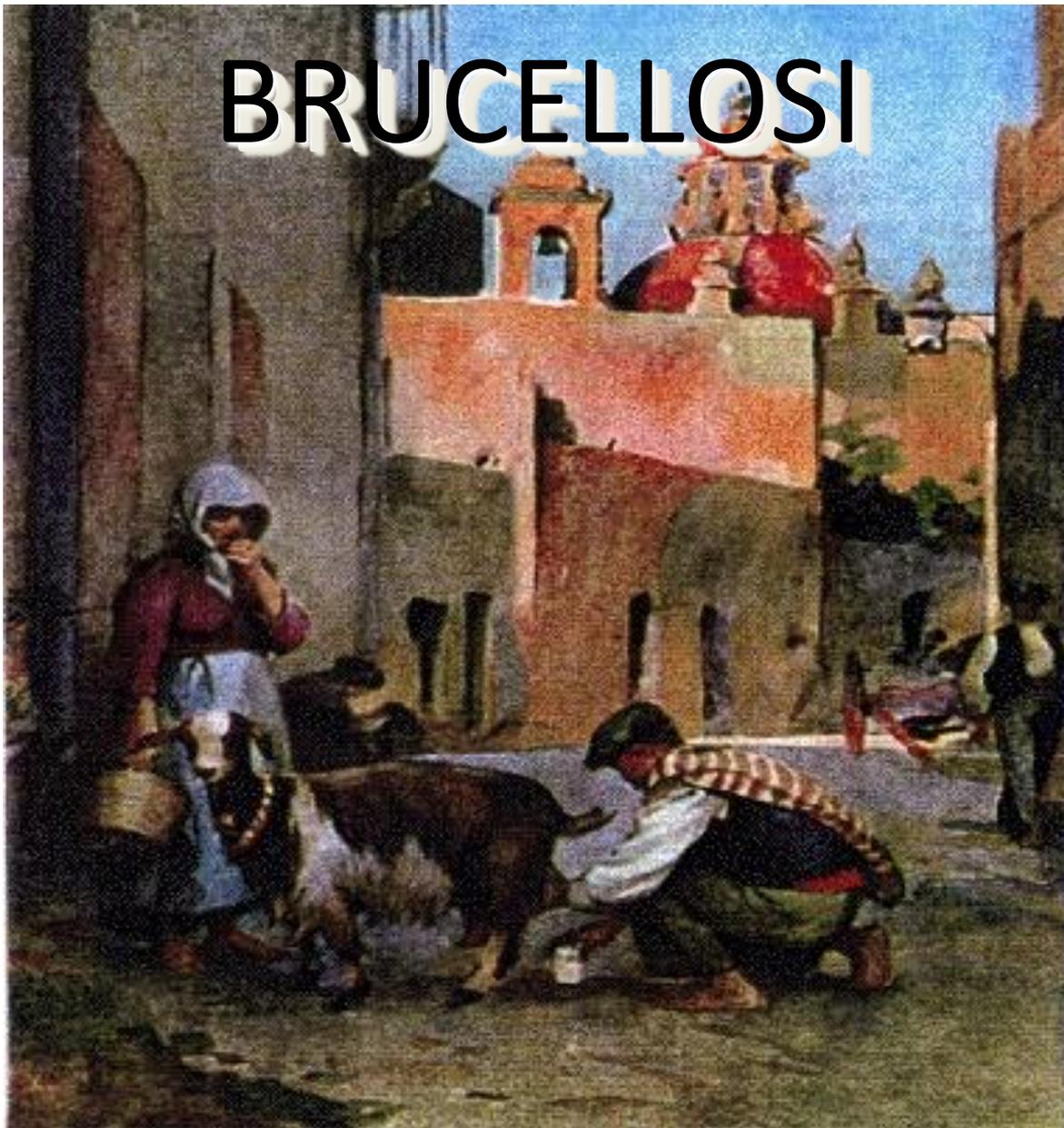


BRUCELLOSI



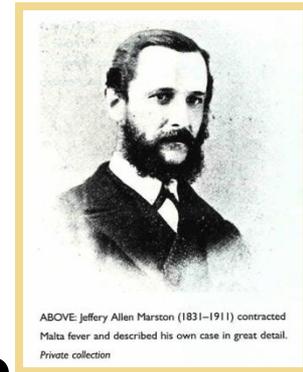
Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Università degli Studi di Padova

Aspetti storici



- Prima descrizione della malattia ➤ 1859
 - Marston descrive una malattia diversa
febbre tifoide



- **Febbre di Malta o Febbre Mediterranea**
 - XIX-XX sec.
 - malattia debilitante cronica, complicanze reumatismi, che colpiva ogni anno un numero elevato di marinai della Marina Navale Reale britannica

Aspetti storici



- isolamento di *Micrococcus melitensis* ➤ 1887 a Malta (Capitano David Bruce) da milza di soldato deceduto
- Commissione ufficiale di studio
- 1905 Zammit dimostra ruolo della capra come *reservoir*



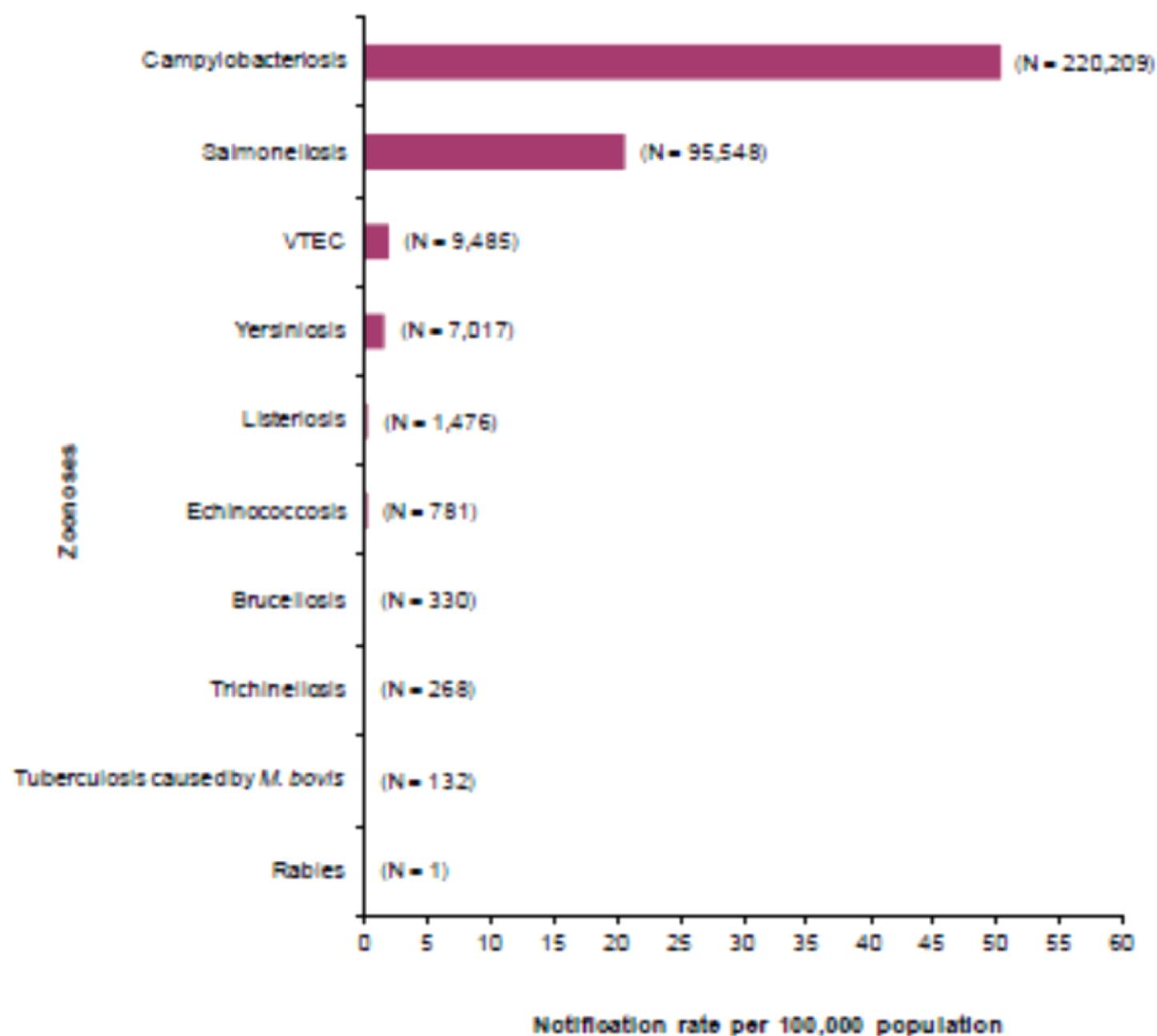
Brucellosi

- Malattia infettiva e contagiosa che colpisce numerose specie animali e l'uomo, sostenuta dal genere *Brucella*
- Tra le malattie che provocano maggiori danni
- Problema economico ➤ ipofertilità, sterilità; produzione latte; malattie vitelli; metriti ed endometriti; riduzione carriera; deprezzamento prodotti; esclusione commercio; spese sanitarie
- Problema sanitario ➤ zoonosi

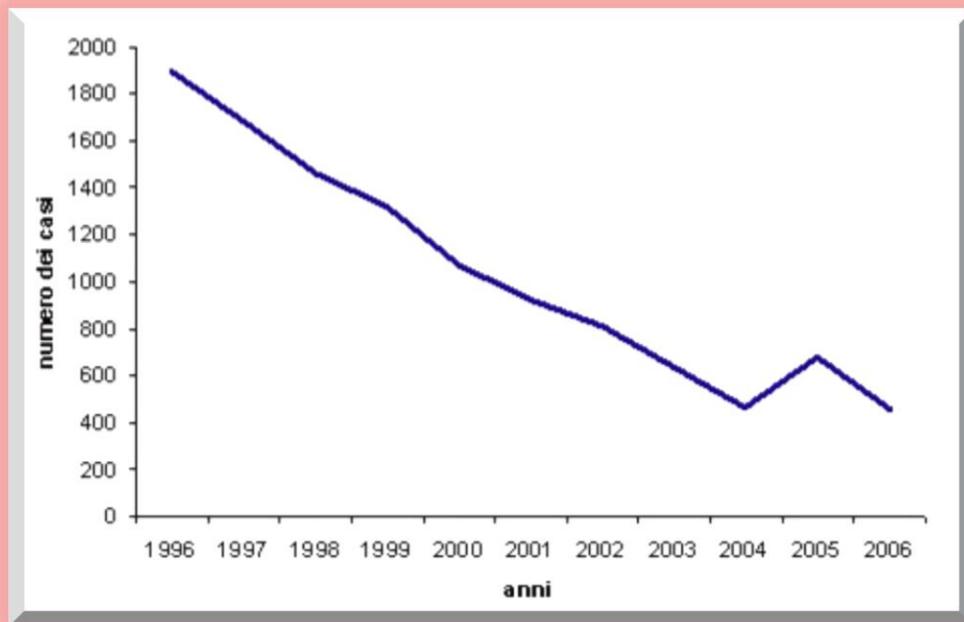
Aspetti generali *Brucella* spp.

