➤ Tuberculosi (TBC)

Rilevanti per:

- ✓ Sanità Pubblica (zoonosi)
- ✓ Sanità animale
- ✓ Scambi e commercio nazionale ed internazionale
- ✓ Causano rilevanti danni economici

➤ In Italia soggette ad eradicazione!!! Denunciabili!

- Brucellosi: Decreto Ministeriale 15 Dicembre 1994, n. 651; Decreto Ministeriale 15 Dicembre 1992, n. 453
- Tubercolosi: Decreto Ministeriale 15 dicembre 1995, n. 592

Brucellosi

- Nell'uomo anche conosciuta come febbre ondulante, febbre maltese o febbre del Mediterraneo.
- Colpisce diverse specie animali fra cui: **bovini, ovi-caprini**, suini, cani, animali selvatici e animali marini.

Brucellosi

Distribuzione

➤ **Mondiale**

soprattutto è diffusa nei paesi del Mediterraneo, in India, Africa, nell'Asia centrale e in America Latina.

➤ **Eradicata in alcuni paesi**

Brucellosi in Europa-EFSA 2019

- Casi umani notificati in Europa **0.06 su 100.000 abitanti**, il più basso valore da quando si raccolgono i dati.
- Greece (0.61 cases per 100,000 population), Portugal (0.32), **Italy (0.08)**.

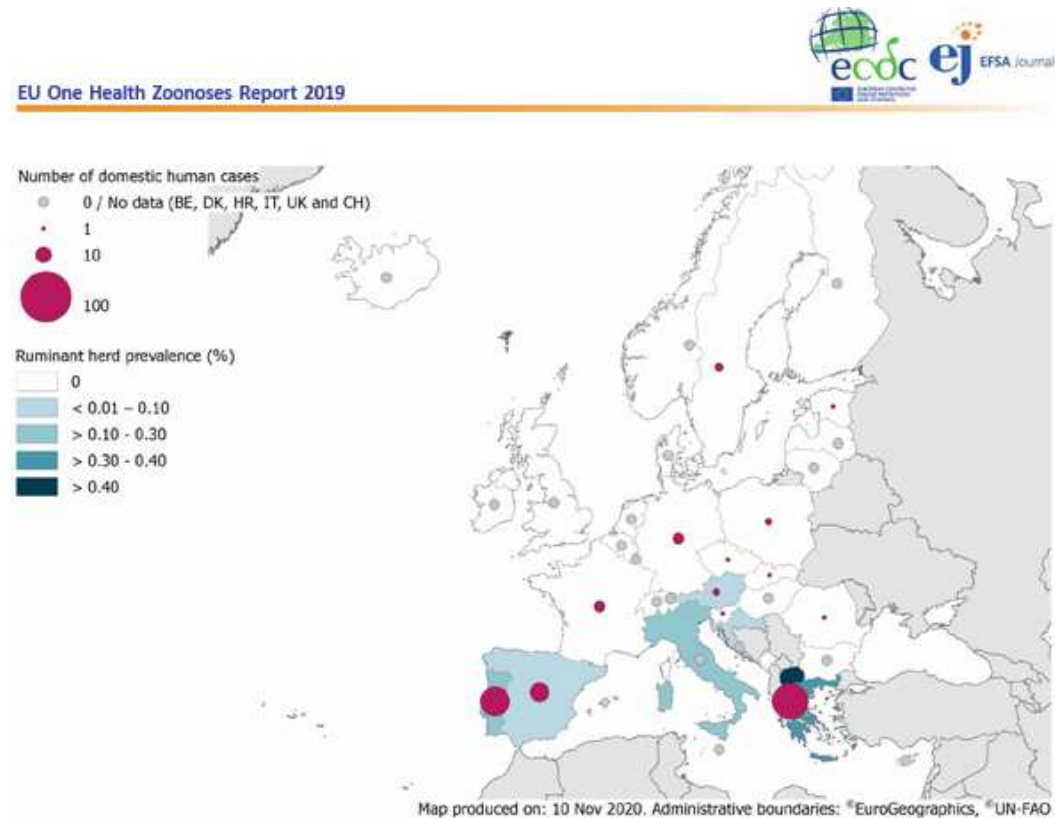


Figure 38: Number of domestically acquired confirmed brucellosis cases in humans and prevalence of *Brucella* test-positive cattle herds and sheep and goat flocks, EU/EFTA, 2019

Brucellosi-EFSA 2019

Allevamenti bovini positivi

EU One Health Zoonoses Report 2019

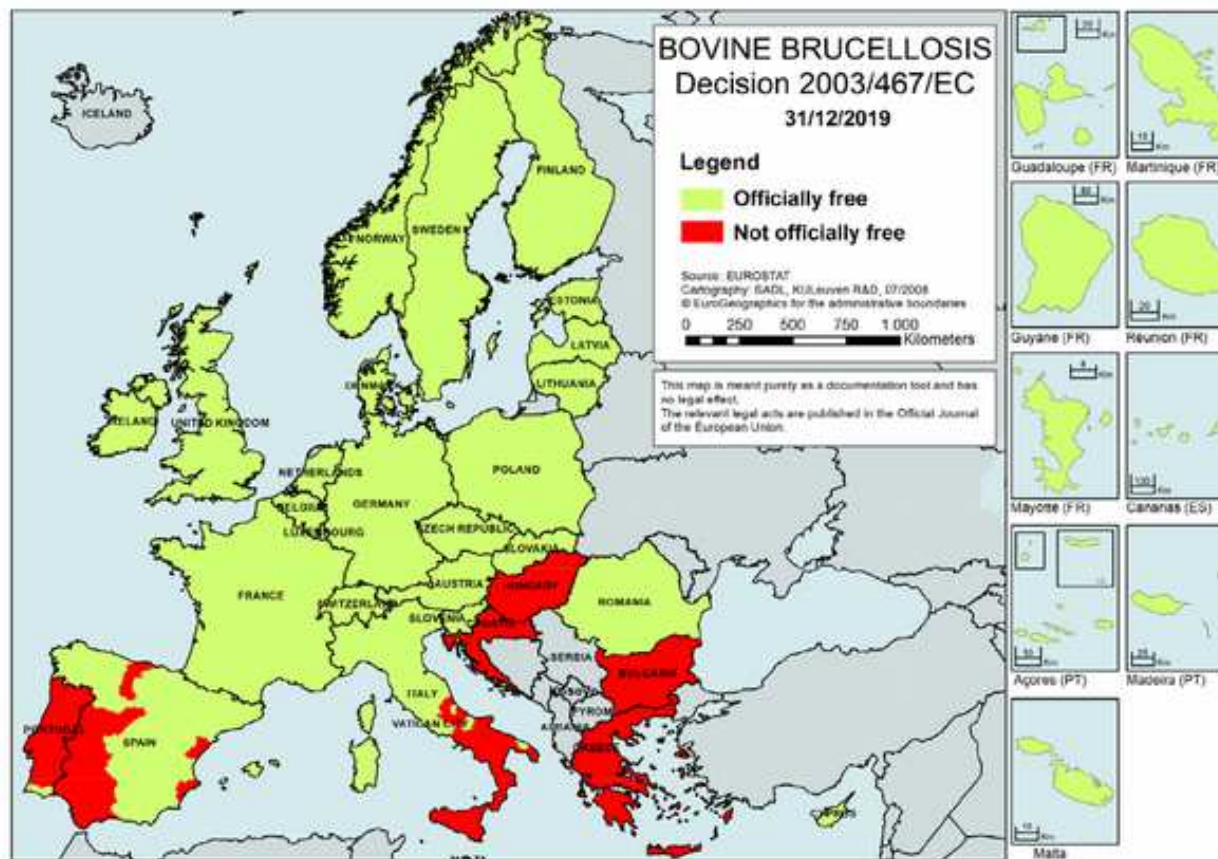


Figure 39: Status of countries on bovine brucellosis, EU/EEA, 2019¹⁶

Brucellosi-EFSA 2019

Allevamenti ovi-caprini positivi

EU One Health Zoonoses Report 2019



B. abortus, *B. melitensis* or *B. suis*. Montenegro and the Republic of North Macedonia also reported data on brucellosis in their sheep and goat flocks.

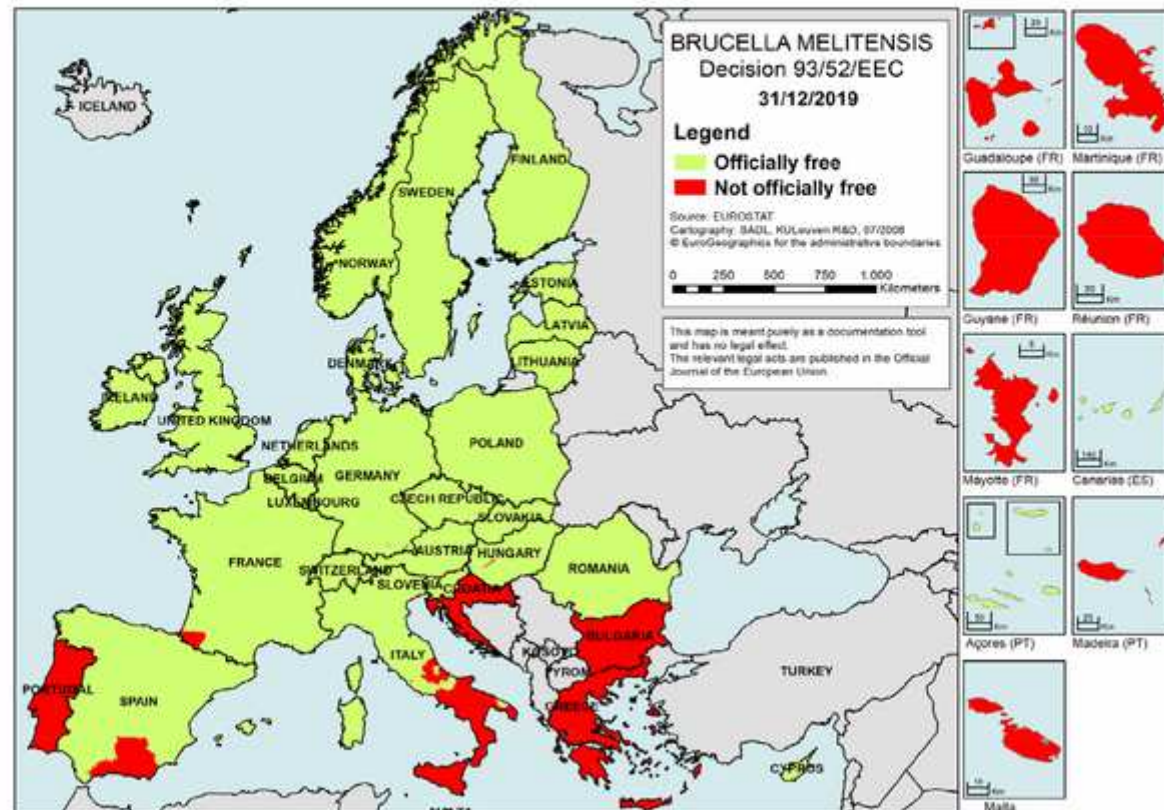


Figure 42: Status of countries on ovine and caprine brucellosis, EU/EEA, 2019¹⁷

Brucellosi-EFSA 2019

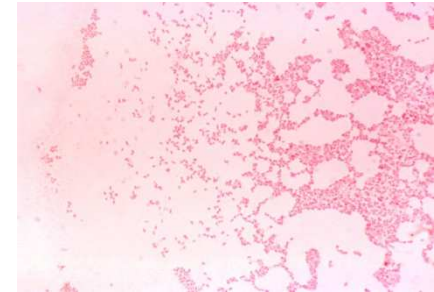
Italia Discussione

In **Italy**, a general decrease of cases has been notified in all regions in the last 20 years and its **notification rate** was for **the first time in 2019 similar to the EU average**.

Brucellosis remains, however, an important health problem particularly **in southern part of Italy, reporting 89% of the annual cases** (Facciola et al., 2018). **Greece, Italy and Portugal** were the southern European MS where bovine brucellosis and *B. melitensis* brucellosis in sheep and goat flocks were still present in 2019, **with Sicily, in Italy, reporting the highest regional prevalence in bovine animals, and in sheep and goats**. These findings underline that brucellosis is still an animal health problem with public health relevance in these southern European MS.

Brucella Eziologia

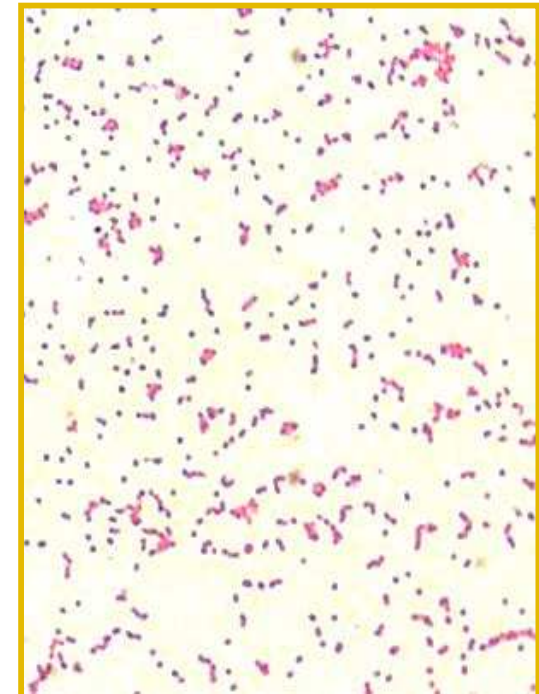
➤ *Brucella spp.*



➤ Gram negativo, coccobacillo molto piccolo (0,6-2,0 x 0,3-0,5 μm).

➤ Patogeno intracellulare facoltativo.

➤ Può persistere nell'ambiente anche a lungo (PASCOLI infetti!).



Brucella Eziologia

- Responsabili dell'infezione sono otto specie appartenenti al genere Brucella:

- *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. ceti* e *B. pinnipedialis*.... *B. microti*..altre *Brucella* spp.

- Le prime tre divise in biovars sulla base delle caratteristiche colturali e sierologiche.

B. abortus, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis* gruppo di pericolo 3!



Sorveglianza delle Zoonosi:

Brucellosi

Cenni di epidemiologia

• Le brucelle hanno ciascuna un ospite d'elezione, che ne rappresenta il serbatoio di provenienza:

B. abortus →



B. melitensis →



B. suis →



B. canis →



B. ceti/pinnipedialis →



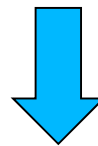
L'INFEZIONE

- **Infezione persistente (life long)**
- **Escrezione del microrganismo attraverso prodotti dell'aborto (feti, seconde, secrezioni vaginali) e secrezioni mammarie (latte).**

Brucellosi

Modalità di trasmissione e patogenesi:
Bovini e ovicaprinì

Secrezioni, deiezioni, prodotti abortivi e placenta animali infetti.



Via digerente, genitale, oculo-
congiuntivale

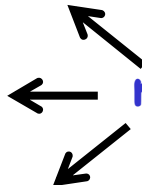
Linfonodi regionali



Stato di quiescenza

Micro-
mastite

Problemi genitali maschio



milza, midollo osseo e linfonodi

Aborto 3-
4° mese



Aborto 6-7° mese
gravidanza



La malattia (ruminanti)

➤ **Femmine**

- **Aborti**, natimortalità, animali nati deboli
- Ritenzione placentare, metrite
- Diminuzione produzione latte-**Micromastite subclinica**

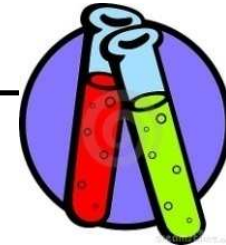
➤ **Maschi**

- Epididimite, orchite
- **Infertilità, artrite**

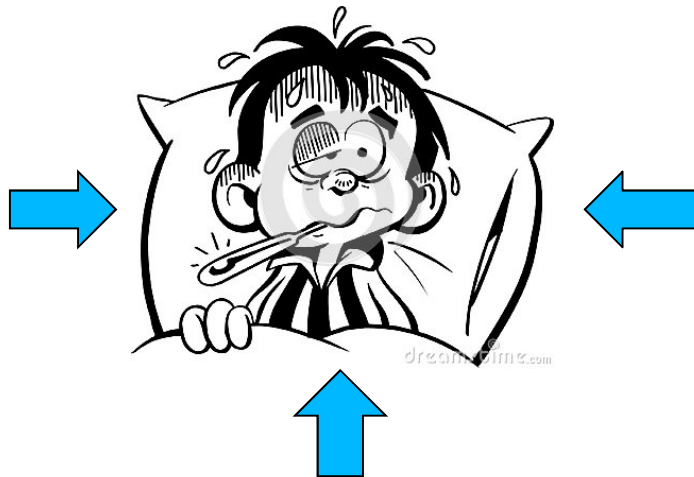


Brucellosi

Modalità di trasmissione: Uomo



Via transcutanea:
contatto diretto con
materiale biologico di
animali infetti
brucellosi occupazionale



Via aerogena e Via
congiuntivale: aerosol,
mani contaminate
**brucellosi in personale
di laboratorio**
Agente classe III!



Via alimentare: Consumo di
latte infetto non sottoposto ad
adeguato trattamento termico
o prodotti derivati freschi
Paesi industrializzati-Italia



INVIO CAMPIONI SOSPETTI BRUCELLOSI

Agente gruppo di pericolo 3!

Importante CONFEZIONARE i campioni
dopo il prelievo in IDONEI contenitori a
tenuta, nel rispetto delle norme di
biosicurezza



DOCUMENTO DI ACCOMPAGNAMENTO



Specifico Verbale di prelievo:

- BRUCELLA e TBC:

VERBALE OSSERVATORIO EPIDEMIOLOGICO VETERINARIO REGIONALE. REGIONE LAZIO

OSSERVATORIO EPIDEMIOLOGICO VETERINARIO REGIONALE
REGIONE LAZIO

BRUCELLOSI DEGLI OVINI E DEI CAPRINI
SCHEDA DI RILEVAMENTO DATI
IN UN FOCOLAIO

Se: ☐ Origine italiana ☐ Origine straniera Data: / /

Tabul. N. del n. di osservazione ☐ Tabul. N. del n. di osservazione ☐

Codice identificazione osservazione (L. 10. 11. 1986) ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

Descrizione osservazione ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

Peripartum ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

Valutazione ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

Il via tecnica di raccolta dell'osservazione ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

Presenza di osservazione riscontrata nel n. di ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

STATO SANITARIO DELLA ALLEVAMENTO PRIMA DEL RILEVAMENTO DEL FOCOLAIO

1) Osservazione osservazione ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

2) Osservazione osservazione ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

3) Osservazione osservazione ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

4) Osservazione osservazione ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

5) Osservazione osservazione ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

6) Osservazione osservazione ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

7) Osservazione osservazione ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

8) Osservazione osservazione ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

9) Osservazione osservazione ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

10) Osservazione osservazione ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

11) Osservazione osservazione ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

12) Osservazione osservazione ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

13) Osservazione osservazione ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

14) Osservazione osservazione ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

15) Osservazione osservazione ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

16) Osservazione osservazione ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

17) Osservazione osservazione ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

18) Osservazione osservazione ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

19) Osservazione osservazione ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

20) Osservazione osservazione ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

Brucellosi Diagnosi

Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals

Brucellosis (Brucella abortus, B. melitensis and B. suis) (infection with B. abortus, B. melitensis and B. suis)

<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>

There is **no single phenotypic test** by which a bacterium can be identified unequivocally as *Brucella*. Accordingly, for a **definitive identification, a combination of growth characteristics, serological, bacteriological methods is required** (Alton et al., 1988; Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis, 1986).

Brucellosi diagnosi diretta

- IZSLT ha una **Procedura Operativa Standard** per **l'esame colturale** di *Brucella* spp. **accreditata** secondo ISO/IEC 17025 Standard.
- **POS basata sul Manuale OIE.**

Diagnosi diretta: Scopi

- Rilevare e determinare le **species/biovars coinvolte**
- Affrontare il problema (anche dopo l'eradicazione) di risultati **falsi positivi sierologici**... (e. g. singoli o pochi reactors)
- **I test indiretti (serology) sono imperfetti per definizione...**
- **Rose Bengal Test ha «solo» 99.0% DSp!!! (DSp= Diagnostic Specificity)!**

AGENTI INTERFERENTI CROSS-REAGENTI!

Veterinary Immunology and Immunopathology 141 (2011) 58–63



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Immunology and Immunopathology

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



RBT = DSp (99.0%;
95% CPI: 98.0;
99.6%)

Research paper

Evaluation of sensitivity and specificity of RBT, c-ELISA and fluorescence polarisation assay for diagnosis of brucellosis in cattle using latent class analysis

G. Matope^{a,*}, J.B. Muma^b, N. Toft^f, E. Gori^c, A. Lund^d, K. Nielsen^e, E. Skjerve^g

^a Department of Paraclinical Veterinary Studies, University of Zimbabwe, P.O. Box MP 167, Mount Pleasant, Harare, Zimbabwe

^b Department of Disease Control, University of Zambia, School of Veterinary Medicine, P.O. Box 32397, Lusaka, Zambia

^c Department of Preclinical Veterinary Studies, University of Zimbabwe, P.O. Box MP 167, Mount Pleasant, Harare, Zimbabwe

^d Department of Animal Health, National Veterinary Institute, P.O. Box 8156 Dep., N-0033 Oslo, Norway

^e Ontario Laboratories (Fallowfield), Canadian Food Inspection Agency, 3851 Fallowfield Road, Nepean, Ontario, Canada K2H 8P9

^f Department of Large Animal Sciences, Faculty of Life Sciences, Copenhagen University, Grønnegaardsvej 8, DK 1870 Frederiksberg C, Denmark

^g Department of Food Safety and Infection Biology, Norwegian School of Veterinary Science, P.O. Box 8146 Dep., 0033 Oslo, Norway

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 February 2010

Received in revised form 28 January 2011

Accepted 9 February 2011

Keywords:

RBT

c-ELISA

FPA

Brucellosis

Latent class analysis

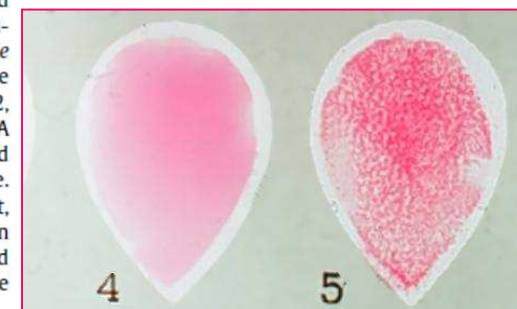
ABSTRACT

The sensitivity (Se) and specificity (Sp) of the Rose Bengal test (RBT), competitive ELISA (c-ELISA), serum (sFPA) and blood (bFPA) fluorescence polarisation assay for brucellosis were evaluated using latent class analysis using sera and whole blood collected from infected cattle reared in smallholder dairy farms of Zimbabwe. The latent class model allowed estimation of Se and Sp in the absence of a gold standard test. The c-ELISA had the highest Se (99.0%; 95% credible posterior interval (CPI): 94.8; 100%), while the RBT and sFPA had the highest Sp (99.0%; 95% CPI: 98.0; 99.6%). The bFPA had the lowest Se (71.3%; 95% CPI: 56.2; 83.5%), while its Sp (96.3%; CPI: 93.9; 98.0%) was marginally higher than that of the c-ELISA (95.4% CPI: 93.7; 96.8%). Therefore based on these data, test regimen using the RBT and c-ELISA could be suitable for diagnosis of brucellosis in smallholder dairies in Zimbabwe. Based on cost and ease of performance, the sFPA may be adopted as a confirmatory test, but its performance may be optimised by altering cut-off points to suit the Zimbabwean conditions. Thus, latent class models provide an alternative method for evaluating Se and Sp of diagnostic tests, which could be used to optimise test performance in different cattle populations.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

Indirect tests may detect **cross-reacting antibodies** resulting from exposure to other micro-organisms such as *Salmonella urbana* O:30, *Escherichia coli* O:116, O:157, *Yersinia enterocolitica* O: 9, etc.

AGENTI INTERFERENTI!



Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT, and iELISA

J.A. McGiven^a, J.D. Tucker, L.L. Perrett, J.A. Stack, S.D. Brew, A.P. MacMillan
*Department of Bacterial Diseases, FHO/WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Brucellosis,
Veterinary Laboratories Agency, Woodham Lane, New Haw, Weybridge, Surrey, KT15 3NB, UK*
Received 21 August 2002; received in revised form 27 January 2003; accepted 8 April 2003

Table 1
Diagnostic specificity and sensitivity values for each method

Parameter	CFT	SAT	iELISA	cELISA	FPA
Test cutoff	20 IUs	30 IUs	10%	70%	15.5mP
DSp (%)	99.9 (± 0.20)	98.9 (± 0.65)	97.8 (± 0.34)	99.7 (± 0.28)	99.1 (± 0.44)
Total no. of samples	995 ^a	995 ^a	6957	1440	1947
DSn (%)	91.8 (± 4.46)	81.5 (± 6.30)	97.2 (± 2.65)	95.2 (± 3.47)	96.6 (± 2.95)
Total no. of samples	146	146	146	146	146
DSp + DSn	191.7 (± 4.45)	180.4 (± 6.33)	195.0 (± 2.70)	194.9 (± 3.48)	195.7 (± 2.79)

Values in parentheses indicate 95% confidence interval.

^a Data from Emmerzaal et al. (2002).

B. DIAGNOSTIC TECHNIQUES

Table 1. Test methods available for the diagnosis of infection with *Brucella abortus*, *melitensis* or *suis*

	Purpose					
--	---------	--	--	--	--	--

Complement fixation test (CFT)

is the Gold Standard for International Trade

BDAT (RBT or BPAT)	+++	++	+++	+	+++	n/a
FPA	++	++	+	++	++	n/a
CFT	++	++	+++	++	+++	n/a
I-ELISA	+++	++	+++	++	+++	n/a
C-ELISA	++	+	+	+	++	n/a
BST	++	—	+	+++	++	n/a
SAT	++	+	+	—	+	n/a
NH and cytosol protein-based tests ^e	—	—	+	++	—	n/a
Bulk milk tests ^f Milk I-ELISA or Milk ring-test	+++	—	+++	+	+++	n/a

Key: +++ = recommended method; ++ = suitable method; + = may be used in some situations, but cost, reliability, or other factors severely limits its application; – = not appropriate for this purpose; n/a = not applicable.

Diagnosi diretta

L'isolamento **necessita di:**

- Campioni adeguati (tipo, numero, ben conservati);
- Terreni specifici di coltura e di incubazione;
- Tempi lunghi (fino a 6 settimane);
- Idonee condizioni di Biosafety/Biosecurity.

Campioni di elezione per l'esame colturale

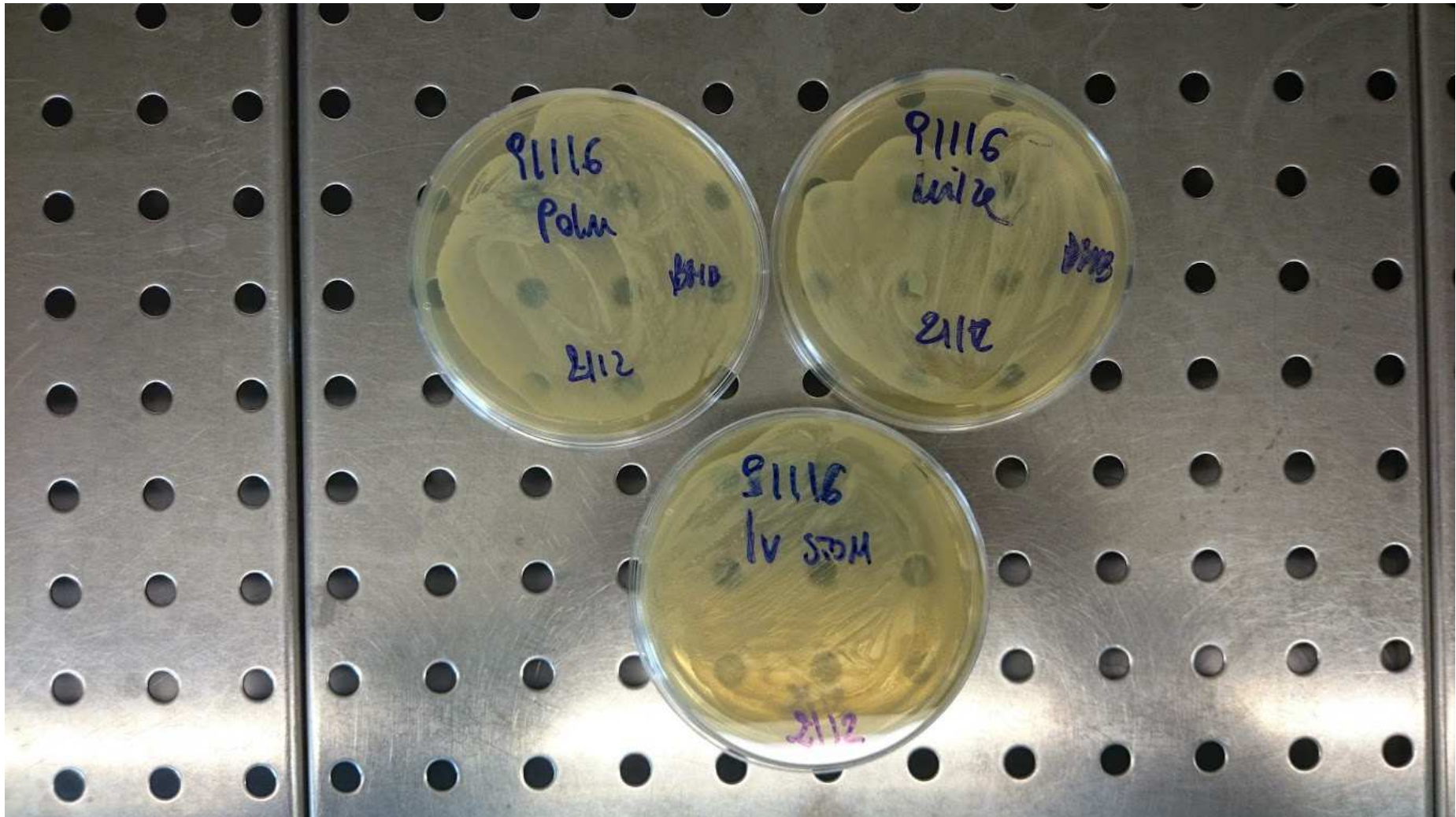
- Tessuti (**linfonodi, milza**, organi riproduttivi femminili e maschili).
- **Feti abortiti** (contenuto dello stomaco, milza e polmone).
- **Secrezioni vaginali**
- **Latte** e prodotti lattiero caseari
- **Fluidi da igromi**