- Patogeni importanti sia per la sanità umana sia per la sanità animale
- Determinano infezioni croniche e persistenti nei loro ospiti naturali e anche in ospiti accidentali
- Caratteristica peculiare ➤ capacità di resistere alla fagocitosi da parte di neutrofili e macrofagi
- Cellula *target* ➤ macrofagi dove sopravvivono per periodi prolungati

Figure SU1. Reported notification rates of zoonoses in confirmed human cases in the EU, 2011



Brucellosi nell'uomo in Italia



Anno	M	F	n.i.	Totale
1996	1164	727	5	1896
1997	1025	651	5	1681
1998	904	556	1	1461
1999	818	506	0	1324
2000	645	421	1	1067
2001	548	375	0	923
2002	479	334	0	813
2003	382	249	0	631
2004	293	170	0	463
2005	401	280	0	681
2006	273	182	1	456
2007	45	30	1	76
2008				75
2009				23

Table BR2. Reported cases of human brucellosis in 2007-2011, and notification rates for confirmed cases in 2011. OBF and ObmF status¹ is indicated

Country	2011				2010	2009	2008	2007
	Report Type ²	Cases	Confirmed cases (Imported)	Confirmed cases/100,000				
Austria (OBF/ObmF)	C	5	5 (5)	0.06	3	2	5	0
Belgium (OBF/ObmF)	A	5	5 (5)	0.05	0	1	1	3
Bulgaria	A	2	2	0.03	2	3	8	9
Cyprus	U	0	0 (0)	0	0	0	0	0
Czech Republic (OBF/ObmF)	U	0	0 (0)	0	1	0	1	0
Denmark ³ (OBF/ObmF)	-	-	-	-	-	-	-	-
Estonia (OBF/ObmF)	U	0	0 (0)	0	0	0	0	0
Finland (OBF/ObmF)	U	0	0 (0)	0	0	1	0	2
France ⁴ (OBF)	C	21	21 (20)	0.03	20	19	21	14
Germany (OBF/ObmF)	C	24	24 (14)	0.03	22	19	24	21
Greece	C	100	92 (4)	0.81	97	106	304	101
Hungary (ObmF)	U	0	0 (0)	0	0	0	0	1
Ireland (ObmF)	C	1	1 (1)	0.02	1	0	2	7
Italy ⁵	C	21	21 (0)	0.03	10	23	163	179
Latvia	U	0	0 (0)	0	0	0	0	0
Lithuania	U	0	0 (0)	0	0	1	0	0
Luxembourg (OBF/ObmF)	C	1	1 (1)	0.20	1	0	0	0
Malta	U	0	0 (0)	0	0	0	0	0
The Netherlands (OBF/ObmF)	C	1	1 (1)	0.01	6	3	3	2
Poland (ObmF)	U	0	0 (0)	0	0	3	1	1
Portugal ⁶	C	79	76 (0)	0.71	88	80	56	74
Romania (ObmF)	C	1	1 (0)	<0.01	2	3	2	2
Slovakia (OBF/ObmF)	U	0	0 (0)	0	1	0	1	0
Slovenia (ObmF)	C	1	1	0	0	2	2	1
Spain ⁷	C	54	43 (0)	0.09	78	114	120	201
Sweden (OBF/ObmF)	C	11	11 (9)	0.12	12	7	8	8
United Kingdom (OBF/ObmF) ⁸	C	25	25	0.04	12	17	13	13
EU Total		362	330	0.07	368	404	735	838
Iceland ⁹	U	0	0 (0)	0	0	0	0	0
Norway (OBF/ObmF)	C	2	2 (2)	0.04	2	0	0	0
Switzerland (OBF/ObmF) ¹⁰	C	8	8 (8)	0.10	5	14	5	1

 1. OBF/ObmF: Officially Brucellosis free/Officially *B. melitensis* free in cattle or sheep/goat population.

2. A: aggregated data report, C: case-based report, -: no report, U: unspecified.

3. No surveillance system.

4. In France, 64 departments are ObmF and no cases of brucellosis have been reported in small ruminants since 2003.

5. In Italy, ten regions and nine provinces are OBF and also 12 regions and nine provinces are ObmF.

6. In Portugal, six islands of the Azores are OBF whereas all nine Azores islands are ObmF.

7. In Spain, two provinces of the Canary Islands are OBF/ObmF and the Balearic Islands are ObmF.

8. In the United Kingdom, Great Britain and the Isle of Man are OBF and the whole of the United Kingdom is ObmF.

 9. In Iceland, that has no special agreement concerning animal health (status) with the EU, brucellosis (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*) has never been reported.

10. Switzerland provided data directly to EFSA.



S.I.Ve.M.P. Veneto

SINDACATO ITALIANO VETERINARI MEDICINA PUBBLICA

“... comincia a destare preoccupazione la situazione relativa ai casi di brucellosi contratta da persone residenti in provincia di Agrigento. Nei primi 5 mesi di quest’anno sono stati già 7, uno in più rispetto al secondo semestre del 2011. La malattia è stata contratta a seguito dell’assunzione di latte di pecora o derivati. Il responsabile del Dipartimento prevenzione veterinaria dell’Asp, Salvatore Cuffaro, ha inviato una serie di comunicazioni al prefetto e ai Comuni chiedendo di vigilare adeguatamente e di mettere in campo energie e risorse finalizzate a garantire la salute pubblica ...” (21 maggio 2012)

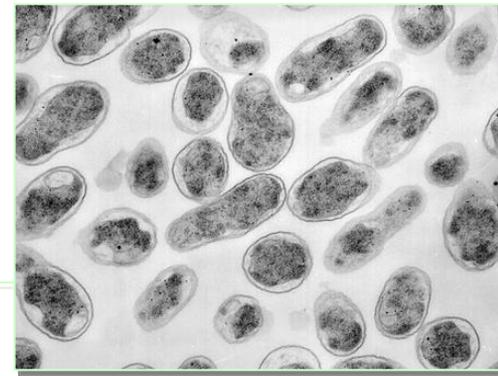


S.I.Ve.M.P. Veneto

SINDACATO ITALIANO VETERINARI MEDICINA PUBBLICA

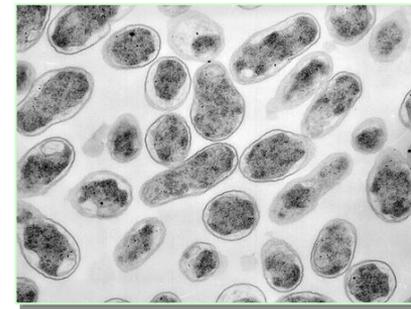
“... i casi accertati in questi ultimi giorni in totale sono sette ma al momento sono soltanto quattro le persone a Canicattì che hanno manifestato i sintomi causati da questa malattia. Tutte, hanno fatto ricorso alle cure dei medici dell’ospedale Barone Lombardo. Gli altri casi sospetti sono tre di cui due segnalati dai medici di famiglia. In questi casi l’aver contratto la malattia deve essere subito denunciato al medico o alle autorità sanitarie. La preoccupazione è quella che ci possa essere qualche allevamento in zona che usa latte infetto nella produzione di formaggi e latticini. Per questo a breve partiranno dei controlli accurati sugli allevamenti anche dell’intera provincia. I sintomi, della brucellosi, sono vari e simili a quelli dell’influenza: febbre, mal di testa, mal di schiena e debolezza. Ma possono manifestarsi anche pericolose infezioni al sistema nervoso centrale e in alcuni casi si hanno cronicizzazioni, caratterizzate da febbri ricorrenti, stati di affaticamento, dolori alle articolazioni. La terapia per questa infezione può presentare problemi. I medici possono, infatti, prescrivere antibiotici, che vengono usati in combinazione per un periodo di 6 settimane, per evitare ricadute. Nei casi più gravi è necessario anche il ricovero ospedaliero. Per quanto riguarda la prevenzione, ad oggi non si hanno ancora vaccini per gli esseri umani, e il consiglio generale è quello di non consumare prodotti non pastorizzati. Intanto, ieri mattina in municipio si è svolta una conferenza di servizi proprio per affrontare il problema. Alla riunione oltre al sindaco di Canicattì Vincenzo Corbo erano presenti i rappresentanti di polizia, carabinieri e vigili urbani ed il responsabile del servizio veterinario dell’Asp Giuseppe Licata. «La decisione adottata – ha detto il medico- è quella di fare partire dei controlli a tappeto da parte delle forze dell’ordine e del servizio veterinario per cercare di evitare che formaggi e latticini vengano venduti al di fuori dei circuiti ufficiali come ad esempio per strada sui marciapiedi, sulle bancarelle oppure all’interno dei bagagliai di autovetture come spesso accade. Il servizio – ha aggiunto Giuseppe Licata- stavolta però non toccherà soltanto i venditori ma le forze dell’ordine ed anche i nostri uomini avranno il compito di multare i compratori che acquistano in maniera rischiosa gli stessi prodotti. Controlli che saranno comunque preceduti da una campagna di informazione per mettere a conoscenza chi acquista prodotti non pastorizzati e di dubbia provenienza dei rischi ai quali va incontro per la propria salute». Nei prossimi giorni in tal senso il sindaco di Canicattì emetterà una apposita ordinanza...” (1 aprile 2012)

Eziologia



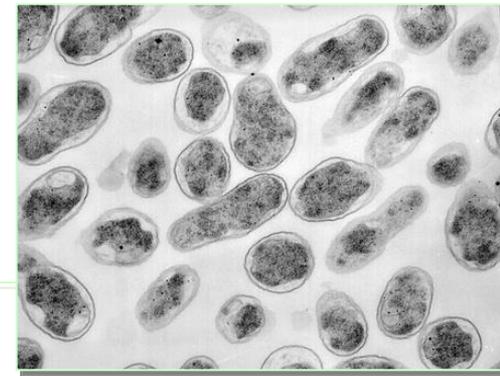
- genere *Brucella*
 - microrganismi patogeni per gli animali domestici e per l'uomo (ad eccezione di *B. neotomae*)
 - non si moltiplicano nell'ambiente esterno
 - ciclo epidemiologico ospite-ospite
 - sempre intracellulari, tranne poco prima della disseminazione
- provocano infezione cronica con sintomatologia a carico degli organi della sfera genitale o spesso forme inapparenti

Classificazione



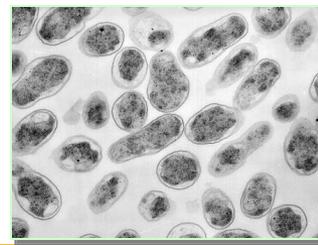
- Primo isolamento
 - 1887 Bruce *B. melitensis*
 - 1897 Bang *B. abortus*
 - 1914 Traum *B. suis*
 - 1953 Buddle e Boves *B. canis*
 - 1957 Stoenner e Lackman *B. ovis*
 - *B. neotomae* *B. neotomae*
 - 1968 Carmichael
 - 1994 Brucella mammiferi marini (2001 *B. cetaceae* e *B. pinnipediae*)
- sistema di classificazione classico ➤ basato su distinzione in specie e biovarianti
 - ampio spettro ospite, ma ciascuna ha specie d'elezione
 - stabilità genetica tra specie
 - biovarianti ➤ caratteristiche biochimiche (assunzione di substrati, lisi fagica, esigenza CO₂, produzione H₂S, sviluppo su terreni con coloranti) e reattività (agglutinazione) verso antisieri monospecifici (anti-R)

Spettro ospite



Specie	<i>B. abortus</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. suis</i>	<i>B. ovis</i>	<i>B. canis</i>	<i>B. neotomae</i>
Biov	7	3	5			
Uomo	+	+	+	-	+	-
Bovino	+	+	-	-	-	-
Bufalo	+	-	-	-	-	-
Ovi-caprino	+	+	-	+	-	-
Suino	+	-	+	-	-	-
Cane	±	±	±	-	+	-
Equino	+	+	+	-	-	-

Spettro d'ospite



Specie	Biovar	Ospiti naturali	Uomo
<i>B. abortus</i>	1-6, 9	bovino	Sì
<i>B. melitensis</i>	1-3	ovino, caprino	Sì
<i>B. suis</i>	1, 3	suino	Sì
	2	lepre	Sì
	4	renna, caribou	Sì
	5	roditori	Sì
<i>B. canis</i>	none	canidi	Sì
<i>B. ovis</i>	none	ovino	No
<i>B. neotomae</i>	none	Desert wood rat	No
<i>B. maris</i>		Mammiferi marini	?

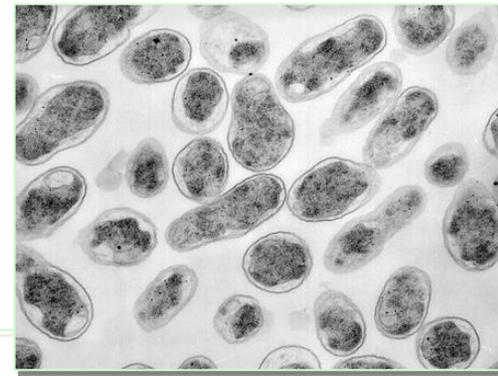


Brucella ovis in montone

BRUCELLOSI

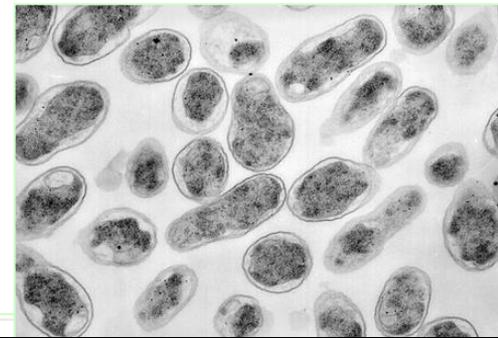
- Recettività
 - Fattori legati alla *Brucella*
 - Qualitativi
 - Quantitativi
 - Fattori legati all'ospite
 - Specie
 - Età (pubertà)
 - Sesso
 - Stato fisiologico (gravidanza)

Caratteristiche morfologiche



- bacillare/bastoncellare (0.6-1.5 x 0.5-0.7 μm), singoli
- privi di capsula
- non mobili: non producono flagelli
- asporigeni
- normalmente in fase:
 - Fase S ➤ *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*
 - Fase R ➤ *B. ovis*, *B. canis*
- intracellulari facoltativi
- non emolitici

Caratteristiche colturali/colorazioni



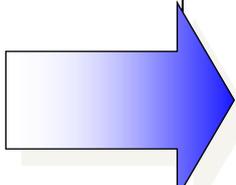
- aerobi,
 - microaerofili ➤ *B. abortus*
(primo isolamento) e *B. ovis*
- mesofili, range 20-40°C
- pH neutro (6,6-7,4)
- Gram negativi, Macchiavello
Colorazione di Köster
- Ziehl-Neelsen modificata
(Stamp)