Brucellosi-Diagnosi diretta -**Esame culturale**

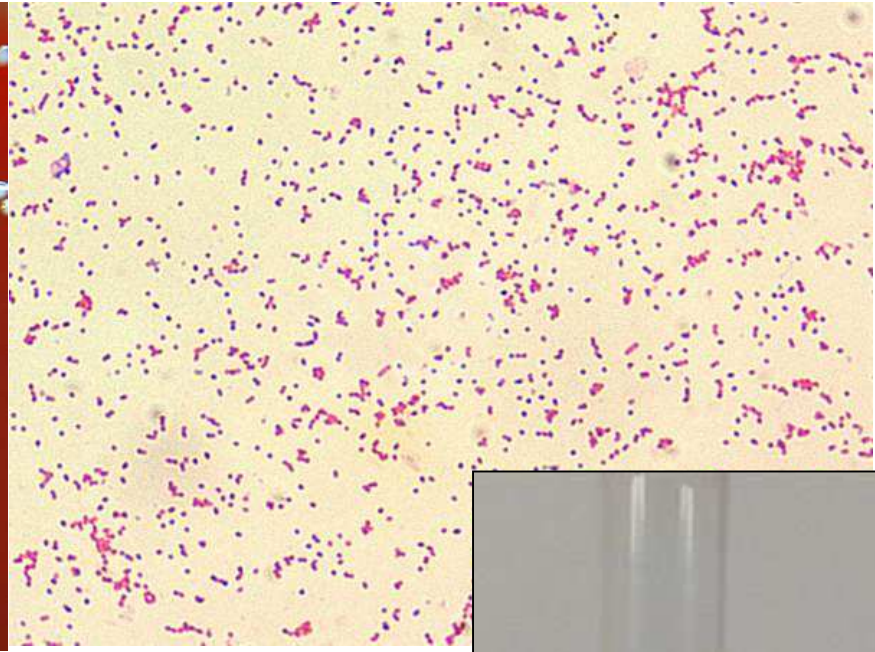
- L'isolamento si ottiene generalmente mediante l'effettuazione di **colture in parallelo** su terreni solidi e terreni liquidi di arricchimento selettivo.
- Farrell's Medium (**FM**)
- CITA Medium (**CITA**)
- **TSB1 o TSB2** (terreni liquidi)

Primary culture (at 7 days)

Ovine abortion on Farrell's medium (*B. melitensis* 3)



Phenotypic characteristics of *Brucella spp.*



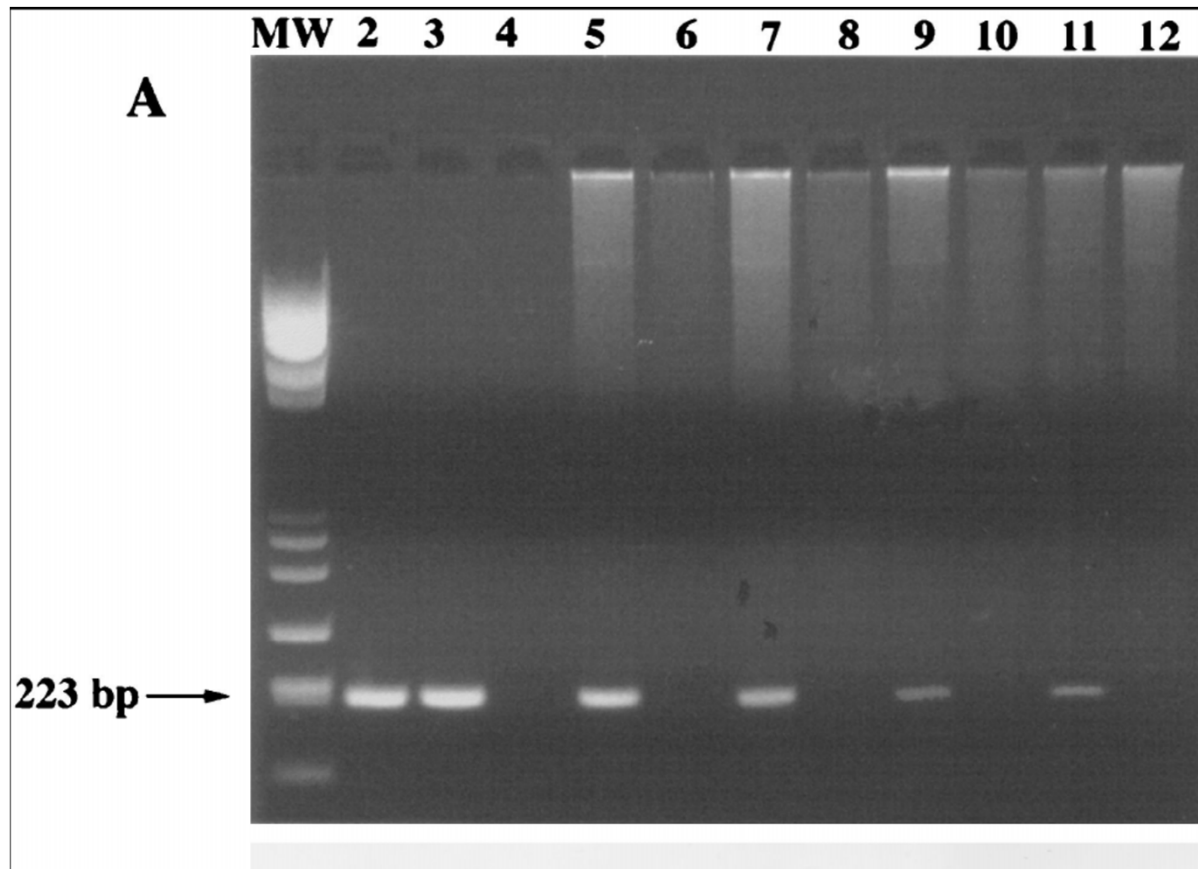
Brucellosi-Diagnosi diretta - PCR

PCR testing (*Brucella spp.*):

- **End-point PCR:** specific primers for the amplification of a sequence of 223 bp
(**BCPS31**, *Baily et al., 1992*; primers: *Elfaki et al., 2005*)
- **Real-Time PCR** (*Bounaadja et al., 2009*)

End-point PCR

BCPS31 PCR (223 bp amplicon)



Detection & Identification by **Real-Time PCR**

Real-Time PCR based on IS 711 locus

Veterinary Microbiology 137 (2009) 156–164



Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: A comparative study of IS711, *bcsp31* and *per* target genes

Lotfi Bounaadja^{a,b}, David Albert^c, Benoît Chénais^a, Sylvie Hénault^c, Michel S. Zygmunt^d, Sylvie Poliak^b, Bruno Garin-Bastuji^{c,*}

^a Université du Maine, Laboratoire de Biologie et Génétique Evolutive, EA2160 Mer Molecules Santé, 72085 Le Mans, France

^b Laboratoire Départemental de la Sarthe, 72000 Le Mans, France

^c OIE/FAO and EU Community Reference Laboratory for Brucellosis, French Food Safety Agency (AFSSA), 23 avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort Cedex, France

^d UR1282, Infectiologie Animale et Santé Publique (IASP), Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), 37380 Nouzilly, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 July 2008

Received in revised form 22 December 2008

Accepted 29 December 2008

Keywords:

Brucella

Real-time PCR

bcsp31

per

IS711

Genus-specific identification

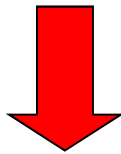
ABSTRACT

Culture is considered as the reference standard assay for diagnosis of *Brucella* spp. in humans and animals but it is time-consuming and hazardous. In this study, we evaluated the performances of newly designed real-time PCR assays using TaqMan[®] probes and targeting the 3 following specific genes: (i) the insertion sequence IS711, (ii) *bcsp31* and (iii) *per* genes for the detection of *Brucella* at genus level. The real-time PCR assays were compared to previously described conventional PCR assays targeting the same genes. The genus-specificity was evaluated on 26 *Brucella* strains, including all species and biovars. The analytical specificity was evaluated on a collection of 68 clinically relevant, phylogenetically related or serologically cross-reacting micro-organisms. The analytical sensitivity was assessed using decreasing DNA quantities of *Brucella ovis*, *B. melitensis* bv. 1, *B. abortus* bv. 1 and *B. canis* reference strains. Finally, intra-assay repeatability and inter-assay reproducibility were assessed. All *Brucella* species DNA were amplified in the three tests. However, the earliest signal was observed with the IS711 real-time PCR, where it varied according to the IS711 copy number. No cross-reactivity was observed in all three tests. Real-time PCR was always more sensitive than conventional PCR assays. The real-time PCR assay targeting IS711 presented an identical or a greater sensitivity than the two other tests. In all cases, the variability was very low. In conclusion, real-time PCR assays are easy-to-use, produce results faster than conventional PCR systems while reducing DNA contamination risks. The IS711-based real-time PCR assay is specific and highly sensitive and appears as an efficient and reproducible method for the rapid and safe detection of the genus *Brucella*.

Brucellosi-Diagnosi diretta : **Caratterizzazione molecolare**

Scopi:

- Rilevare e determinare le **species/biovars coinvolte** sul territorio (con cosa abbiamo a che fare?).



- Epidemiologia molecolare....
- Correlazione tra casi umani e casi negli animali

Strain characterization is important !!

Brucellosi-Diagnosi diretta: Caratterizzazione molecolare

Metodi molecolari:

- **Multilocus Sequencing Typing (MLST)**
- **Multiple locus variable number of tandem repeats analysis (MLVA)**
- **Oggi NGS-WGS**

Ulteriori caratterizzazioni

Gli isolati di *Brucella* spp. sono sempre inviati per una ulteriore **caratterizzazione e per una definitiva identificazione di specie e di biotipo** presso un Laboratorio di Riferimento Nazionale, Comunitario o OIE (IZS Abruzzo e Molise).

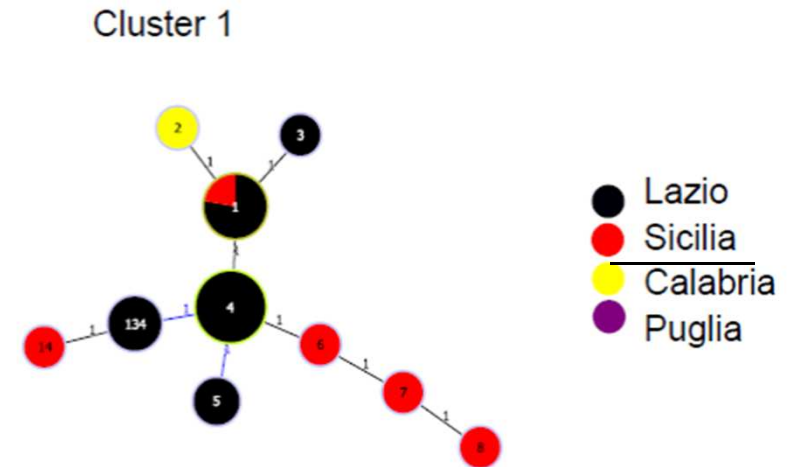
Figura 1. Albero filogenetico tipo UPGMA che rappresenta le connessioni tra i vari profili analizzati. In rosso si evidenziano i due cluster individuati.

Isolati B.
melitensis
biovar 3 da
epidemia di
Brucellosi in
provincia di
Roma e
Frosinone,
2014-2016



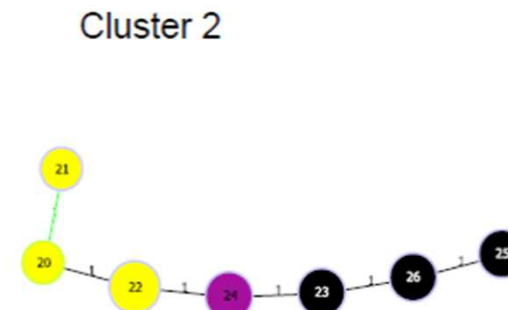
Figura 2. Minimum Spanning tree ottenuto con metodo goe-Burst rappresentante le connessioni a singolo locus tra i genotipi del focolaio e quelli presenti nel database LRN per le Brucellosi

Cluster 1

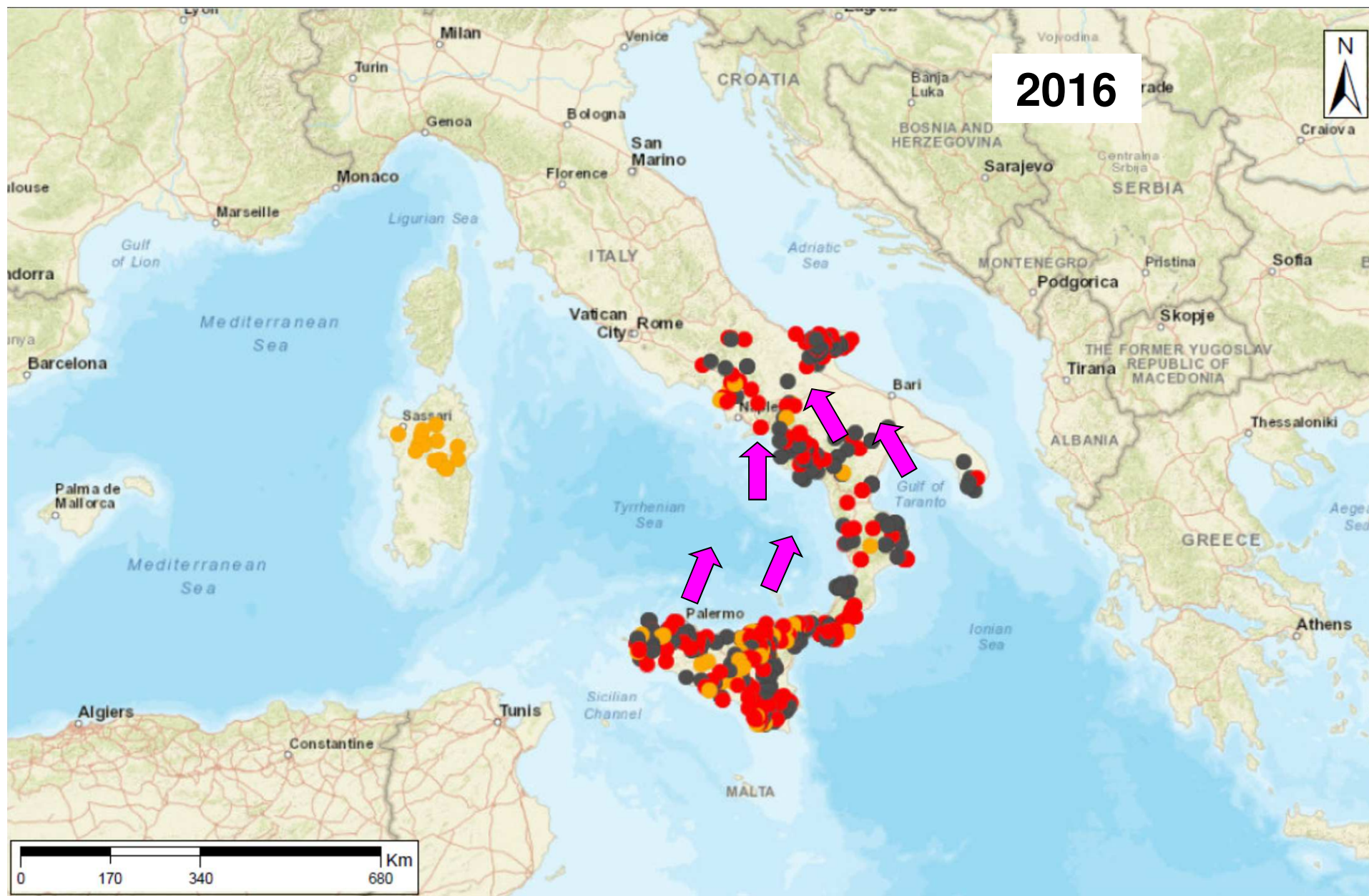


2 Clusters: Frosinone e Roma 2014

Cluster 2



BRUCELLOSI ITALIA 2012-2016



Dr. Marcello Sala 2017

Focolai Lazio 2014-2016 considerazioni

- Aree endemiche italiane rappresentano il principale fattore di rischio (tuttora presente) per la reintroduzione della BRC nelle aree indenni.
- Il principale fattore di rischio per la eventuale diffusione della BRC risiede nella efficacia e tempestività delle azioni a livello locale (ASL) per identificare tempestivamente i focolai e chiuderli tempestivamente!