Terreni di coltura



- germi *fastidious*
- ordinari (aggiunta siero o sangue)
 - crescita stentata
- selettivi (aggiunta di glucosio, siero bovino, siero equino, glicerina e addizionati di antibiotici, antibatterici e antifungini)
 - terreno di Albimi
 - agar glicerina destrosio
 - agar patata glicerinato
 - agar siero destrosio
 - agar tryptose
 - agar trypticase soy



crescita lenta
(48 ore-5/7 giorni):
colonie 3-4 mm,
traslucide, lisce,
a margini netti,
lievemente azzurrognole

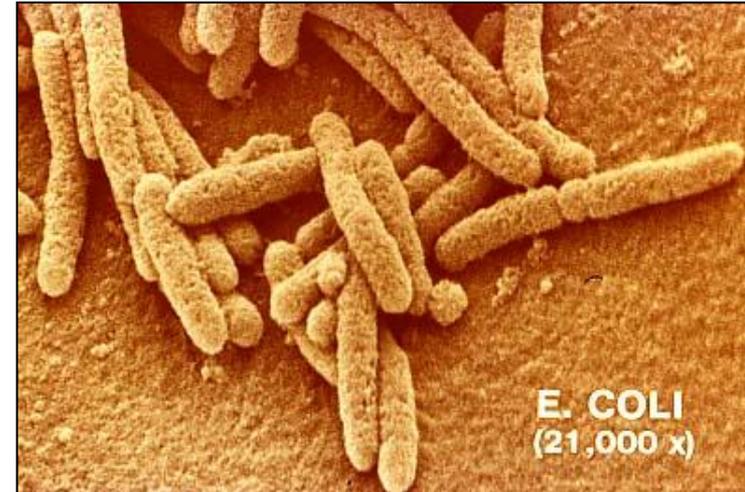
Caratteristiche distintive: Eritritolo

- tutte le Brucelle utilizzano eritritolo come fonte di carbonio preferenziale, caratteristica unica tra i batteri
- eritritolo stimola la crescita batterica
- eritritolo associato a virulenza? ➤ alcuni ceppi non virulenti non sono in grado di utilizzare eritritolo ➤ non è stata confermata virulenza legata a utilizzo eritritolo

Correlazioni antigeniche e resistenza

- Correlazioni antigeniche

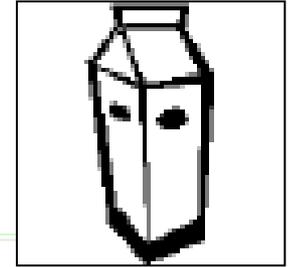
- *Francisella tularensis*
- Salmonelle gruppo N (O:30)
- *E. coli* (O:157)
- *Yersinia enterocolitica* (O:9)



- Resistenza

- Ampie possibilità di sopravvivenza anche in condizioni poco favorevoli
- Dipende dalla quantità e dal tipo di materiale in cui sono contenute

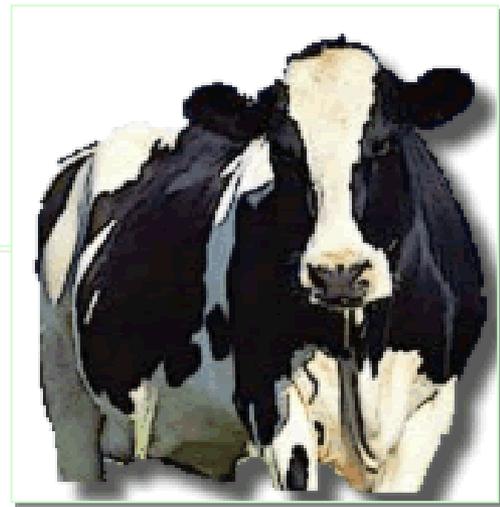
Resistenza



Clima freddo umido	++	Latte crudo	++
Luce solare diretta	-	Burro	++
Essiccamento (proteine)	++ (10 sett)	Formaggi freschi	++
Putrefazione	+	Formaggi stagionati	+ (ferm. 3 m)
H ₂ O	++	Carni fresche, salate o affumicate	+
pH acido	++	Carni surgelate	++
Foraggi freschi (erba/pascolo)	++	Congelamento	++ (anni)
Foraggi essiccati	-	Contatto (cute)	+
Foraggi conservati	+/-	Disinfettanti (tutti)	-- (mat. org.!)
Liquami	++	Antibiotici	-
Letame	+ (3 sett)	(buona penetrazione cell)	
Temperatura	+		
(55°C x 3h; 65°C x 15')			
Temp. pastorizzazione	-		

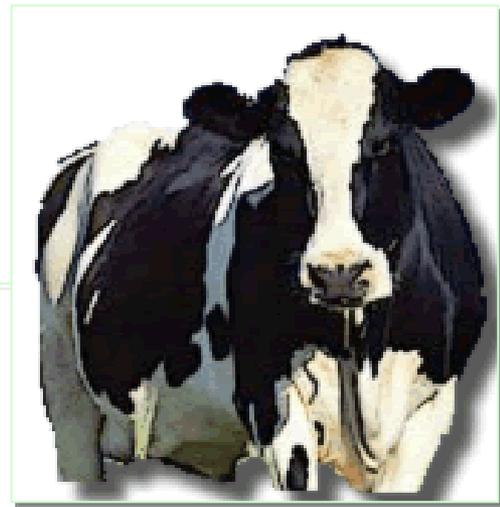


BRUCELLOSI BOVINA



- **Malattia ex lista B OIE e zoonosi**
- *B. abortus*
 - biovar 1 cosmopolita
 - biovar 2 in associazione a biovariante 1 in America Nord e Sud
 - biovar 3 Africa e Asia
 - biovar 4 in associazione a biovariante 1 in America Nord e Sud
 - biovar 5 rara (occasionalmente isolata in Germania e UK)
 - biovar 6 Africa e Asia
 - biovar 9 rara (occasionalmente isolata in Germania e UK)
 - 1, 2, 3, 4, 6 in Italia
- *B. melitensis*
- *B. suis*

B. abortus



- Specie colpite
 - bovini
 - principalmente biovar 1
 - cammello (*Camelus bactrianus*), dromedario (*Camelus dromedarius*)
 - bufalo domestico (*Bubalus bubalus*), bufalo africano (*Syncerus caffer*)
 - bisonte
 - alce
 - antilopi africane
 - cavallo
 - volpe
 - coyote



entrata in allevamento

- introduzione di bovine infette sintomatiche e asintomatiche ➤ (sieronegatività)
 - scambi di vitelli/bovine
 - entrata camion scarti
- altri animali
- vicinanza allevamenti infetti
 - spargimento liquame
- acque



epidemiologia

- Trasmissione
 - dipende da
 - numero di brucelle escrete dagli animali infetti
 - sopravvivenza ambientale
 - esposizione animali sensibili
 - Vie di penetrazione nell'organismo: mucosa orale, nasofaringe, congiuntivale, respiratoria, vaginale, cutanea (soluzioni di continuo)

diffusione in allevamento

- Infezione più frequente:
 - Ingestione di alimento, acqua, colostro e latte contaminato
 - Leccamento e/o contatto con placenta o apparato genitale di animale che ha abortito o partorito di recente
- Materiale e strumenti d'allevamento, parto o FA contaminato
- Dimensione mandria e densità popolazione
- Tipologia allevamento ➤ stabulazione libera/fissa
- uso di sale parto ➤ lettiera permanente
- vaccinazione ➤ diminuisce escrezione

fonti di diffusione in allevamento

- Secrezioni utero-vaginali, feto, liquidi, involgii fetali: 1.000-10.000 miliardi di microrganismi
 - aborto
 - parto prematuro
 - parto a termine infettante
- Portatori latenti
 - Infezione durante ultimo periodo gestazione
 - Vitelli nati da madre infette: diventano eliminatori solo con maturità sessuale
- Colostro e latte
 - 80% bovine infette

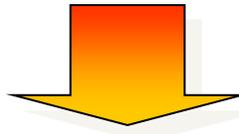
fonti di diffusione in allevamento

- Fecondazione (naturale e artificiale)
 - Trascurabile possibilità di infezione attraverso *embryo-transfert*
- Urine, feci
 - Raramente
- Animali selvatici
 - Ruminanti, cinghiali, mustelidi (UK), marsupiali (NZ)
 - Insetti (vettori passivi)
 - Zecche

patogenesi

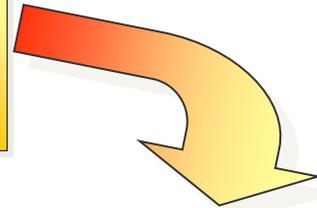
sede di ingresso

via linfatica



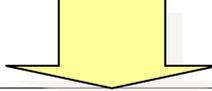
monociti

LINFONODI REGIONALI
Iperplasia cellule SRE



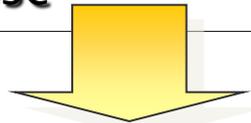
**INFEZIONE
SOTTO CONTROLLO**

BATTERIEMIA PRIMARIA



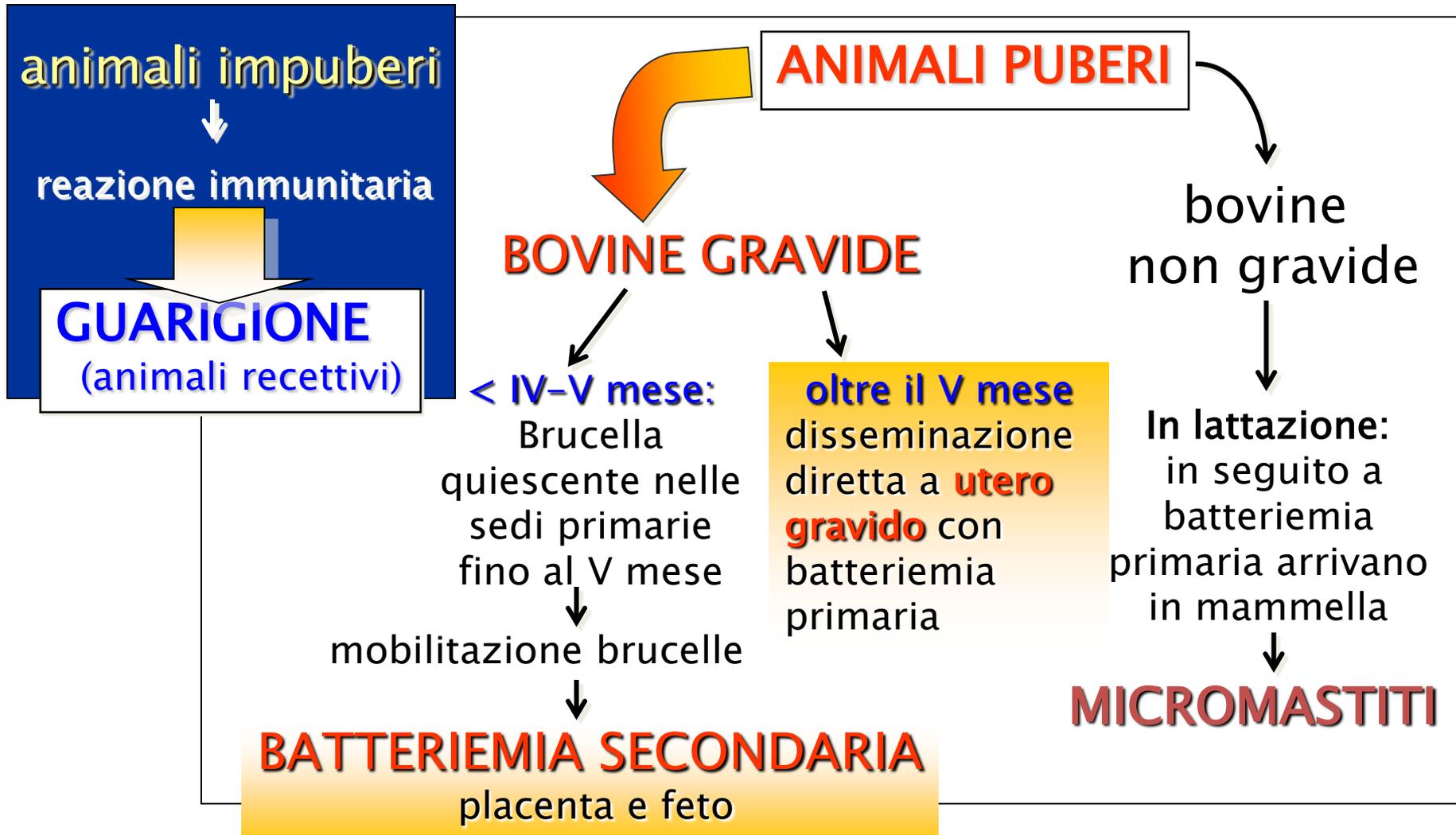
fegato, milza, midollo osseo, linfonodi
• Iperplasia cellulare: lesioni
granulomatose

animali impuberi



ANIMALI PUBERI

patogenesi



patogenesi

UTERO GRAVIDO
(oltre il V mese)



ERITRITOLO e altri fattori liquido allantoideo

- oltre il IV mese
- in % < in vescicole seminali e testicoli
- non c'è negli impuberi

COTILEDONITE

processo fibrinoso necrotico-purulento

- interruzione scambi nutritivi
- tenaci aderenze tra corion e matrice
- per via ematica/attraverso il liquido amniotico invade il feto: infezione acuta generalizzata e

MORTE FETALE



Patogenesi

- Penetrazione e moltiplicazione nel sito di ingresso
- Periodo primario
 - Reazione infiammatoria con richiamo di polimorfonucleati neutrofili e monociti
 - Diffusione ai linfonodi
 - Persistenza per lungo periodo a livello linfonodale
 - Esaurimento infezione (giovani)
 - Diffusione per via linfoematogena
- Disseminazione a vari tessuti di tutto l'organismo (batteriemia primaria) attraverso circolo ematico (macrofagi): lesioni granulomatose

Patogenesi

- Esaurimento e localizzazione brucelle
 - Animali impuberi: estinzione ma recettività ulteriore
 - Animali puberi: batteriemia secondaria
- V mese di gestazione: d-eritritolo
- Processo infiammatorio fibrinoso-necrotico-purulento
- Testicoli, vescicole seminali
- Periodo secondario
- In relazione a fattori di resistenza e immunitari
 - Guarigione batteriologica
 - Persistenza

Patogenesi

- **ABORTO**
- Aumento dell'eritritolo nell'utero gravido e nella placenta
- Moltiplicazione di *Brucella* nella mucosa uterina
- Penetrazione nelle cellule placentari e del corion
 - Endometrite con ulcerazione dell'epitelio uterino e placentare
 - Processo essudativo: accumulo di essudato tra mucosa uterina e corion
 - Processo proliferativo (cell. connettivali)
 - La placenta si fissa abnormemente alla mucosa uterina
 - Disturbi della circolazione placentare
 - Cattiva nutrizione fetale

Patogenesi

- **ABORTO**
- Brucella raggiunge il feto
 - Morte (setticemia, disturbi di circolazione)
 - LPS, aumento tasso cortisolo: *shift* ormonale
- Aborto
 - Caduta del tasso di eritritolo in utero
 - Scomparsa di brucella in tempo variabile
- Persistenza
 - Linfonodi, mammella, SRE

Risposta immunitaria

- Induce risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata
- Umorale
 - Simile in tutte le specie
 - Diretta principalmente contro la struttura antigenica di maggiore importanza: LPS, in particolare nei confronti della catena O (ruolo protettivo importante: lisi batterica, attivazione complemento VC; opsonizzazione)
 - Modificazione della capacità di sopravvivenza in cellule fagocitarie
 - proteine

Risposta immunitaria

- Ab evidenziabili in siero, latte, muco vaginale, sperma
- Comparsa: puberi 4-10 sett. (1-6 mesi)
- Cinetica siero
- IgM scompaiono dopo qualche mese (persistenza maggiore nel vaccinato)
- IgG non conferiscono protezione elevata (no estinzione infezione, rallentamento diffusione, protezione colostrale relativa; interferenza con la vaccinazione; diagnostica)
 - IgG1: anni (vaccinato scarse e transitorie)
 - IgG2: mesi con fluttuazioni
- IgA: secrezioni, a lungo

Risposta immunitaria

- Cellulo-mediata
 - Proteine
 - Quattro tappe
 - Macrofagi infetti liberano citochine ($\text{TNF}\alpha$ e IL12)
 - Linfociti precursori si differenziano in T1
 - Risposta di tipo 1 e di tipo 2
 - 1: $\text{IFN}\gamma$, IL2; IgG2
 - 2: IL4, IL5; IL10; IgG1 e IgE
 - T1: Thelper e Tcitotossici (proliferazione e produzione di $\text{IFN}\gamma$)
 - $\text{IFN}\gamma$ ruolo essenziale nel controllo dell'infezione
 - Stimolo attività battericida macrofagi
 - Stimolo attività battericida PMN, liberazione radicali liberi
 - Stimolo al passaggio da IgM e IgG

Risposta immunitaria *Brucella* spp.

- **IFN- γ** ➤ cruciale per il controllo brucellosi
 - diversi livelli produzione indicano resistenza o suscettibilità a *Brucella* spp.

**topi resistenti ➤
produzione IFN- γ alti livelli
e per tutta la durata
dell'infezione**

**topi suscettibili ➤
produzione IFN- γ
elevatissima ma solo
all'inizio ➤ poi sostituita da
meccanismo alternativo per
il controllo *Brucella* che
coinvolge CD8 e TNF- α**

sintomatologia

- Decorso cronico, spesso inapparente
- **ABORTO NELLE BOVINE**
 - tra il IV-VIII mese (> V-VI mese)
 - tempo infezione-morte fetale: variabile
 - aborto senza segni premonitori, ritenzione placentare e metrite
 - possibilità di parti prematuri, mortinatalità e parti a termine infettanti
 - nati infetti (aborto prima gestazione)

sintomatologia

- **PROCESSI INFIAMMATORI ORGANI GENITALI MASCHILI**
 - forma cronica (acuta)
 - orchite mono- o bilaterale; epididimite, coinvolgimento vescicole seminali
- **MASTITE BRUCELLARE**
 - modica riduzione produzione e alterazione parametri fisico-chimici
- **LOCALIZZAZIONI ARTICOLARI**
 - Igroma mono- o bilaterale (articolazione del carpo): 66% degli animali cronici

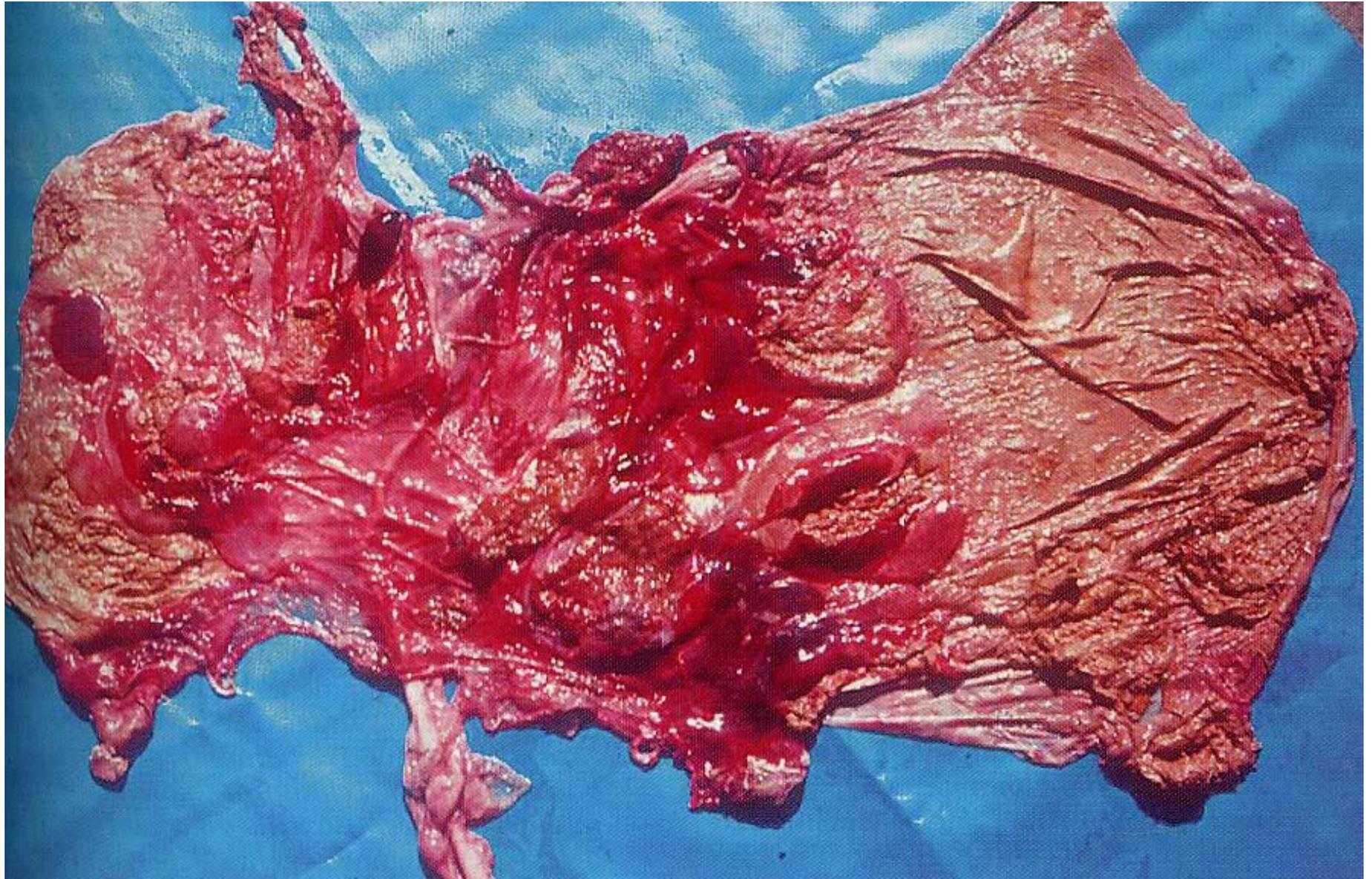






lesioni

- Alterazioni istopatologiche specifiche, ma variabili e incostanti
- Linfadenite locale, iperplasia linfoide, grande infiltrazione di mononucleati, con qualche neutrofilo e eosinofilo
- Utero
 - Endometrite (vari stadi): essudato grigio viscoso con flocculi purulenti di volume variabile
 - Cotiledoni grigio-gallastri, necrotici ricoperti di essudato viscoso bruno privo di odore
 - Placenta ispessita edematosa e con essudato (emorragico)
 - Lesioni vascolari, trombosi



lesioni

- Aborto
 - Edema sottocutaneo importante (gelatinoso)
 - Cavità splancniche contenenti liquido sieroemorragico
 - Pleuropolmonite
 - Petecchie e soffusioni cardiache
- Mammella
 - Ipertrofia linfonodi sopramammari
- Testicoli
 - Necrosi multifocale o diffusa a carico del parenchima testicolare e dell'epididimo
 - Stato cronico: lesioni granulomatose

Brucellosi nell'uomo

- Malattia professionale (allevatori, veterinari, macellatori, laboratoristi)
- Modalità di infezione
 - Ingestione (latte e derivati, vegetali e acqua contaminati)
 - Contatto cute e congiuntiva (feto, essudato vaginale, latte, urine, letame, carcasse, visceri e sangue, colture)
 - Inalazione (pulviscolo mattatoio, ricoveri, laboratori produzione antigene...)
 - Inoculazione accidentale

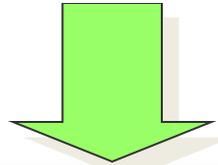
Brucellosi nell'uomo

- Asintomatico un caso su due
- Principali manifestazioni nell'uomo
 - Incubazione: 5-30 giorni-alcuni mesi
 - Periodo prodromico: cefalea, astenia, depressione, insonnia, artralgia, dolori addominali, febbre
 - Periodo di invasione: accentuazione sintomi prodromici; febbre (40-41 °C) remittente, ma talora costante; splenomegalia e epatomegalia
 - Periodo della localizzazione: brividi, sudorazione intensa, stanchezza, prostrazione, artrite, nevralgia; orchite, epididimite mono o bilaterale
 - Infezioni acute simil-influenzale
 - Infezioni croniche: sintomi variabili, complicanze nervose, ascessi localizzati, osteoartrite anca, spondilite, esantema fugace, endocardite, stenosi aortica, vomito, diarrea, nausea....

diagnosi

DIAGNOSI CLINICA DI SOSPETTO

- aborti
- parto prematuro, natimortalità
- ritenzioni placentari
- lesioni fetali
- metrite, sterilità,
- orchite, epididimite



DIAGNOSI DI LABORATORIO

(accorgimenti per trattare il materiale sospetto)

DIRETTA

agente eziologico

INDIRETTA

anticorpi specifici
risposta cellulo-mediata

Diagnosi *Brucella*

- Strategie diagnostiche
 - identificazione agente eziologico ➤ metodo *gold standard* (identificazione microrganismo isolato) e PCR
 - controllo brucellosi ➤ test di screening (test sierologico agglutinazione) e secondo test di conferma

diagnosi differenziale

- Sintomi tardivi e poco specifici
- Diagnosi di laboratorio
- Necessità di considerare:
 - *Trichomonas foetus*;
 - *Campylobacter foetus*;
 - *Leptospira pomona*;
 - *Listeria monocytogenes*;
 - *Coxiella burnetii*;
 - *Aspergillus*;
 - BVD;
 - IBR.