Brucella suis biovar 2-Toscana 2019-2021...

Brucella suis

- 5 biovars, of which the first three only considered capable of infecting swine
- Widespread in Europe (Western & Eastern), including Italy, France, Portugal, Germany
- **Many wild boar (meta)populations do maintain *B. suis* biovar 2 in Europe**

Brucella suis
biovar 2
Suidi in Toscana



Rischio legato a suini allevati allo stato brado o semi-brado- Toscana cinta senese e non solo!

Biosicurezza!



Toscana 2019-2021 *Brucella suis* biovar 2

Sorveglianza della circolazione dell'infezione da
Brucella suis biovar 2 nel circuito degli
allevamenti di Cinta Senese della Toscana

Piano regionale ad hoc

Ufficio di staff Osservatorio Epidemiologico
Tel. 06 79099462 - 461 - 460 - 473 - 476 - Fax 06 79099462 – oevr@izslt.it

Alla c.a. Dott. Alessandro Millo
Direzione Diritti di Cittadinanza e Coesione Sociale
Settore Prevenzione e sicurezza in ambienti di vita, alimenti e veterinaria
P.O. Sanità animale, igiene degli allevamenti e igiene urbana veterinaria
Regione Toscana

Oggetto: proposta per un Piano di sorveglianza e prevenzione della brucellosi suina in Regione Toscana

Come concordato a termine della riunione del 03/12/2019 presso il Ministero della Salute, con la partecipazione del CRN per le brucellosi dell'IZSAM, Regione Toscana ed IZSLT, si trasmette la proposta tecnico-scientifica per un Piano di sorveglianza e prevenzione della brucellosi suina in Regione Toscana, da sottoporre ad approvazione Ministeriale. La proposta si intende a supporto della programmazione regionale di un sistema di controlli minimi per la verifica di circolazione dell'infezione negli allevamenti suini all'aperto e per la gestione del rischio.

Nel rimanere a disposizione per eventuali chiarimenti porgiamo cordiali saluti.

Osservatorio Epidemiologico
Marcello Sala
Email: marcello.sala@izslt.it
tel + 39 06 79099473



Brucella canis 2020

Brucella canis

- Focolai di *Brucella canis* in tutta Italia in seguito a diffusione da allevamento illegale di cani di piccola taglia (Chiwawa) in provincia di Ancona





TBC

Bacillo di Koch

la tubercolosi (TBC) è una malattia infettiva dell'uomo e degli animali con decorso cronico, caratterizzata dalla formazione di noduli (tubercoli) e processi essudativi.

• Nell'uomo è causata principalmente da *Mycobacterium tuberculosis* mentre la TBC bovina/bufalina è sostenuta da *M. bovis* e in minor misura *M. caprae*. Anche *M. bovis/caprae* possono essere causa di tubercolosi nell'uomo (zoonosi)

• Malattia antichissima: Lesioni ossee rinvenute in scheletri umani dell'età della pietra e in mummie egiziane e peruviane. Legata nel passato soprattutto al consumo di latte crudo (*M. bovis*)

TBC bovina

- Patologia con effetti socio-economici e di salute pubblica di notevole rilevanza
- Impatto significativo nei confronti del commercio internazionale di animali e prodotti animali.
- La sua diffusione è mondiale

TBC-EFSA 2019

Casi umani dovuti a *M. bovis* e *M. caprae*

*Tuberculosis due to Mycobacterium bovis or Mycobacterium caprae is a rare infection in humans in the EU, with **147 confirmed cases in humans reported in 2019**.*

*Overall, ***M. bovis* and *M. caprae*** cases accounted for only **0.3% of total tuberculosis cases***

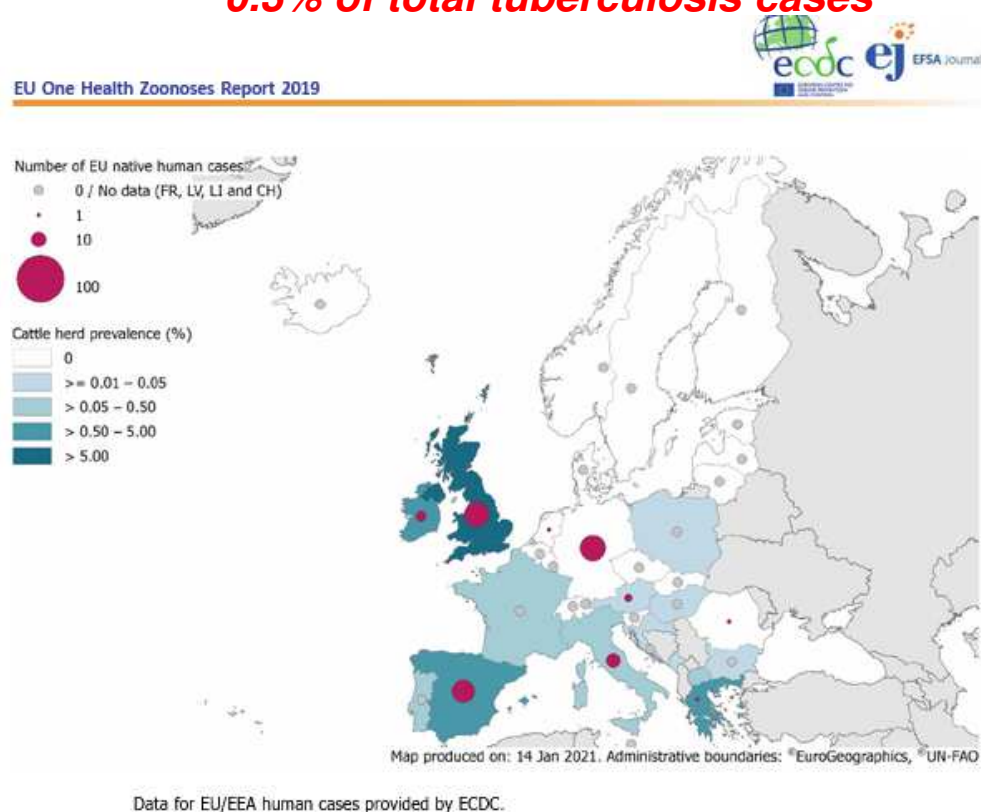


Figure 32: Number of confirmed tuberculosis cases due to *M. bovis* and to *M. caprae* in individuals of EU origin and national herd prevalence of bovine tuberculosis in cattle (ignoring OTF regions), EU/EFTA, 2019

TBC-EFSA 2019

Allevamenti bovini positivi

EU One Health Zoonoses Report 2019

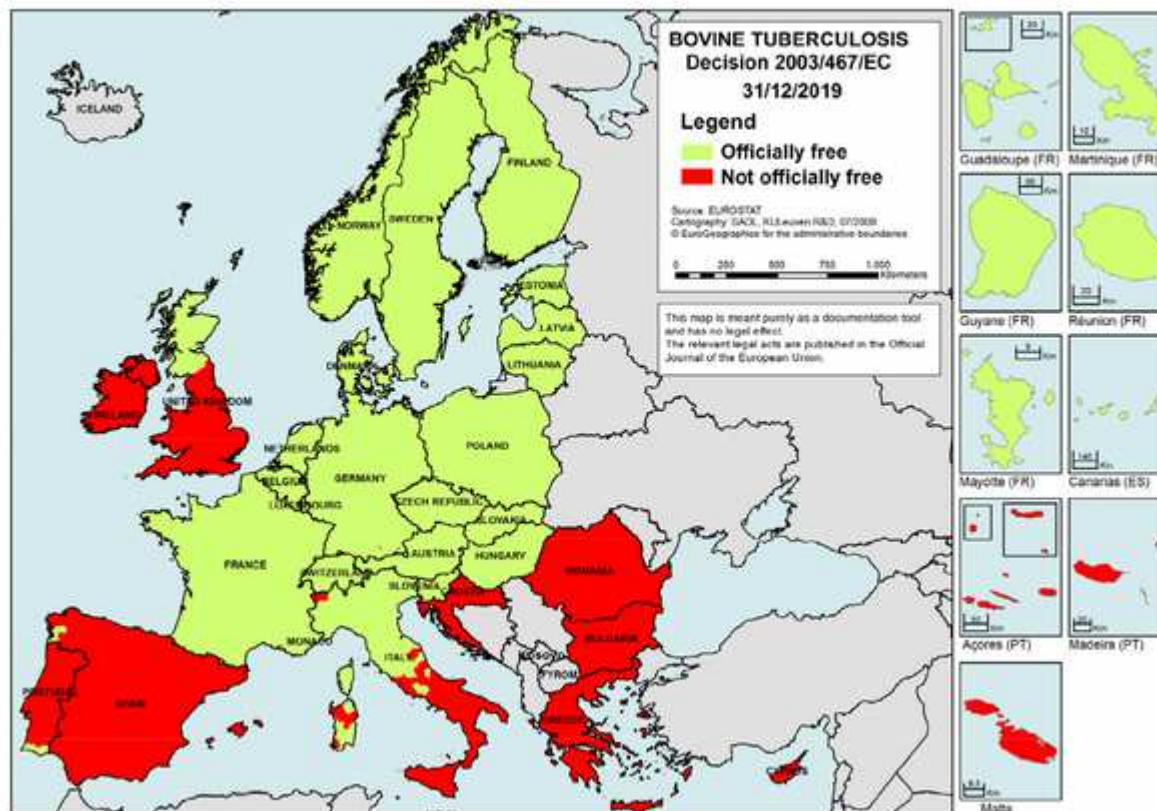
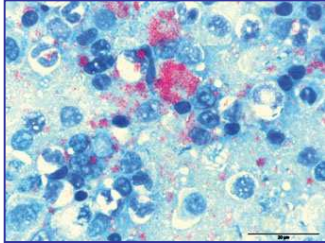
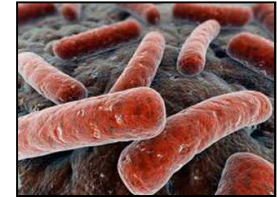


Figure 33: Status of countries on bovine tuberculosis, EU/EEA, 2019¹²

Eziologia TBC bovina e bufalina

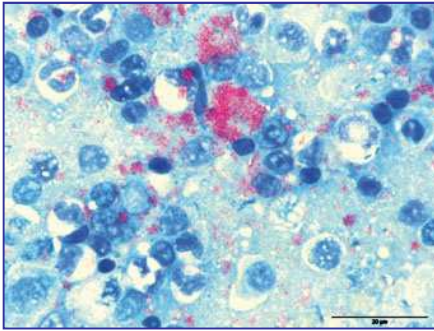


M. bovis

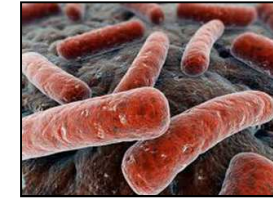


Forma bastoncellare, asporigeno, immobile, strettamente aerobio, se sottoposto a colorazione di Ziehl-Neelsen essendo acido-resistente, assume regolarmente un caratteristico colore rosso

Il serbatoio principale è il bovino ma possono essere colpite molte altre specie domestiche (capre, pecore, pets, cavalli...) e selvatiche (tassi, cinghiali, bisonti, antilopi, volpi, ratti...)



Eziologia



M. tuberculosis complex

- *M. tuberculosis*
- *M. africanum* (subtype I e II)
- *M. bovis*
- *M. bovis* BCG
- *M. microti*
- *M. caprae*
- *M. canettii*
- *M. pinnipedii*

Persiste/resistente nell'ambiente!

L'infezione (bovini)- trasmissione

- **Via aerogena tramite aerosol** è la più frequente via di infezione, seguita dall'**ingestione** di materiale contaminato (**via alimentare**).

Sintomi TBC bovina

Spesso subclinici !!

**..... Quando presenti, spesso non
caratteristici/distintivi!**

Sintomi TBC bovina

- Perdita di peso graduale, nonostante adeguata alimentazione
- Febbre in genere non elevata – l'animale tende ad abbeverarsi maggiormente
- Ingrossamento dei linfonodi (es. del collo)
- Difficoltà nella respirazione
- Tosse– peggiore al mattino, con il freddo e dopo esercizio fisico



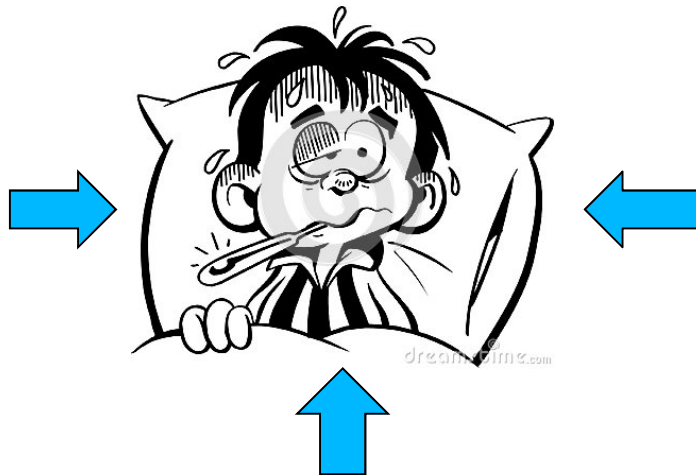
TBC bovina

Trattamento: unico metodo è la rimozione (macellazione) di tutti gli animali infetti ed esposti.

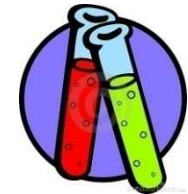
Tubercolosi da *M. bovis*

Modalità di trasmissione: Uomo

Contatto diretto con
materiale biologico di
animali infetti



Materiale infetto in
laboratorio: agente
Classe III!