Diagnosi diretta

Metodiche utilizzate

- 1. ESAME MICROSCOPICO**
- 2. ESAME COLTURALE**
- 3. PROVA BIOLOGICA**
- 4. PCR, DNA probes**

Esame microscopico

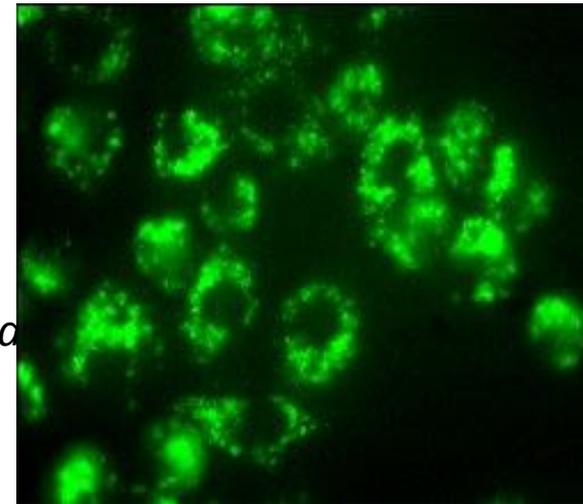
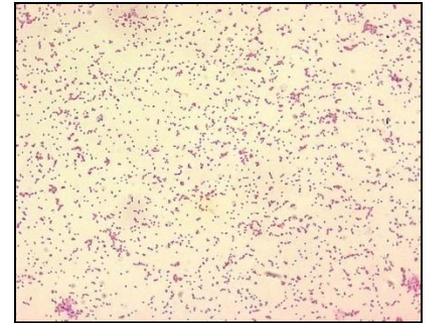
- Strisci ottenuti da
 - cotiledoni placentari, secrezioni vaginali
 - polmone, fegato e contenuto abomasale fetali
- Colorazioni:
 - Stamp, Köster, Macchiavello, Gram
- IF



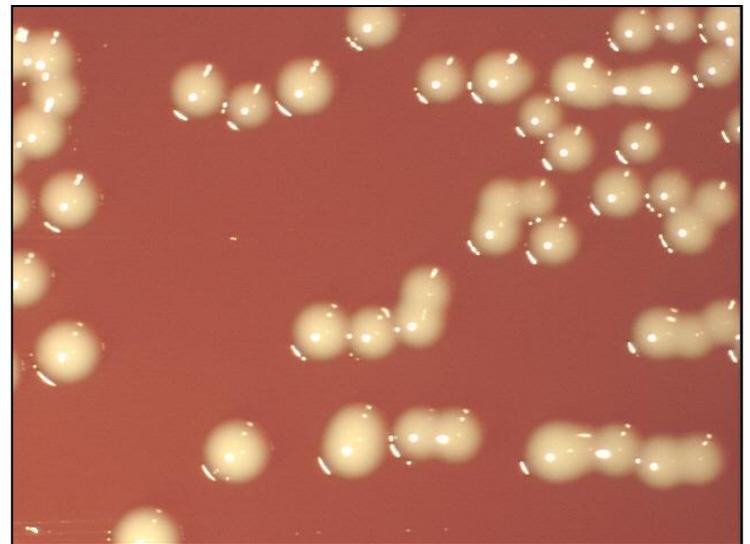
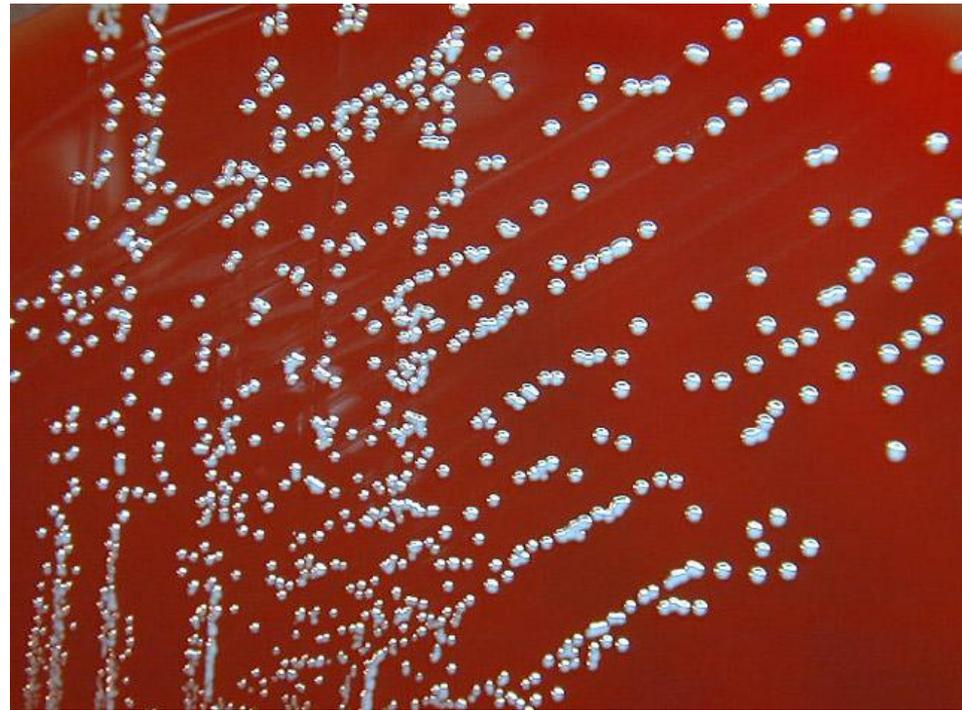
POSITIVO: aggregati intracellulari

D.D. morfologia simile: *Coxiella burnetii*, *Chlamydia*
cross-reattività: *Yersinia*

- DNA-probes, PCR



Esame colturale



Esame culturale

- Prove per l'identificazione microbiologica
 - controllo fase (soluzione di acriflavina 0.1%):
 - sospensione uniforme = colonie lisce
 - formazione agglutinati = colonie fase R
 - prove di agglutinazione con antisieri specifici
 - identificazione ➤ centri di referenza
- Problematiche esame *gold standard*
 - tempi lunghi
 - test complicati per l'identificazione di *Brucella*
 - agente zoonosico ➤ pericolo per l'operatore

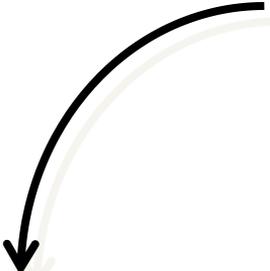
Prova biologica

- Modeste quantità di brucelle
- Cavia: via sc/im
 - infezione cronica con lesioni necrotiche fegato, splenomegalia, aspetto nodulare milza.

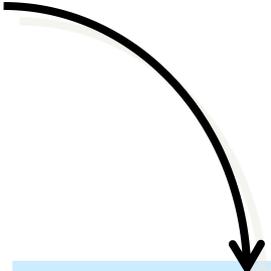


PCR, DNA probes

- caratterizzazione genetica basata su PCR ➤
risoluzione problemi metodo *gold standard*
- messe a punto **numerose metodiche di PCR** ➤
scelta sequenze tipiche in base all'esigenza
diagnostica



PCR genere specifica



PCR specie specifica

PCR, DNA probes

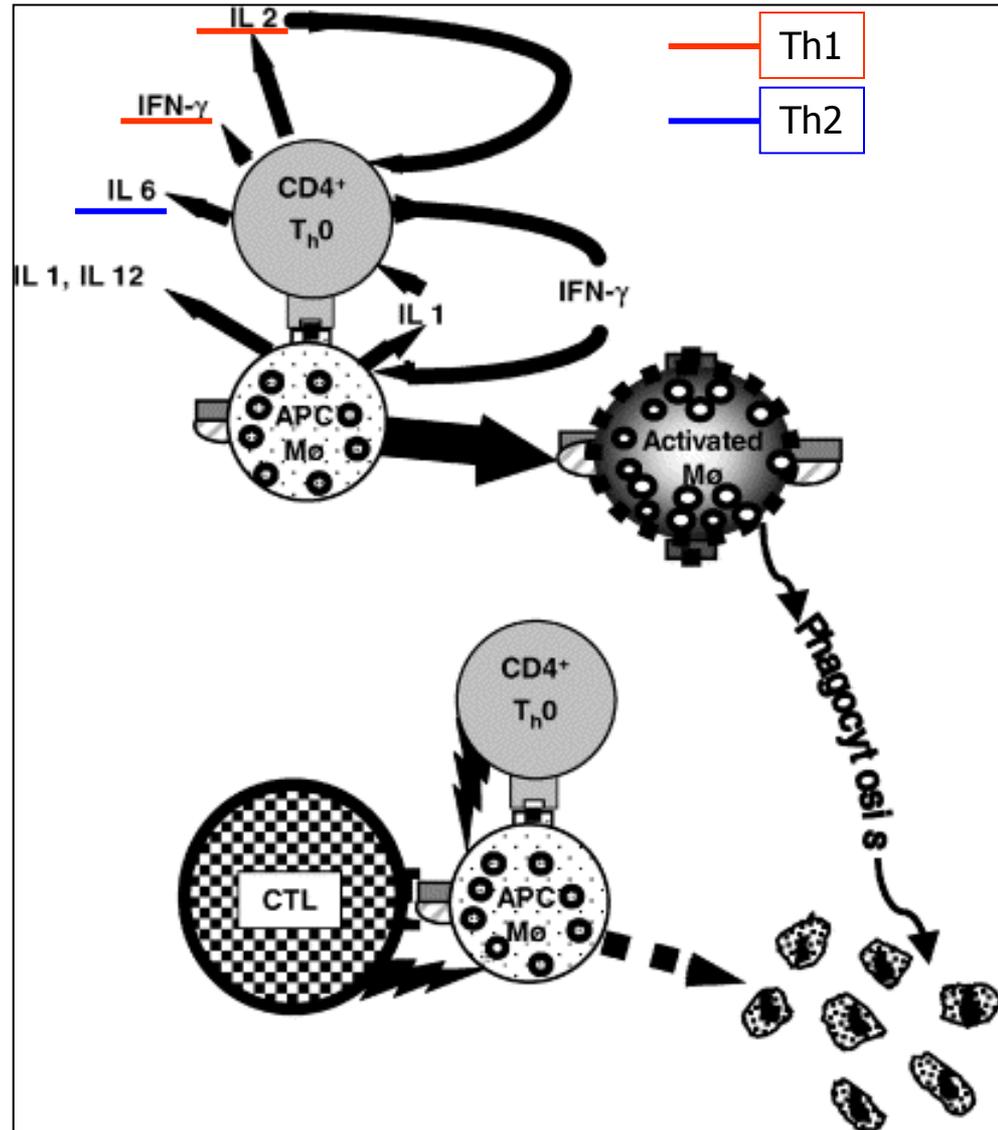
- PCR genere-specifica ➤ quando identificazione *Brucella* spp è sufficiente
 - diagnosi brucellosi umana, contaminazione prodotti alimentari
 - target rappresentato da gene *Brucella BCSP31* e sequenza intergenica 16S-23S rRNA
 - metodiche semplici, robuste e non alterate da influenze ambientali

PCR, DNA probes

- PCR specie-specifica ➤ quando identificazione della specie di *Brucella* spp è necessaria
 - programmi di eradicazione, studi epidemiologici
 - metodiche più complesse e di più difficile esecuzione
 - diverse strategie ➤ es. locus specific multiplex (AMOS-PCR basata su IS711), PCR-RFLP (locus *omp2*), arbitrary-primed PCR, ERIC-PCR

Diagnosi indiretta

- si basa sull'evidenziazione della risposta immunitaria nei confronti di *Brucella*
- presenza di T_h0 con produzione sia di $IFN-\gamma$ sia di $IL-4$



Diagnosi sierologica

- Risposta anticorpale
 - IgM precoci ➤ produzione IgG1 immediatamente dopo ➤ produzione successiva IgG2 e IgA
 - IgG2 e IgA prodotte tardivamente e a bassi livelli
 - IgG1 isotipo di elezione per la diagnosi sierologica
- animali vaccinati e infetti non distinguibili sierologicamente
 - messa a punto di strategie diagnostiche per distinguere vaccinati da infetti
 - sviluppo di vaccini con bassissimo livello di O-LPS

Test sierologici in uso

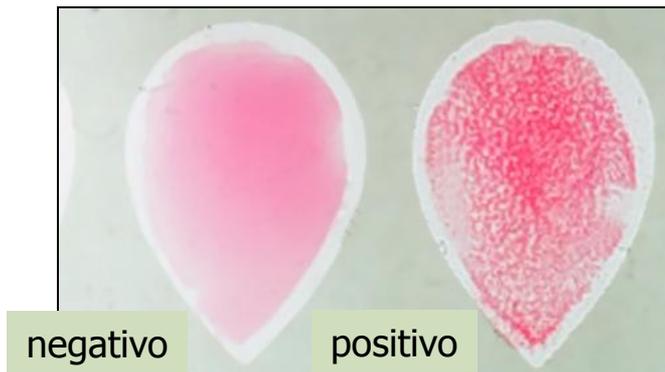
- Test di agglutinazione
- Fissazione del complemento
- Test di precipitazione
- Enzyme immunoassay
- Fluorescence polarization assay (Canada; America latina)