Via alimentare: Consumo di
latte infetto non sottoposto ad
adeguato trattamento termico
o prodotti derivati freschi



TBC-Lesioni Post-mortem

Granulomi (tubercoli)

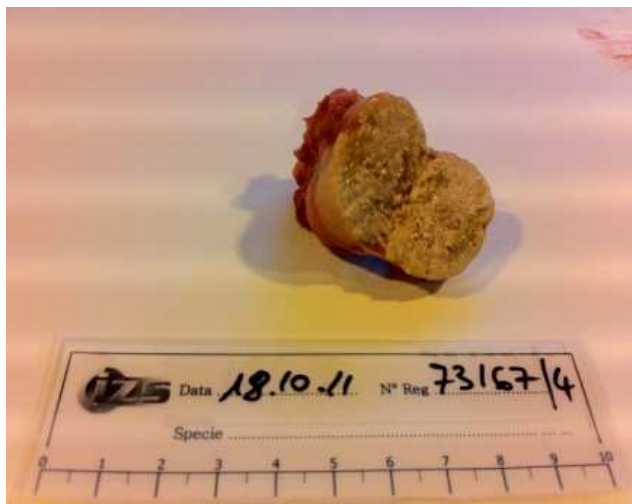
➤ Aspetto

- Gialli
- Caseosi
- Calcificati
- Possono assomigliare ad ascessi

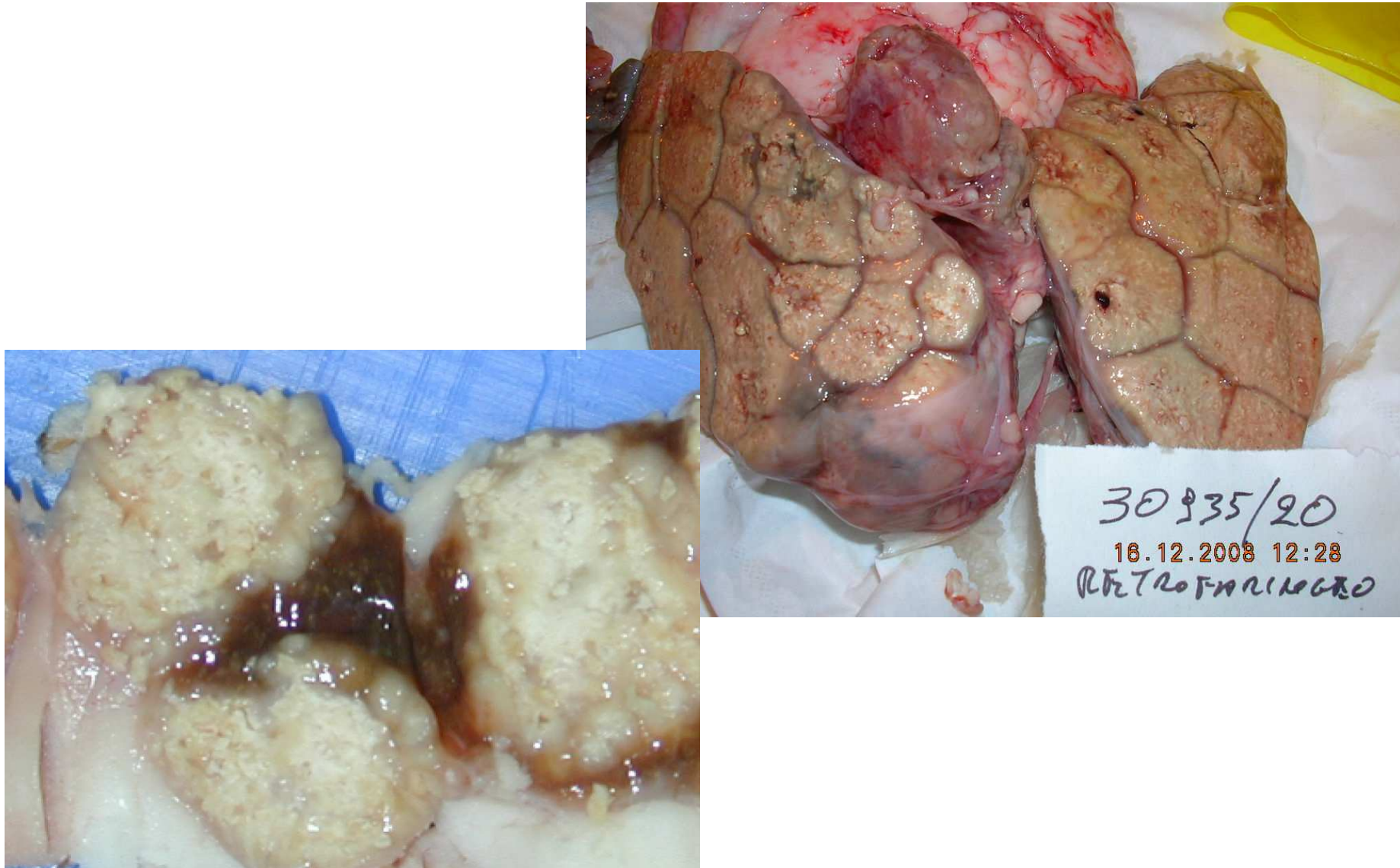
➤ Nei linfonodi e altri organi



TBC-Lesioni Post-mortem



TBC-Lesioni Post-mortem



Diagnosi di laboratorio-Diagnosi in animali in vita

Test della tubercolina (skin test)

- Reazione di ipersensibilità ritardata
- Test prescritto per gli scambi internazionali!
- Test ancillari
 - Gamma-interferon test
 - ELISA
 - Lymphocyte proliferation test



Tubercolosi da *M. bovis* skin test

D.M. 15 dicembre 1995, n. 592

•La prova ufficiale per la diagnosi di TBC bovina in vita, è il **test di intradermoreazione alla tubercolina PPD (Purified Protein Derivative) bovina**. E' test di allergia all'inoculazione (reazione di ipersensibilità ritardata), che negli animali infetti provoca ispessimento cutaneo dopo **72 ore**, accompagnato a volte da fenomeni infiammatori locali o generali. l'intradermoreazione tubercolinica deve essere eseguita nella regione del collo fra il terzo anteriore e il terzo mediano.

Prova IDT comparativa

- La prova **IDT comparativa** (ppd bovina e ppd aviare inoculate nello stesso animale) **aumenta la considerevolmente la specificità!**
- **DSP >99% (DEFRA, UK)**
- *Questo è il motivo per cui, ancora oggi, la IDT (nella sua forma singola o comparativa) è il test di elezione per i Piani di eradicazione*
- **IDT comparativa “Genera” meno falsi positivi di G-IFN e quindi meno “falsi focolai”!**

Campioni per la diagnosi diretta di TB

-Organi con lesioni rilevate al macello



-Tessuti = linfonodi da:

Reactors (positive/dubbi) al test
della Tuberolina



Diagnosi di laboratorio

Diagnosi diretta: generalmente post-mortem

➤ **Istopatologia**

➤ **Esame colturale**

➤ **Ancillary:**

➤ PCR dai tessuti (rapida ma con bassa sensibilità in “no lesion reactors”)

➤ Immune-Histo-Chemistry (IHC)

Diagnosi di laboratorio

Istopatologia

- Diagnosi rapida
- Buona correlazione con l'esame colturale
- Ma conclusiva solo quando le tipiche lesioni da TBC sono riscontrate
- E non identifica l'agente causale

Diagnosi di laboratorio

Esame culturale

- Elevata sensibilità e specificità
- Lenta = incubazione fino a 12 settimane!

a) **Microscopic examination**

Mycobacterium bovis can be demonstrated microscopically on direct smears from clinical samples and on prepared tissue materials. The acid fastness of *M. bovis* is normally demonstrated with the classic Ziehl–Neelsen stain, but a fluorescent acid-fast stain may also be used. Immunoperoxidase techniques may also give satisfactory results. The presumptive diagnosis of mycobacteriosis can be made if the tissue has characteristic histological lesions (caseous necrosis, mineralisation, epithelioid cells, multinucleated giant cells and macrophages). As lesions are often paucibacillary, the presence of acid-fast organisms in histological sections may not be detected, although *M. bovis* can be isolated in culture. However, large numbers of acid-fast organisms are seen in lesions in primates, felids, mustelids (badgers) and marsupials (brush-tailed possums).

***M. tuberculosis* complex are slow growing bacteria!**

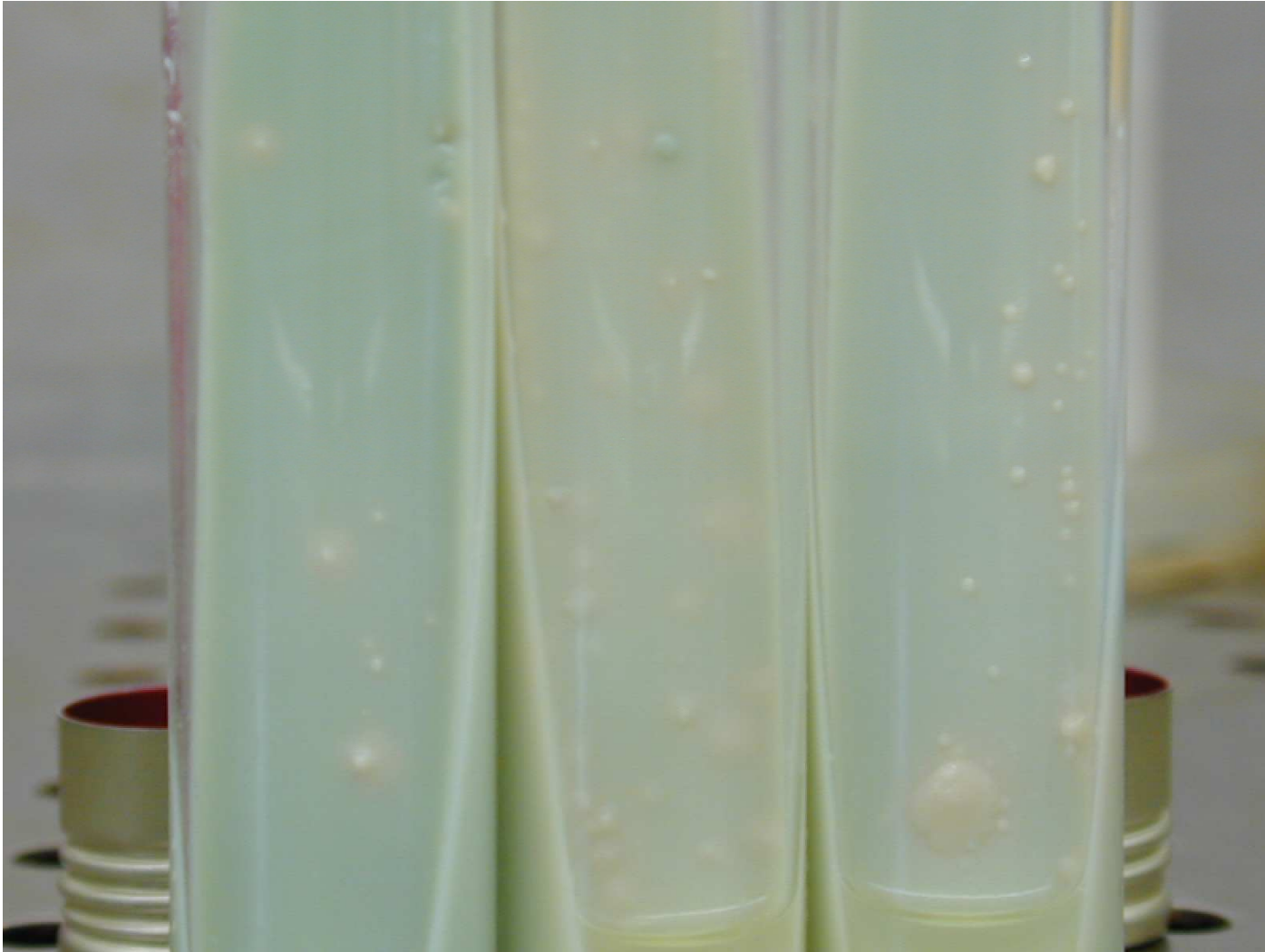
b) **Culture**

To process specimens for culture, the tissue is first homogenised using a mortar and pestle, stomacher or blender, followed by decontamination with either detergent (such as 0.375–0.75% hexadecylpyridinium-chloride [HPC]), an alkali (2–4% sodium hydroxide) or an acid (5% oxalic acid). The alkali or acid mixture is shaken for 10–15 minutes at room temperature and then neutralised. Neutralisation is not required when using HPC. The suspension is centrifuged, the supernatant is discarded, and the sediment is used for culture and microscopic examination. It is recommended that, as a minimum, pooled lymph node samples from the head and thorax be cultured when no visible lesions are detected in tuberculin or interferon test positive animals at post-mortem examination.

For primary isolation, the sediment is usually inoculated on to a set of solid egg-based media, such as Lowenstein–Jensen, Coletsos base or Stonebrinks; these media should contain either pyruvate or pyruvate and glycerol. An agar-based medium such as Middlebrook 7H10 or 7H11 or blood based agar medium (16) may also be used.

Cultures are incubated for a minimum of 8 weeks (and preferably for 10–12 weeks) at 37°C with or without CO₂. The media should be in tightly closed tubes to avoid desiccation. Slopes are examined for macroscopic growth at intervals during the incubation period. When growth is visible, smears are prepared and stained by

Solid media



A. Battisti 2002



TBC-Identificazione dell'agente

- Dimostrazione **all'esame microscopico** di acid-fast bacilli
- Diagnosi presuntiva
 - Nessuna informazione sulla specie di *Mycobacterium*
- **Esame colturale seguito da DNA-based techniques, come la PCR**
 - Conferma dell'infezione
 - Identificazione della specie di *Mycobacterium*

**L'identificazione della specie è rilevante ai fini epidemiologici
control/eradication purposes!**

TB diagnosis Recap

**Tissue samples with visible lesions or from
Tuberculin test positive animals (no visible
lesion reactors)**

Macroscopic examination

Tissue samples for:

- **Histopathology**

- **Culture** (SOP following OIE Manual)

Microscopic examination, cultures, DNA techniques, such as PCR on isolates referable to *Mycobacterium spp.*

Direct PCR provides variable results depending on stage of lesions etc. (Diagnostic Sensitivity is not optimum)

TBC-Diagnosi diretta: Caratterizzazione molecolare

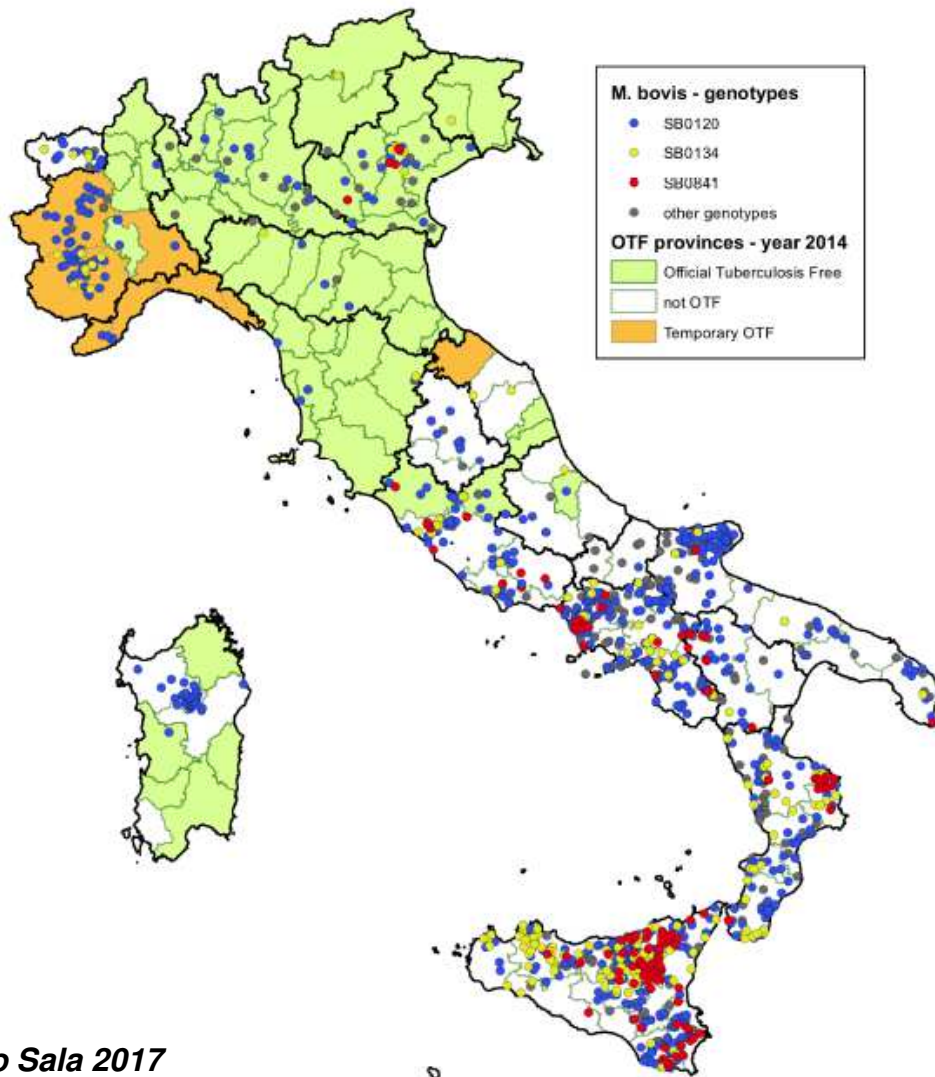
Metodi molecolari utili per ottenere informazioni epidemiologiche= **Epidemiologia molecolare:**

➤ **Spoligotyping**

➤ **Oggi NGS-WGS**

*Distribuzione geografica degli spoligotipi
maggiormente diffusi in Italia dal 2008-2015.*

BOVINE TUBERCULOSIS IN ITALY - YEAR 2008/2014
update 31/12/2014



TBC:
Italia
M. bovis

SB120

SB134

SB841

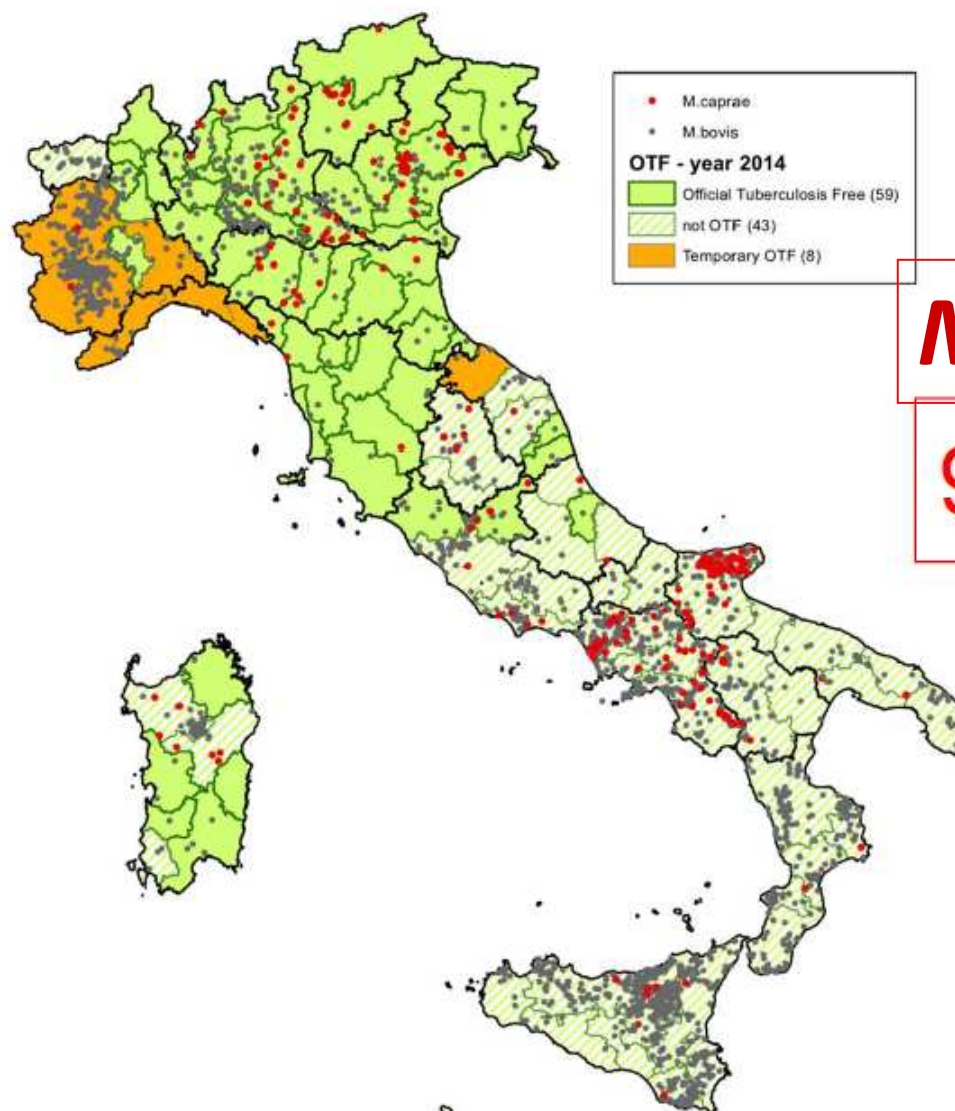
} 70%

N° tot spoligotipi =
160

Distribuzione geografica *M. caprae* 2000-2015

BOVINE TUBERCULOSIS IN ITALY - YEAR 2000/2014

update 31/12/2014

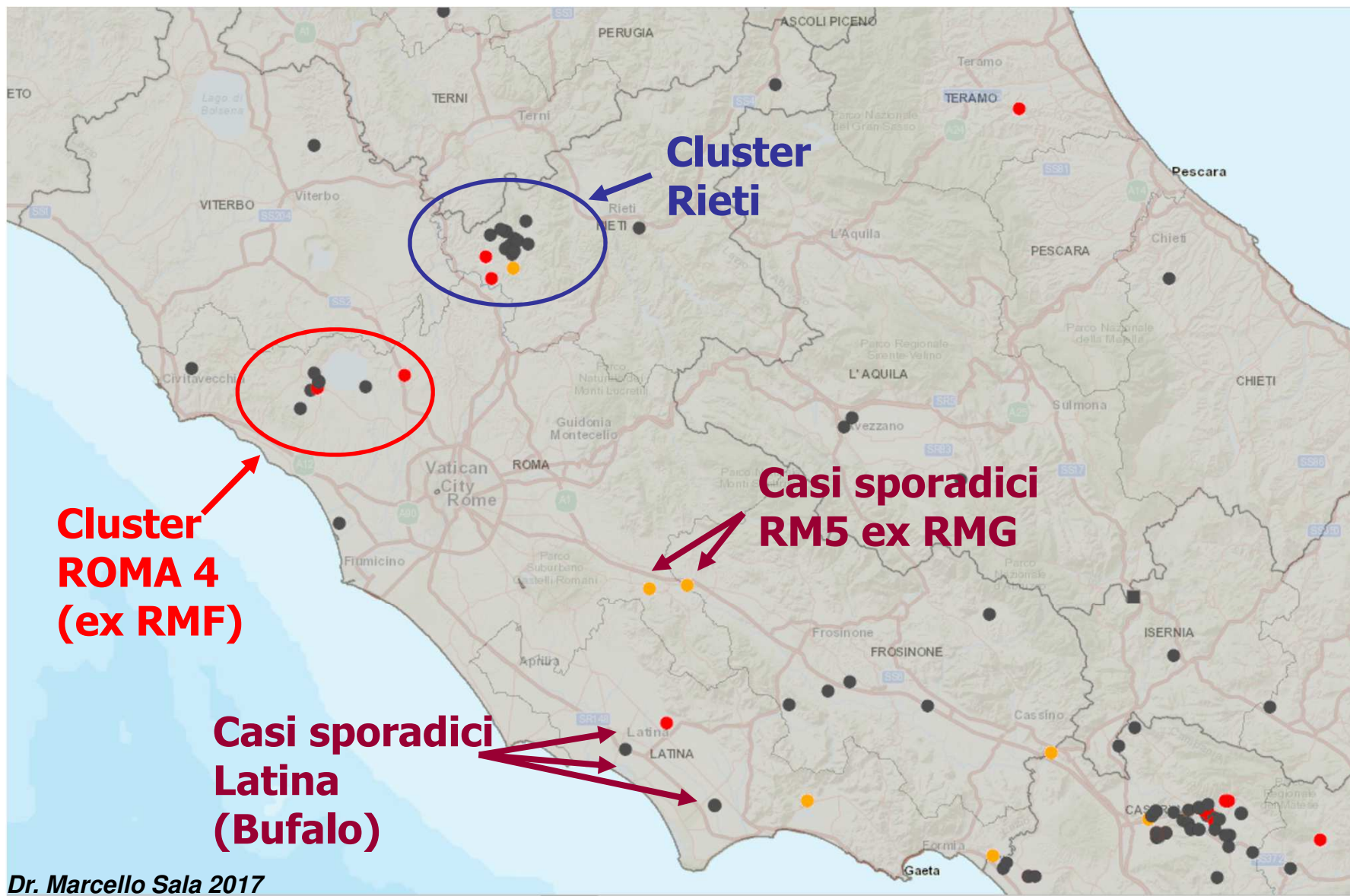


**TBC:
Italia**

M. caprae

9,2%

LAZIO 2014-2017: focolai di TBC



LAZIO/Toscana: Elementi di rischio TBC

➤ Allevamenti allo stato brado

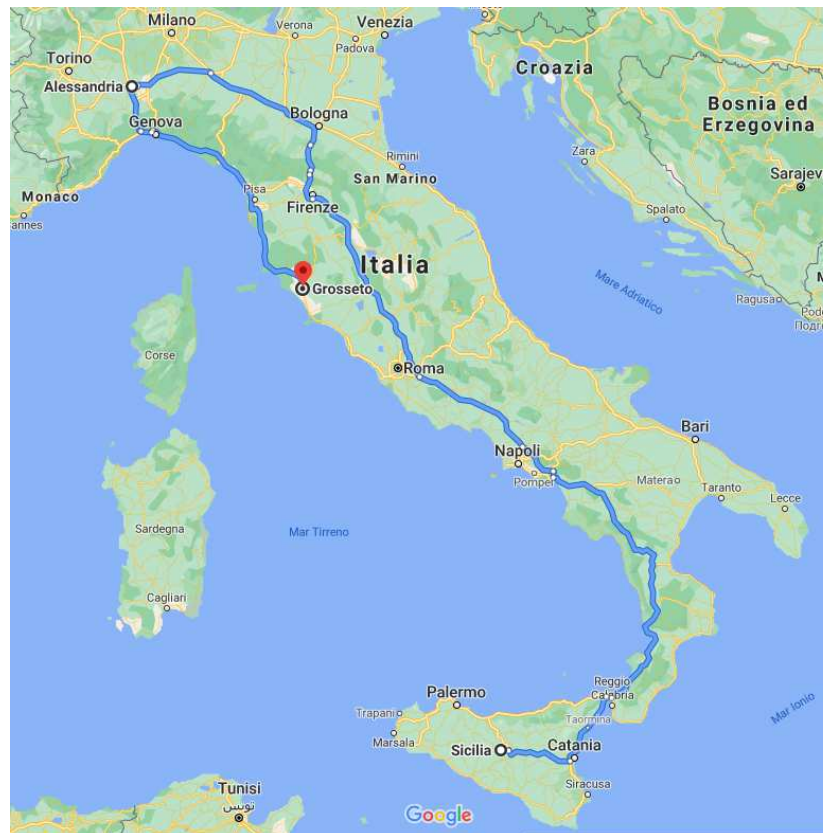


Capi non identificati
Capi «vaganti»
sfuggono al controllo
annuale
serbatoio

Toscana: Elementi di rischio TBC

Movimentazione di capi non controllati (animali da carne) o illegale

- Caso recente: capo nato in Sicilia, ingrassato in Piemonte, finissato/macellato nel Grossetano.....



Tularemia

EFSA-2019-the EU notification rate for 2019 for human tularaemia cases was **0.25 cases per 100,000 population**

Francisella tularensis

- **Coccobacillo gram negativo pleomorfo**
- **È tra i più piccoli batteri conosciuti (0,2 x 0,7 micr.)**
- **Probabilmente il più altamente infettante**
- **Immobile, aerobio obbligato, non sporigeno**
- **Dipendenza da cistina e CO₂ per la coltivazione**



Tularemia

In natura è soprattutto malattia di roditori e lagomorfi nei quali si manifesta con:

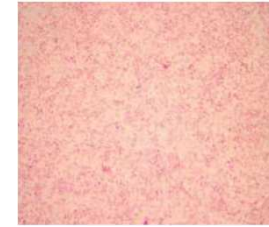
- **quadri acuti setticemici a rapido decorso (Ovest Europa)**
- **forme croniche (es. lepri-Est Europa)**



Tularemia-epidemiologia



Tularemia



Uomo: Ospite accidentale all'interno del ciclo

- si infetta facilmente attraverso diverse vie con sviluppo di differenti quadri clinici
- Non c'è trasmissione interumana

F. tularensis subsp. tularensis (tipo A):

presente in Nord America.

- virulenza elevata per l'uomo e gli animali
- da 1-10 batteri per via SC
- 25 batteri per aerosol

F. tularensis subsp. holarctica (tipo B):

- più raramente fatale per l'uomo e presente in Asia, Europa, USA.
- associata a roditori semi-acquatici in USA (castori)
- a micromammiferi terricoli e lepri nell'Est Europa e Russia
- In habitat associati a laghi, stagni e fiumi

Tularemia

- Nell'uomo emerge spesso come eventi epidemici! Ambiente rurale!



-Difficilmente la malattia giunge all'osservazione dei sistemi/servizi sanitari veterinari perchè:

- Difficoltà di sorveglianza negli animali selvatici
- Predazione naturale

Tularemia

- **Spesso l'infezione resta confinata nell'ambiente selvatico (roditori e lagomorfi)**

Ma.....

- **Persistenza nell'ambiente! (acqua, biofilm, zecche, zanzare)**

Tularemia-diagnosi negli animali

- Diagnosi clinica: di fatto impossibile.
- Diagnosi anatomo-patologica (nella lepre): non conclusiva...**splenomegalia**..ma....