Test di agglutinazione

- Standard tube agglutination test (SAT)
 - Sieroagglutinazione di Wright (SAW) ➤ primo test
 - esecuzione ➤ diluizioni scalari di siero in esame in provette e incubazione per 20 ore ➤ valutazione opacità in riferimento a % standard di agglutinazione ➤ POSITIVO ≥ 30 UI/ml
 - IgM sono gli anticorpi più attivi a Ph neutro (IgM e IgG2: no cronici; no distinzione vaccinati) ➤ reazioni false positive ➤ non raccomandato da OIE
 - metodiche per inattivare agglutinine IgM
 - Antigene acidificato
 - rose/bengal test (RBT), card test; precipitazione con rivanolo; agenti riducenti
- Utile in fase iniziale programma di eradicazione
Utilizzato in Africa del Sud

Test di agglutinazione

- RBT (rose/bengal plate agglutination test) e card test
 - metodo di *screening* ➤ test standardizzato, facile, veloce, economico
 - antigene ➤ *B. abortus strain 99* o 1119-3 (fase liscia) acido (pH 3.6) e colorato con Rosa Bengala ➤ pH basso blocca agglutinazione da parte di IgM e favorisce IgG1 ➤ riduzione reazioni aspecifiche
 - IgM Ab più attivi a Ph neutro ➤ reazioni false positive
➤ non raccomandato da OIE



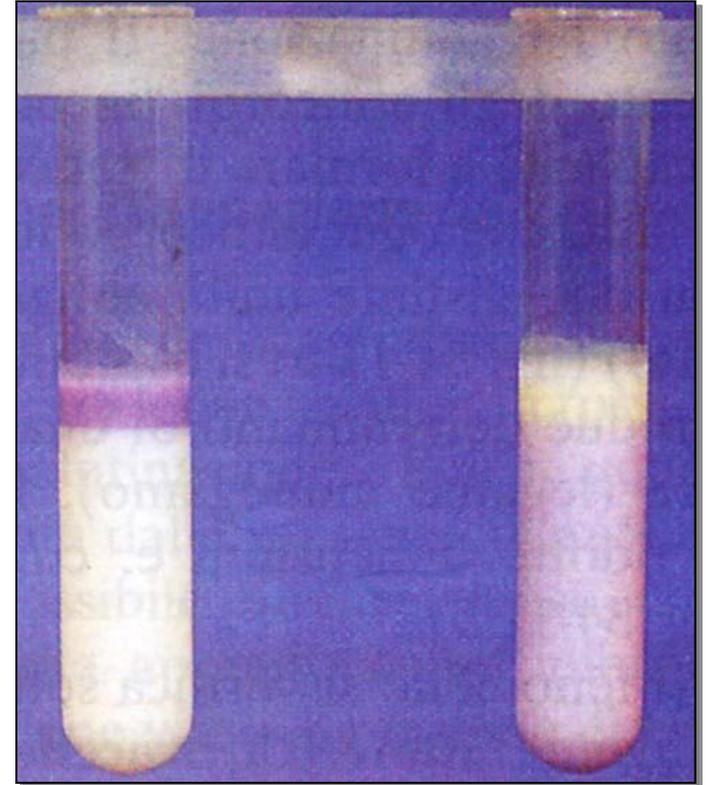
**esecuzione della prova e lettura
dopo 4 minuti**

**POSITIVO ➤ agglutinazione (di
qualsunque grado)**

Test di agglutinazione

- *Milk ring test*

- prova di agglutinazione sul latte ➤ > IgA, < IgM e IgG
 - 1 ml latte mantenuto a 4°C per 24 ore (se latte di massa: 3 ml)
 - una goccia di antigene (*whole cell*) colorato con ematossilina (blu) o trifetil- tetrazolio (rosa)
 - incubazione a 37°C per un'ora e lettura
 - POSITIVO: anello di panna colorato e latte bianco
 - NEGATIVO: anello di panna bianco e latte colorato

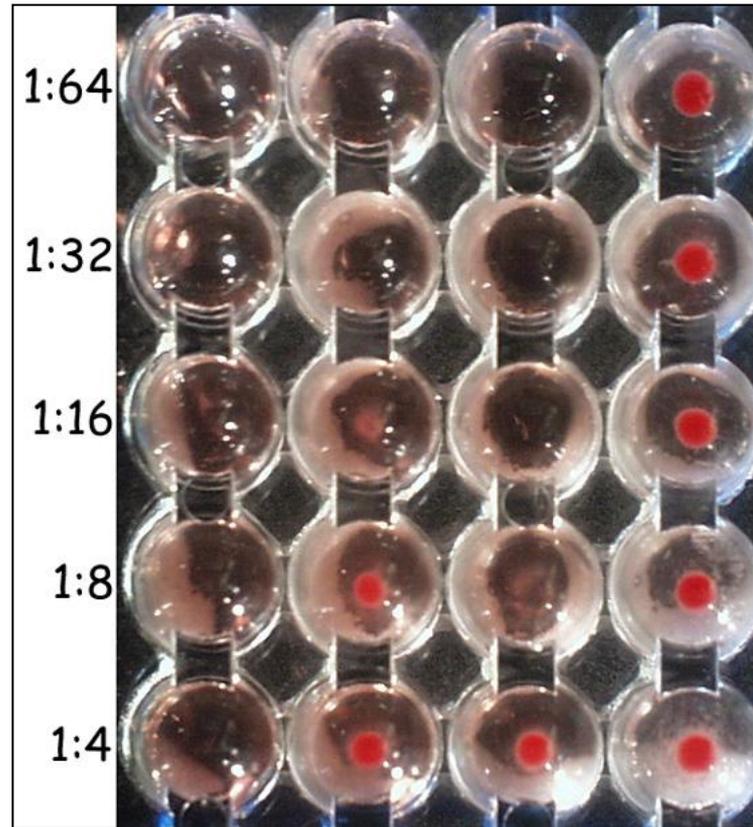


**raccomandato da
OIE come metodo
*screening***

Fissazione del complemento (CFT)

- test di elezione e di conferma ➤ raccomandato da OIE
 - > sensibile e specifico ➤ riconosce > le IgG1
- tecniche di esecuzione standardizzate
 - in micrometodo
 - antigene *B. abortus* strain 99 o 1119-3 (fase liscia)
 - siero in esame ➤ inattivato a 58°C per 50 minuti
 - sistema di rilevazione
 - sospensione al 3% di globuli rossi di pecora
 - siero di coniglio anti-eritrociti di pecora
 - complemento di cavia
 - POSITIVO (infetto):
 - ≥ 20 UIFC/ml
 - ≥ 30 UIFC/ml

Fissazione del complemento (CFT)



ELISA

- **INDIRETTA**

- raccomandata da OIE

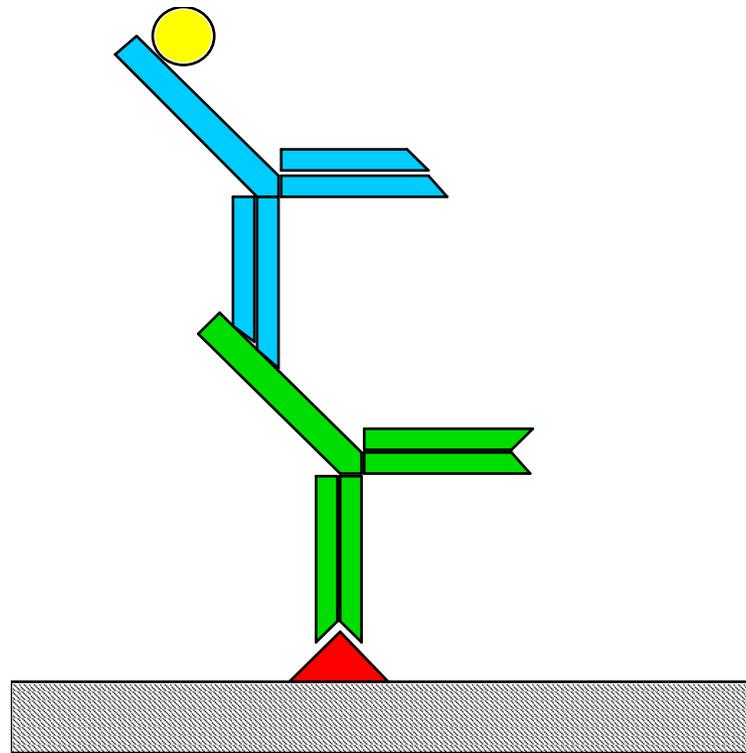
- Ag purificati LPS di *Brucella*
- Siero diluito 1:50
- Coniugato di topo anti IgG₁ marcato con HRP

- su siero e su latte

- sul latte di massa come *screening* di stalla

- caratteristiche di sensibilità e specificità pari a CFT ma non distingue tra animale vaccinato e infetto

ELISA indiretta



scopo: siero-diagnosi e siero-monitoraggio di malattie infettive

ELISA

- **COMPETITIVA**

- distinzione animali vaccinati da infetti

- Ab vaccinali hanno minore affinità ➤ esposizione più breve all'antigene rispetto a infezione di campo ➤ persistenza Ag ➤ Ab con maggiore affinità

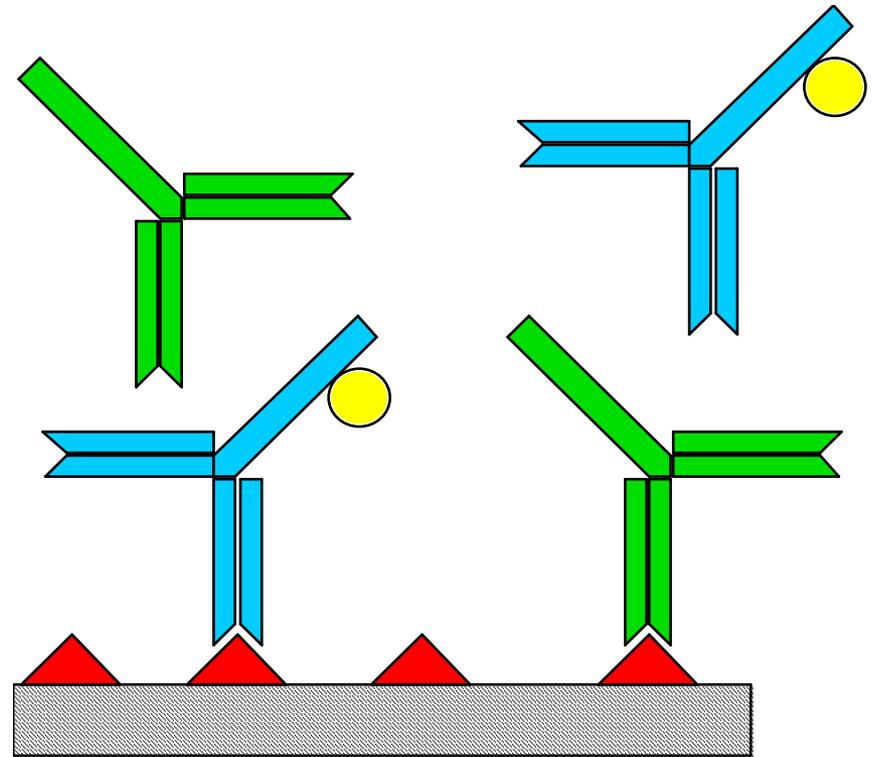
- uso di Mab ➤ specifici per epitopo comune (LPS come antigene)

- comporta alcuni vantaggi

- identificazione infezione in fase molto precoce
- eliminazione di false+ dovute a cross-reattività

- raccomandata da OIE

ELISA competitiva o *blocking*



scopo: ricerca di anticorpi specifici (per competizione)

Diagnosi sierologica considerazioni finali

- nessun test è perfetto da solo
 - problemi di sensibilità o di specificità
- problemi di false positività soprattutto a fine campagna eradicazione, con prevalenze molto basse
 - valore predittivo positivo basso
 - es. RBT (sensibilità 75% e specificità 99,2%)
 - se P 1% ➤ VPP 48%
 - se P 0.1% ➤ VPP 8% ➤ 92% sieropositivi sono non infetti
- problemi false positività emergenti in UE per infezioni con *Yersinia enterocolitica* O:9 ➤ epitopi comuni con *Brucella*

Diagnosi immunità cellulo-mediata

- test alla brucellina
 - test di intradermoreazione
 - inoculazione brucellina
 - lettura dopo 72 ore
 - valutazione ispessimento cute
 - caratteristiche del test
 - scarsa sensibilità
 - non utilizzabile sul singolo animale
 - buona specificità
- IFN- γ test
 - allo studio ma ha specificità bassa



Terapia e profilassi

- **Terapia**
 - non è efficace (*Brucella* intracell.) - tetracicline
- **Profilassi**
 - SANITARIA
 - in Paesi a bassa prevalenza di infezione
 - mira all'eradicazione attraverso l'abbattimento degli animali riconosciuti infetti (vedi RPV)
 - IMMUNIZZANTE
 - VIETATA IN ITALIA (vedi RPV)
 - in Paesi a elevata diffusione di infezione
 - Buck 19
 - Stipite 45/20
 - Stipite RB51