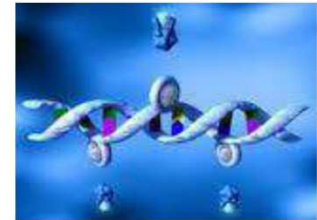


- Forme croniche (est Europa): lesioni simil-ascessuali a vari parenchimi (polmone, sierose, rene)
- Diagnosi differenziale con Brucellosi, Pseudotubercolosi, Pasteurellosi setticemica, Stafilococchi disseminata. Altre splenomegalie aspecifiche (es. da stasi)

Tularemia-Diagnosi

Diagnosi di laboratorio:

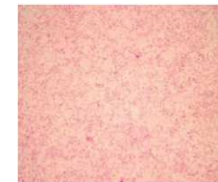
- Esame colturale
- Prova biologica
- Sierologia
- Molecolare



Tularemia-Diagnosi diretta

Esame colturale: Terreno specifico-Agar Cistina con o senza antibiotici.

- **Crescita lenta: 48-96 h**
- **Colonie grigio verdastre caratteristiche**
- **Piccolissimi cocci Gram-negativi**



Per la conferma (oggi molecolare):

- **PCR / PCR Real Time**
- **Sequenziamento**

Francisella tularensis

**Possibile agente di
bioterrorismo!**

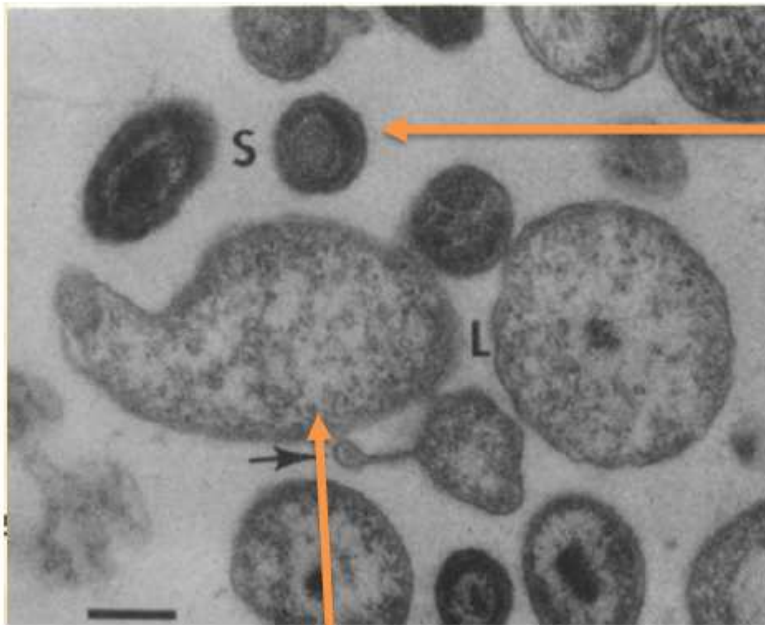


Febbre Q-*Coxiella burnetii*

Ordine Legionellales, famiglia Coxiellaceae

- Aspetto **pleomorfo**.
 - Possiede un parete batterica simile ai gram negativi.
 - **Parassita intracellulare obbligato**.
 - **2 forme morfologiche (extracellulare ed intracellulare)**.
-
- **Dose infettante molto bassa**: uomo da 1-10 cellule batteriche.
 - **Molto resistente**: 42 mesi a 4-6°C nel latte, 12-16 mesi nella lana, 4 mesi nella polvere, 49 giorni nelle urine essiccate.
 - **Resistente a molti disinfettanti**: inattivato da alcol etilico 70% (30 min.), cloroformio 5% (30 min), calciocianamide 0,6% (1 settimana).

Febbre Q-*Coxiella burnetii*



**Forma
extracellulare
(infettante)**

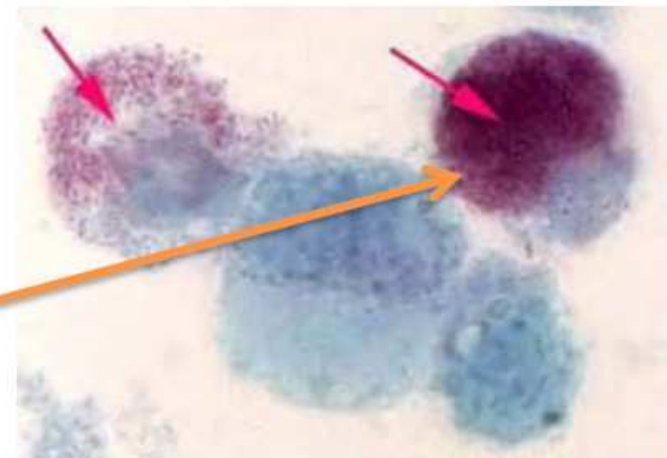
Small cell variant (SCV)

- aspetto elettrondenso
- membrana esterna
- parete densamente colorata

**Forma intracellulare
(replicativa)**

**Large cell variant (LVC) simili a
bacilli Gram-negativi**

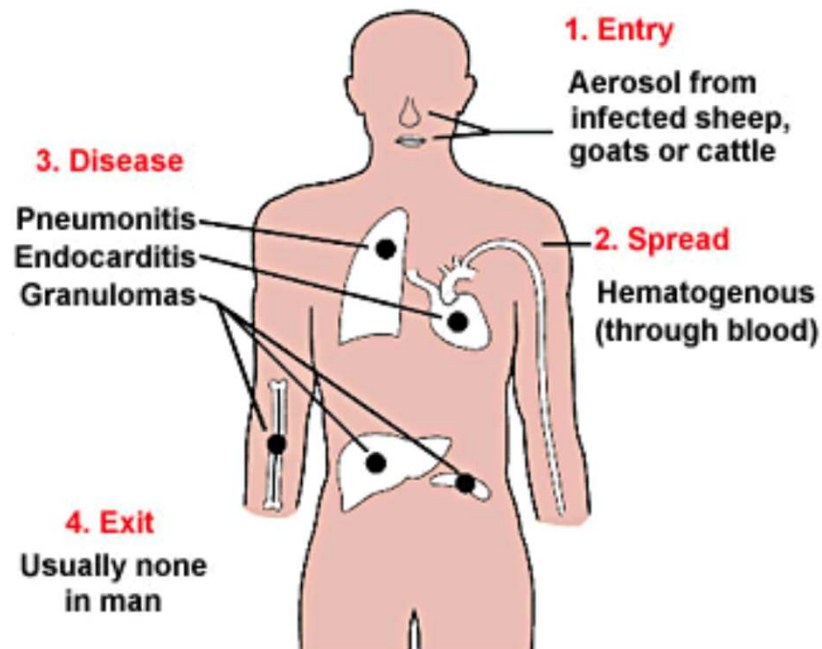
ricchi di ribosomi, parete cell. meno rigida



Febbre Q-*Coxiella burnetii*

Può infettare un ampio numero di specie animali!

I **ruminanti** domestici sono considerati la **più importante fonte di infezione per l'uomo**. La principale modalità di trasmissione è rappresentata dall'inalazione di aerosol infetto.



Febbre Q-*Coxiella burnetii*

RUMINANTI-SINTOMATOLOGIA

- **Aborto tardivo** (soprattutto capre)
- Natimortalità, ipovitalità
- Placentiti
- **Endometriti e infertilità** (bovini)
- **Polmoniti, mastiti, oftalmiti**
- **Spesso: parti normali con escrezione di *C. burnetii* (subclinico)**



Febbre Q-*Coxiella burnetii*



RUMINANTI

CAPRE

PECORE

BOVINI

**Escrezione con Feti,
placenta/invogli,
secreti vaginali, feci,
urine e latte**

-Infezione in:

-ALTRE SPECIE

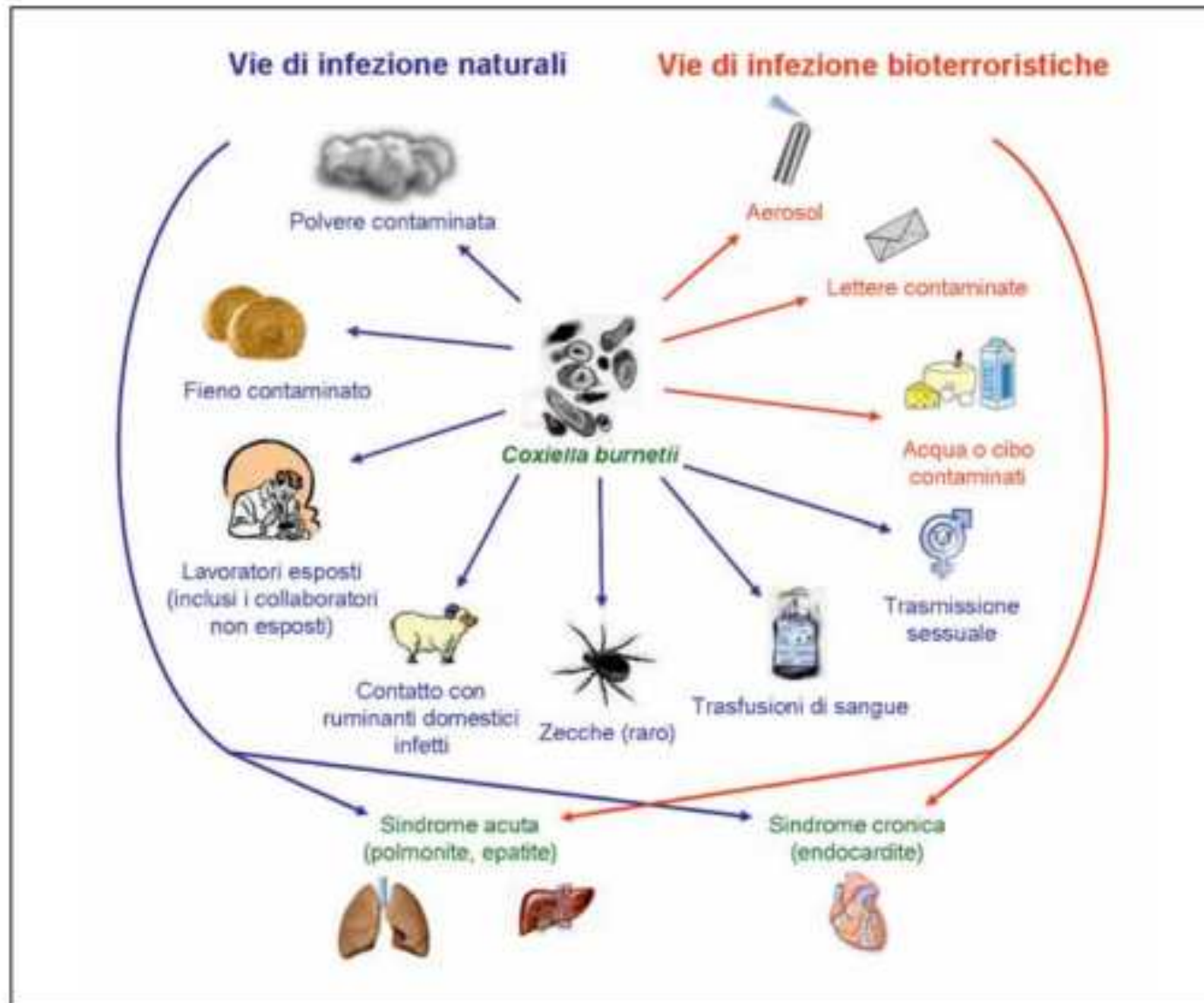
UCCELLI

-ZECCHE

**Trasmissione
transovarica e
transtadiale**

Febbre Q-*Coxiella burnetii*-trasmissione

G. Borriello et al. Large Animal Review 2010; 16: 273-283 275



Febbre Q-*Coxiella burnetii*

**EFSA Febbre Q-2019: The
EU notification rate in
humans in 2019 was 0.19
per 100,000 population**

Febbre Q-*Coxiella burnetii*

At the EU level, there is no harmonised surveillance in place for Q fever in animals. The main animal species tested are cattle, goats and sheep. Samples are mostly blood samples, samples from foetus and stillborn animals and from organs or tissues of animals suspected of being infected by *C. burnetii*.

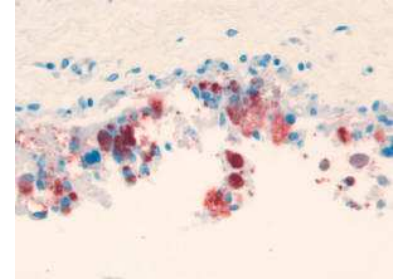
Febbre Q-*Coxiella burnetii*

EFSA 2019 diminuzione casi:

the overall proportion of **test-positive animals in EU was 8.9% in sheep and goat** (10.8% based on 2018 data), **5.3% in cattle** (6.9% based on 2018 data) and 1% in other domestic and wild animals (2.7% based on 2018 data).

Diagnosi diretta agenti abortigeni

Coxiella e Chlamydie



Intracellulari obbligati = **diagnosi molecolare**

- PCR
- Caratterizzazione mediante MLVA, NGS



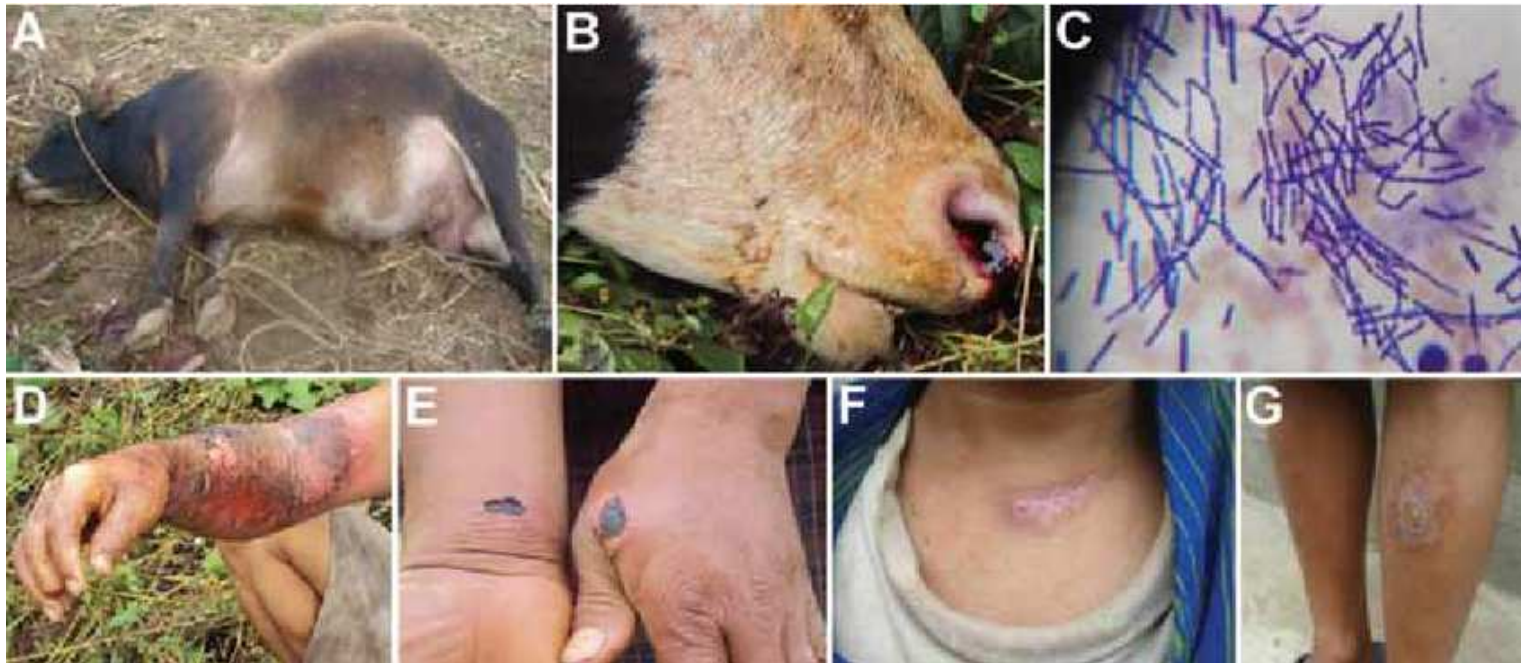
Febbre Q-*Coxiella burnetii*

Gestione focolai

- **Complessa**
- **Prioritaria la corretta gestione dei parti e degli aborti!**
- **Pulizia e disinfezione (aborti, letame, evitare polvere)**
- **Vaccinazione per più anni**
- **Blocco movimentazione/eventuale abbattimenti solo in caso di malattia nell'uomo**
- **Evitare contatti per persone a rischio**

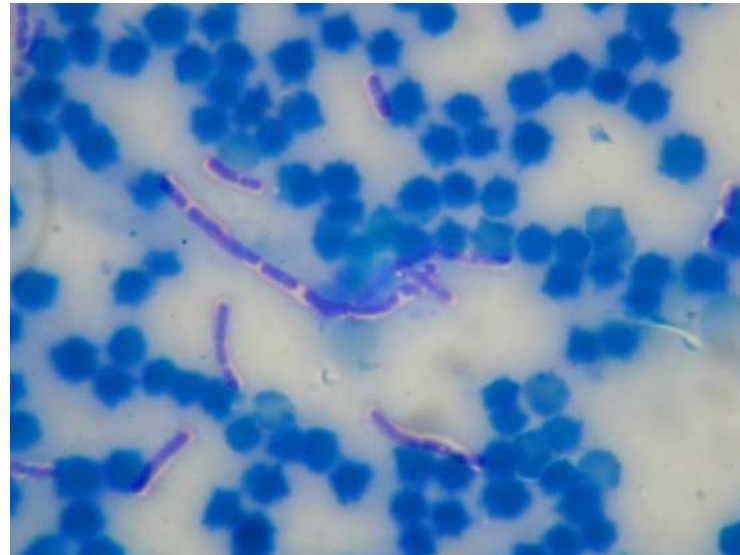
Carbonchio ematico-*Bacillus anthracis*

Malattia infettiva contagiosa, ad andamento prevalentemente acuto o iperacuto



Carbonchio ematico-*Bacillus anthracis*

Bacillus anthracis, germe **sporigeno
bastoncellare, Gram-positivo
aerobio, appartenente alla famiglia
delle Bacillaceae.**



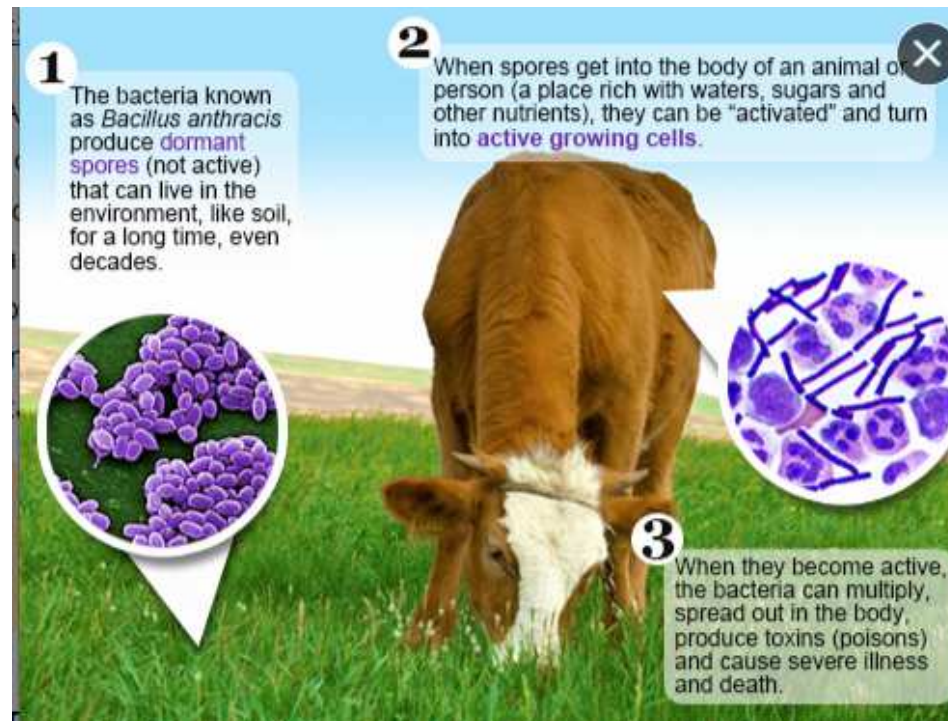
Carbonchio ematico-*Bacillus anthracis*

Sporigeno

Forma vegetativa, capsulata, dimostrata solo in organismi viventi, mentre in forma di spora nell'ambiente esterno.

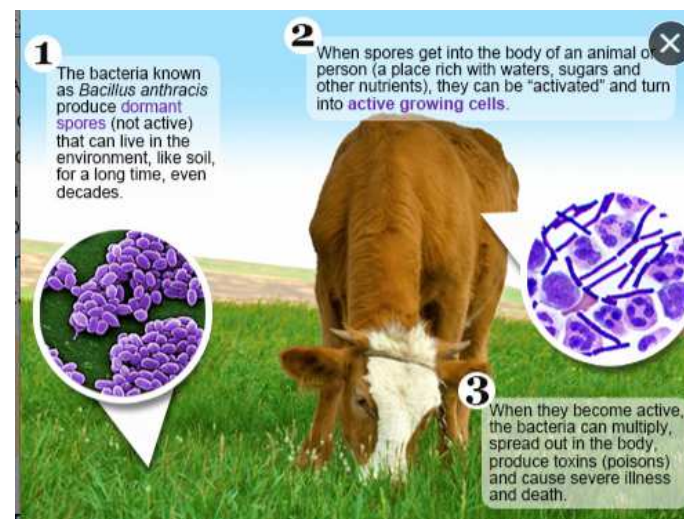
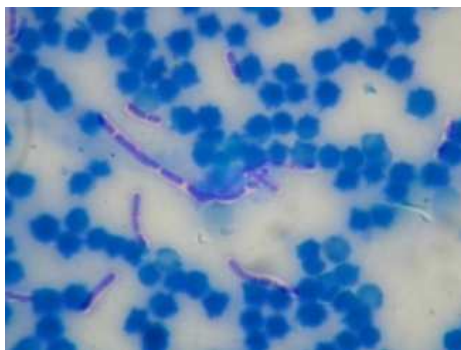
La spora è una **forma di quiescenza e di resistenza** attraverso cui il *B. anthracis* si mantiene a lungo vitale!

Campi maledetti!



Carbonchio ematico-*Bacillus anthracis*

L'infezione agrigena, storicamente più frequente, è causata dalla contaminazione dei terreni su cui pascolano gli animali. L'incidenza dei focolai tende ad essere più alta in concomitanza di **recenti piogge successive a periodi caldi e siccitosi**, circostanze che alterano la struttura delle spore facilitandone la germinazione



Carbonchio ematico-*Bacillus anthracis*

➤ Particolarmente **recettivi sono i ruminanti** (bovini, bufalini, ovini, caprini, cervidi e altri ungulati selvatici), nei quali la malattia, in genere ad esito fatale, presenta un decorso setticemico, acuto o iperacuto.

➤ **Morte improvvisa, emorragie, sangue non coagulato!**



Carbonchio ematico-*Bacillus anthracis*

➤ In equini, suini e cani prevalgono forme localizzate (**faringe, intestino**) che possono portare a morte l'animale prima che si instauri una setticemia.

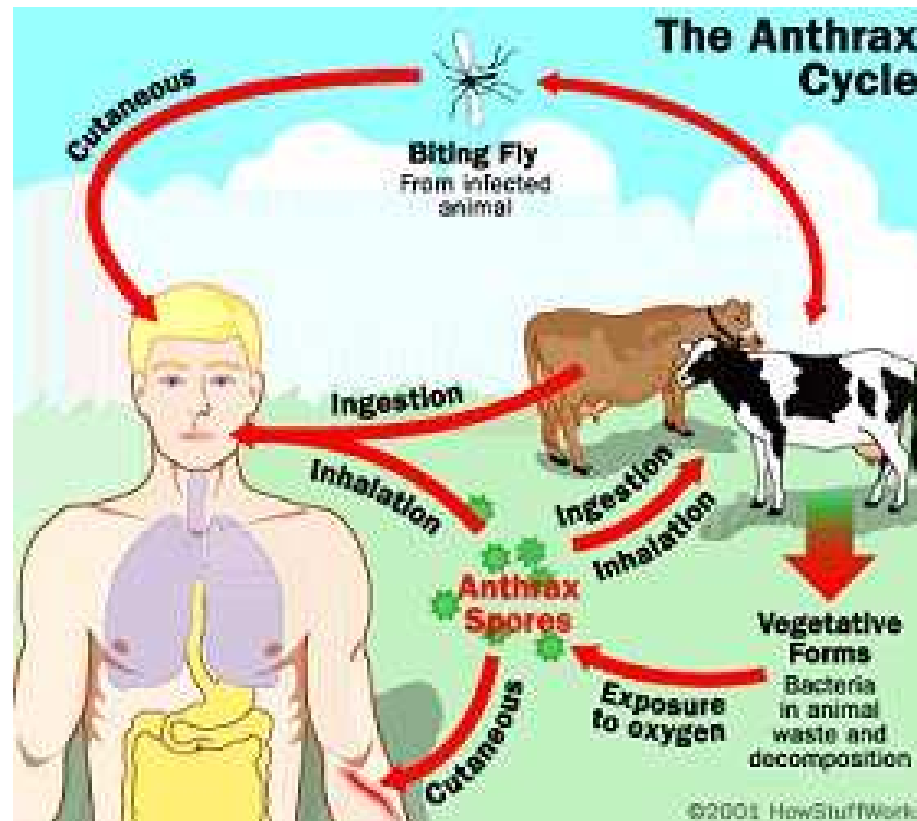
➤ Sospetto diagnostico più difficile!

Carbonchio ematico-*Bacillus anthracis*

UOMO

La via di contagio più comune è quella che deriva dal contatto con animali infetti, spesso durante la lavorazione di derivati animali come pelle, lana e ossa..

**ZOONOSI
PROFESSIONALE**
(allevatori, veterinari,
soggetti che
manipolano/lavorano
le pelli degli animali)



Carbonchio ematico-*Bacillus anthracis*

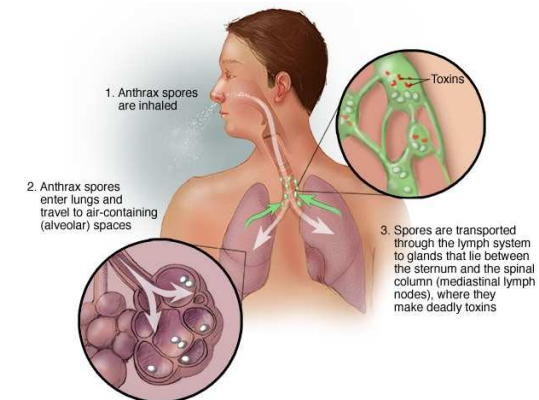
UOMO

Esistono tre forme cliniche della malattia:

➤ **Cutanea:** è la forma di gran lunga più frequente. L'infezione avviene per contatto, la spora penetra attraverso tagli, anche piccoli, o lesioni cutanee. Un iniziale rossore si trasforma in un paio di giorni in un'ulcera di piccole dimensioni a cui segue il rigonfiamento dei tessuti linfatici circostanti. Se non trattata la forma cutanea può essere letale nel 5-20% dei casi.



➤ **Respiratoria:** l'infezione avviene in seguito all'inalazione di spore, è la forma più grave, letale nella maggioranza dei casi. In genere si verifica a seguito di esposizione durante le lavorazioni di lane, pellami o farine di ossa contaminati.



© MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH. ALL RIGHTS RESERVED.

➤ **Gastrointestinale:** piuttosto rara, l'infezione avviene per ingestione di carne e alimenti provenienti da animali malati. L'infezione intestinale da antrace è letale nel 25-60% dei casi.



SURVEILLANCE REPORT

Annual Epidemiological Report for 2016

Anthrax

Key facts

- Anthrax continues to be a rare disease in humans in Europe, with only a few cases reported every year.
- In 2016, two EU/EEA countries reported six laboratory-confirmed anthrax cases: Romania (5) and Spain (1). The remaining 28 reporting countries notified no cases.



**Rara in Europa!..6 casi
umani nel 2016 riportati**

Carbonchio ematico-*Bacillus anthracis*

DIAGNOSI

- Sospetto clinico/anmnestico: morte improvvisa, emorragie, zona storicamente a rischio, periodo estivo...



**Non aprire la carcassa!!!
Rischio diffusione spore...**

Carbonchio ematico-*Bacillus anthracis*

DIAGNOSI

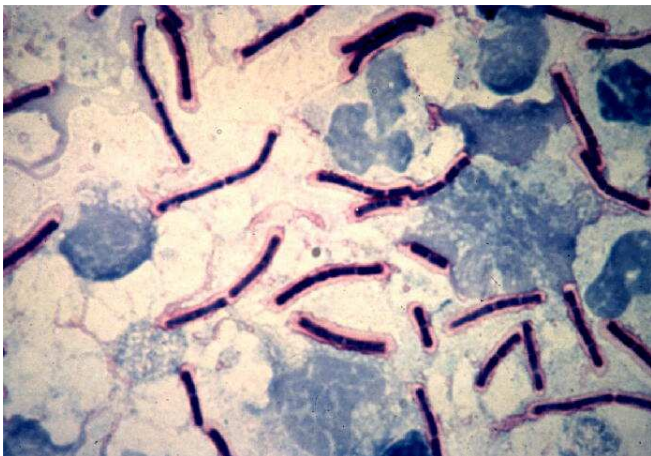
➤ Prelievo di sangue



➤ **Esame microscopico** (batteri Gram-positivi di forma bastoncellare con estremità tronche “a canna di bambù”, che presentano una caratteristica metacromasia della capsula,

➤ **Esame colturale** (Bacillo non emolitico)

➤ **Conferma e caratterizzazione** con metodi molecolari, fagotipizzazione



Carbonchio ematico-*Bacillus anthracis*

<https://www.izslt.it/agentizoonosicispeciali/carbonchio-ematico-antrace/>

Nella carta tematica interattiva (realizzata ed aggiornata da Pasquale Rombolà, OEVR Lazio, IZSLT), è possibile visualizzare la localizzazione geografica dei focolai di Carbonchio ematico notificati nella provincia di Roma a partire dal 1952.

La mappa interattiva fornisce la possibilità di filtrare i focolai per decennio di insorgenza e per specie animale coinvolta.





Grazie per l'attenzione U.O.C. D.O. DIG!

R.I.P. OLIVIA



Domande?



**KEEP
CALM
BECAUSE**

THIS IS NOT THE END OF THE WORLD

BUT THE END OF THIS PRESENTATION