Profilo vaccinale ideale

- Induzione rapida di immunità e di lunga durata
- Assenza (o minima) interferenza con la diagnosi sierologica
- Produzione e conservazione semplice e lunga stabilità
- Assenza (o limitati) effetti indesiderati nell'animale vaccinato e innocuità totale per l'uomo
 - Criteri normalizzati di valutazione per la vaccinazione antibrucellare
 - Ceppo batterico, età, dose, via di somministrazione... variabili nei vari studi

Buck19

- B19 isolato dal latte di vacca nel 1923
- *B. abortus* biotipo 1, ma non necessita CO₂ crescita inibita da safranina, penicillina e eritritolo
- Delezione gene per enzima necessario al catabolismo dell'eritriolo
- Stabile, non varia la virulenza
- Non corrisponde al profilo vaccinale ideale, ma largo impiego
 - Identificazione vaccinati (risposta umorale anti LPS simile a infezione naturale: problema diagnostico)
 - Carattere infettivo per l'uomo
 - Effetto abortivo
- Unico vaccino registrato in Italia (vedi RPV)

Stipite 45/20

- Stipite *B. abortus* 45/20
- Isolato 1922 (liscio); forma rugosa ottenuta dopo 20 passaggi in cavia
- Abitualmente non induce risposta al test di agglutinazione e al RBT
- Instabile: tendenza a ritornare in forma liscia e virulenta
- Vaccino spento + adjuvante: granulomi infiammatori gravi

Stipite RB 51

- Mutante stabile, rugosa ceppo virulento B. abortus 2308
- Non esprime gran parte della catena O LPS di superficie
- Non provoca reazione sierologica ai test diagnostici
- Meno abortigeno di B19
- Placentite e aborto
- Vaccino ufficiale per la brucellosi negli USA dal 1996 e nella maggior parte dell'America latina dal 2000
- Numerosi studi hanno dimostrato l'utilità, controversa l'efficacia

RPV Brucellosi bovina

D.M. 03/06/1968: Piano nazionale profilassi brucellosi bovina

D.M. 28/03/1989: Obbligo territorio nazionale profilassi e risanamento degli allevamenti bovini da brucellosi

D.M. 28/06/1991: Obbligo nazionale allevamenti allo stato brado

D.M. 27 agosto 1994, n. 651

Regolamento concernente il piano nazionale per la eradicazione della brucellosi negli allevamenti bovini

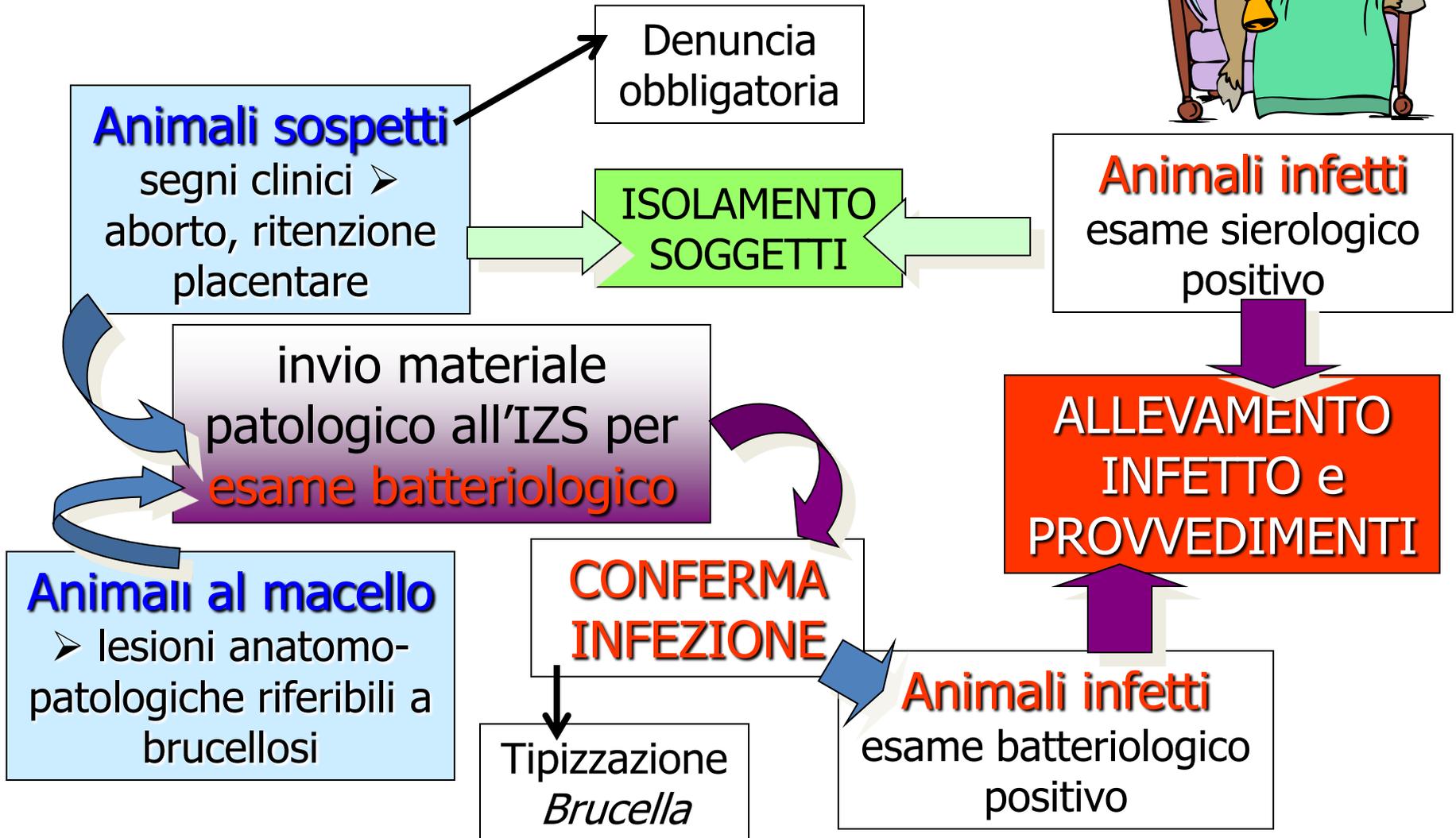
DM 651/94

- Generalità del piano
 - Eradicazione in 5 anni (nel 1999)
 - Obblighi
 - Eradicazione obbligatoria nazionale
 - Identificazione di tutti i bovini di tutti gli allevamenti, anche se allo stato brado
 - Animali > 12 mesi sotto controllo ufficiale
 - Allevamenti ingrasso
 - introduzione di capi da all I o UI
 - piani di sorveglianza ➤ se > 12 mesi: prova – eseguita nei 30 giorni precedenti dallo spostamento

DM 651/94

- Identificazione degli animali e prove diagnostiche
 - Prove sierologiche ufficiali
 - SAR-Ag:RB e F.d.C.
 - indenne: SAR – e FdC –
 - sospetto (da ripetere): SAR + e FdC –
 - infetto: SAR + o – e FdC +
 - Campione di sangue
 - Prelievo veterinario ufficiale, materiale monouso, invio all'IZS
 - divieto di allontanamento prima dei risultati, salvo macellazione
 - animali alpeggio, transumanza, monticazione:
 - prelievo in strutture ricovero

DM 651/94



DM 651/94

**ALLEVAMENTO
INFETTO**

Denuncia di
malattia infettiva

Segnalazione a
ufficio igiene

Sequestro allevamento,
provvedimenti particolari,
indagine epidemiologica

Accertamenti sierologici
in tutti gli animali
recettivi dell'allevamento

**Animali positivi subito isolati e
macellati**

- Marcati (lembo a T)
- No interventi terapeutici o manualità cliniche permessi
- Visceri, mammelle, sangue, distrutti

esito positivo

eliminazione siero- se
ritenuti infetti (DM 429/97)

disinfezioni

(reimpiego pascoli dopo 4 mesi)

**prove sierologiche ulteriori (ogni
4-6 settimane) per confermare
eliminazione**

DM 651/94

- Ripopolamento allevamento infetto
 - esito negativo prove sierologiche in animali > 12 mesi
 - controlli eseguiti ogni 4-6 settimane dall'eliminazione animali infetti sino a che, trascorse almeno 6 settimane dall'eliminazione degli ultimi capi positivi
 - due esami consecutivi diano esito negativo
 - eseguite le disinfezioni

DM 651/94

- All Ufficialmente Indenni
 - Concessione qualifica
 - Tutti i bovini esenti da forme cliniche da almeno 6 mesi
 - No vaccinati
 - No contatti con animali recettivi
 - Animali > 12 mesi
 - 2 prove – (intervallo >4 mesi ma < 8 mesi)
 - Controllo annuale con due prove (intervallo > 3 mesi ma < 6 mesi)
 - Introduzione solo di animali da all UI; se > 12 mesi prova
 - nei 30 gg precedenti a introduzione
 - Allevamento (modello N) e animale (modello P)

DM 651/94

- Province UI
 - tutti gli allevamenti sono sotto controllo e il 99% allevamenti è UI
- Regione UI
 - se tutte le province UI
- Controlli periodici in province/regioni UI
 - se UI da almeno due anni
 - un solo controllo annuale
 - se 99.8% allevamenti nazionali UI da almeno 4 anni
 - controllo biennale e piani di sorveglianza

DM 651/94

- All Indenne
 - Concessione qualifica
 - Tutte o parte bovine vaccinate con Buck19 tra 4-6 mesi età
 - Tutti gli animali
 - esenti da forme cliniche da almeno 6 mesi
 - No contatti con animali recettivi
 - Animali > 12 mesi:
 - a. 2 prove – (intervallo >4 mesi ma < 8 mesi)
 - b. Controllo annuale con due prove (intervallo > 3 mesi ma < 6 mesi)
 - c. Bovine vaccinate fino a 18 mesi: ammessa sierologia + (FdC fino a 30UIFC/ml)
 - Introduzione capi da all UI o I e se > 12 mesi prova sierologica – (se vaccinato da valutare +) nei 30 gg prima dell'introduzione

DM 651/94

- Modifica qualifica (da I a UI)
 - No capi vaccinati da 3 anni
 - Rispettati termini concessione qualifica
 - Dopo 3 anni i capi > 12 mesi: una prova –
- Attestazione sanitaria:
 - mod M (all) e mod L (animale)
- Province e regioni I
 - tutti gli allevamenti sono sotto controllo e il 99% allevamenti è UI o I
 - Regione I se tutte le province I

**Sospetta comparsa
infezione in all UI o I**

DM 651/94

QUALIFICA SOSPESA TEMPORANEAMENTE

- **MESSA SOTTO SORVEGLIANZA**
- **DIVIETO MOVIMENTAZIONE TRANNE PER
MACELLAZIONE (SOTTOPOSTI A ESAMI SIEROLOGICI E
BATTERIOLOGICI)**

**PREDISPOSTI
ACCERTAMENTI UFFICIALI
SU TUTTI I CAPI**

Provvedimenti per animali
altre specie se presenza
compromette esito piani
eradicazione

**ESITO NEGATIVO →
REVOCA SOSPENSIONE
PROVVISORIA**

Positivo → revoca qualifica

- **Provvedimenti
allevamenti infetti**
- **Controlli**
- **Riottenimento qualifica
qualora requisiti all UI e I
rispettati**

DM 651/94 modifiche

D.M. 12 agosto 1997, n. 429

Regolamento recante modificazioni ai D.M.su Brucellosi e leucosi

Comparsa infezione in all UI

- se un solo capo + con titolo > 20 UIFC/ml la qualifica viene sospesa anzichè revocata se:
 - Controllo su tutti i capi bovini e ovi-caprini azienda
 - Bovino + marcato, isolato e macellato entro 7 gg da notifica e esecuzione provvedimenti per animale infetto
 - Bovino + ma non segni clinici nè isolamento brucelle
 - Eseguire disinfezioni e provvedimenti per all infetto
- Revoca della sospensione qualora
 - 2 prove – (intervallo 4-6 sett), di cui la prima 42 gg dall'eliminazione del capo +, su tutti i bovini in all
- Informare i servizi veterinari regionali

DM 651/94

Nota del Ministero della Sanità 600.6/24406.BRB/417 del 13 marzo 1997

- **Allevamenti bufalini**

- A decorrere dal 17 marzo 1997 viene applicato il DM 27 agosto 1994, n.651
- Divieto di vaccinazione anche per la specie bufalina

RPV

D.Lvo 22 maggio 1999, n. 196

“Attuazione della direttiva 97/12/CE
relativa ai problemi di polizia sanitaria in
materia di scambi intracomunitari di
animali della specie bovina e suina”

BRUCELLOSI OVI-CAPRINA

- **zoonosi** (90-95% casi)
- *B. melitensis*
 - 3 biovarianti, presenti in Italia ➤ oltre 90% biovar 2
 - ospiti ➤ ovini, caprini, bovini
- Malattia simile a brucellosi bovina per quanto riguarda epidemiologia, forma clinica e anatomopatologica, diagnosi



epidemiologia

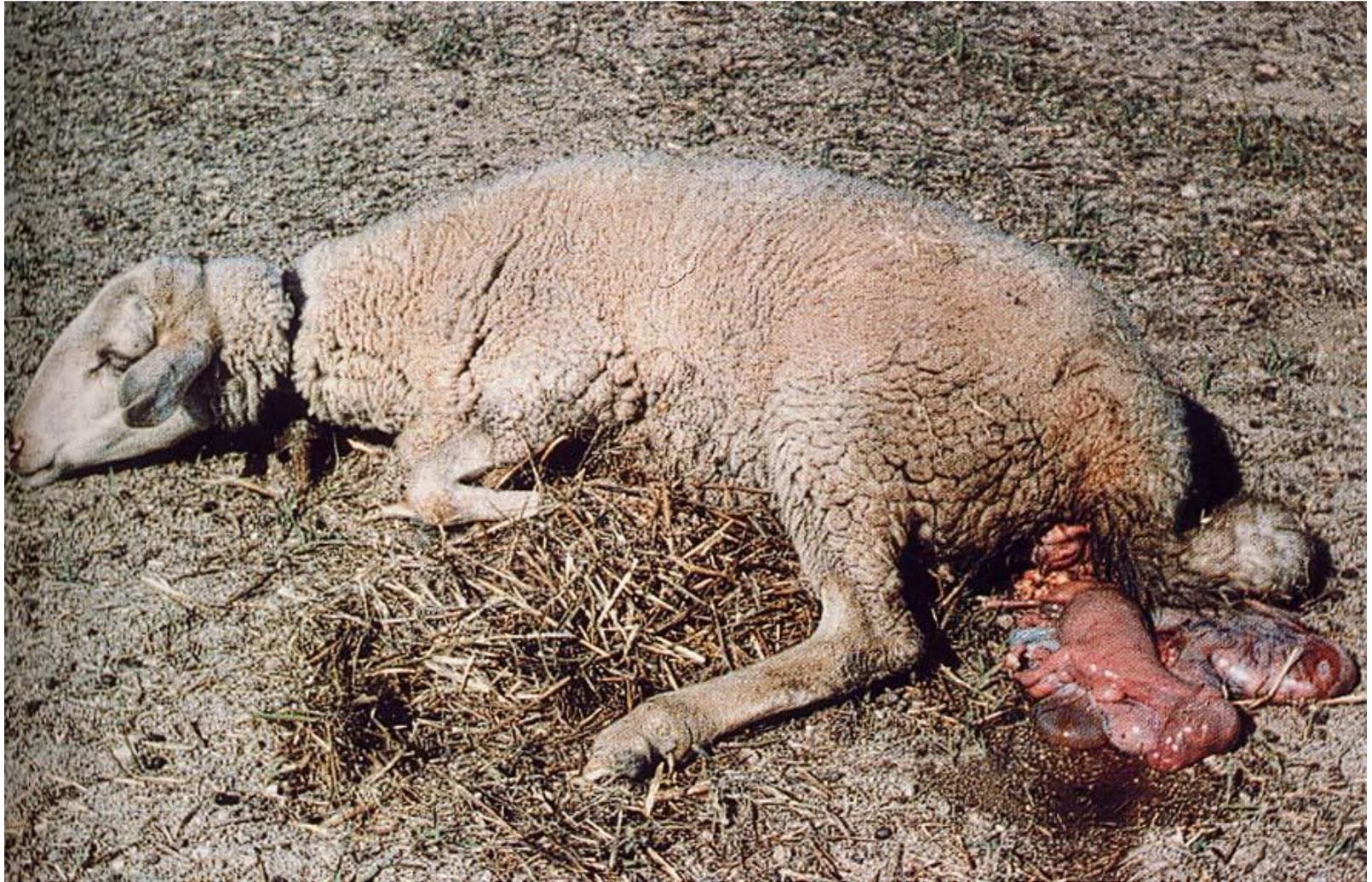
- simile a brucellosi bovina
 - capra più sensibile
 - pecora più resistente ➤ aborto meno frequente
- eliminazione *B. melitensis* mediante secrezioni utero-vaginali ➤ dura più a lungo del bovino
 - 2-3 mesi capra; 60 gg pecora
- Infezione latente riportata in caprette ➤ aborto alla prima gravidanza ???
 - infezione latente non presente in agnelle ➤ autosterilizzazione
- Infezione aerogena e venerea più frequenti del bovino



Forme cliniche



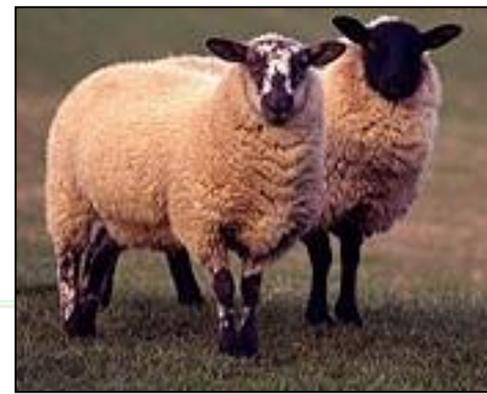
- Aborto tra il III e il IV mese di gravidanza ➤ seguito da ritenzione degli invogli
- Orchiepididimite e localizzazioni a carico vescicole seminali, prostata e ghiandole bulbouretrali più frequenti
- Mastite evidente noduli mammari e alterazione secrezione latte
- Rara localizzazione osteoarticolare







Diagnosi e profilassi vaccinale



- simile a diagnosi brucellosi bovina
 - non utilizzabile ring test su latte
- eradicazione difficile ➤ continui spostamenti animali, comunanza pascoli ➤ vaccinazione massiva e per lunghi periodi in Paesi endemici
- Vaccino *Rev 1*
 - Mutante streptomicino-dipendente di *B.melitensis* di origine umana
 - elevato potere immunogeno ➤ protezione dopo 4 anni nella capra e 30 mesi nella pecora
 - abortigeno in femmine gravide, può essere eliminato con il latte durante la lattazione, patogeno per l'uomo
 - vaccinazione di caprette e agnelle impuberi di età compresa tra i 3 e i 7 mesi

RPV Brucellosi ovicaprina

D.M. 2 luglio 1992, n. 453

Regolamento concernente il piano nazionale per la eradicazione della brucellosi negli allevamenti ovini e caprini

D.M. 31 maggio 1995, n. 292

Regolamento recante modifiche al decreto ministeriale 2 luglio 1992, n. 453, concernente il piano nazionale per la eradicazione della brucellosi negli allevamenti ovini e caprini

DM 453/92

- Generalità del piano
 - Eradicazione in 7 anni (nel 1999)
 - Obblighi
 - Eradicazione obbligatoria nazionale
 - Identificazione e registrazione di tutti i capi di tutti gli allevamenti
 - Animali > 6 mesi sotto controllo sierologico ufficiale
 - se vaccinati il controllo sierologico va fatto a animali > 18 mesi di età
- prove sierologiche ufficiali ➤ SAR-Ag:RB e F.d.C.

Animale INFETTO
Positività sierologica o batteriologica

DM 453/92

ALLEVAMENTO INFETTO

- Casi clinici
- Isolamento *Brucella*
- Positività sierologica

Animali positivi subito isolati e macellati

- Marcati (lembo a T)
- Visceri, mammelle, sangue distrutti

disinfezioni

(reimpiego pascoli dopo 60 gg)

Sequestro allevamento, provvedimenti particolari

prove sierologiche (dopo 6 settimane) per confermare eliminazione

ripopolamento

almeno una prova negativa
(dopo 6 settimane da
eliminazione capi infetti)

DM 453/92

- Provvedimenti particolari per evitare la trasmissione al personale e propagazione tra gli animali
 - a. Sequestro allevamento
 - b. Isolamento e marcatura infetti
 - c. Separazione latte animali infetti da sani e utilizzo latte infetto solo previo trattamento e solo per alimentazione animale
 - d. Latte sani separato e identificato, trasportato a caseificio e sottoposto a pasteurizzazione prima della lavorazione
 - e. Distruzione di feti, invogli fetali, agnelli nati morti o morti subito dopo la nascita a meno che non servano per esami di laboratorio

DM 453/92

- f. Trattamento carcasse, mezzene e quarti per alimentazione animale
- g. Distruzione immediata con il fuoco o interrimento previa aspersione con prodotto disinfettante appropriato di fieno, paglia, altro materiali venuti a contatto con infetti o con placente
- h. Verifica impianti smaltimento
- i. trattamento letame e liquami ➤ disinfezione e conservazione 3 settimane e divieto orticoltura

DM 453/92

- disinfezioni
 - da eseguire dopo l'eliminazione animali infetti e prima di ricostituire il gregge
 - pulizia e disinfezione di
 - ricoveri, locali di stabulazione,
 - tutti i contenitori, le attrezzature e utensili usati per gli animali
 - mezzi di trasporto, contenitori e attrezzature dopo ogni trasporto di animali provenienti da allevamento infetto
 - Prodotti, avanzi, materiali e sostanze provenienti da animali provenienti da allevamento infetto o in contatto con essi
 - aree di carico e scarico

DM 453/92

- All Ufficialmente Indenni
 - Concessione qualifica
 - Tutti gli animali esenti da forme cliniche da almeno 12 mesi
 - No vaccinati
 - Animali > 6 mesi
 - 2 prove – (a distanza di 6 mesi)
 - introduzione solo di animali da all UI
 - Attestazione sanitaria Mod Q (allevamento) e Mod. R (animale)

DM 453/92

- All Ufficialmente Indenni
 - mantenimento qualifica
 - Controllo annuale con esito negativo su parte rappresentativa della popolazione di età superiore a 6 mesi
 - Tutti i becchi e gli arieti
 - Tutti gli animali introdotti nel periodo successivo al controllo precedente
 - 25% femmine di età superiore a 6 mesi se allevamento ha > 50 femmine altrimenti tutte le femmine
 - Controllo triennale per allevamenti UI di regione non UI in cui il 99% allevamenti è UI

DM 453/92

- All Indenne
 - Concessione qualifica
 - Tutti gli animali
 - esenti da forme cliniche da almeno 12 mesi
 - Vaccinati con Rev 1 (o parte di essi sono stati vaccinati)
 - Animali > 18 mesi: 2 prove – (a distanza di 6 mesi)
 - Introduzione capi da all UI o I
 - Attestazione sanitaria:
 - mod S (all) e mod T (animale)

DM 453/92

- All Indenne
 - mantenimento qualifica
 - controllo annuale con esito negativo su parte rappresentativa della popolazione
 - Tutti i becchi e gli arieti non castrati e non vaccinati di età superiore a 6 mesi
 - Tutti i becchi e gli arieti non castrati e vaccinati di età superiore a 18 mesi
 - Tutti gli animali introdotti nel periodo successivo al controllo precedente
 - 25% femmine in età da riproduzione (sessualmente mature) o in lattazione se allevamento ha > 50 femmine altrimenti tutte le femmine

DM 453/92

- Modifica qualifica (da I a UI)
 - Intervallo minimo di 2 anni
 - No capi vaccinati da 2 anni
 - Dopo 2 anni i capi > 6 mesi: una prova –

Table BR4. | *Milk and cheese samples tested for Brucella, 2007*

Country	Description	Units	N	Pos	% Pos
Raw milk from cows					
Belgium	Milk for manufacture	Batch	70,067	0	0
Italy		Batch	46	9	19.6
Italy		Single	12,342	41	0.3
Italy	Milk for manufacture	Single	74	0	0
Raw milk from goats/sheep					
Italy	Goats	Batch	30	0	0
Italy	Goats	Single	25	0	0
Italy	Sheep	Batch	504	45	8.9
Italy	Sheep	Single	772	27	3.5
Raw milk from other animals/unspecified					
Italy	Milk for manufacture	Single	344	0	0
Italy		Single	71	0	0
Cheese made from milk from cows					
Italy	Soft and semi-soft	Batch	54	0	0
Italy ¹	Soft and semi-soft	Single	403	0	0
Italy		Single	191	0	0
Cheese made from milk from sheep/other animals/unspecified					
Italy ²	Goats' milk, soft and semi-soft	Single	43	0	0
Italy	Sheep's milk, soft and semi-soft	Batch	208	0	0
Italy ³	Sheep's milk, soft and semi-soft	Single	187	0	0
Italy ⁴	Unspecified milk	Single	436	0	0
Total (2 MSs)			85,797	122	0.1

Note: Data are only presented for sample size ≥ 25

1. Includes 73 samples of cheese made from raw or low heat-treated milk
2. Includes 43 samples of cheese made from raw or low heat-treated milk
3. Includes 110 samples of cheese made from raw or low heat-treated milk
4. Includes 323 samples of cheese made from raw or low heat-treated milk

Figure BR3. Status of countries regarding bovine brucellosis, 2011



Figure BR8. Status of countries regarding ovine and caprine brucellosis, 2011



Brucellosi bovina



Brucellosi ovi-caprina

Figure BR9. Proportion of existing sheep and goat herds infected with or positive for Brucella, country-based data, 2011



Figure BR5. Proportion of existing cattle herds infected with or positive for Brucella, 2005-2011¹

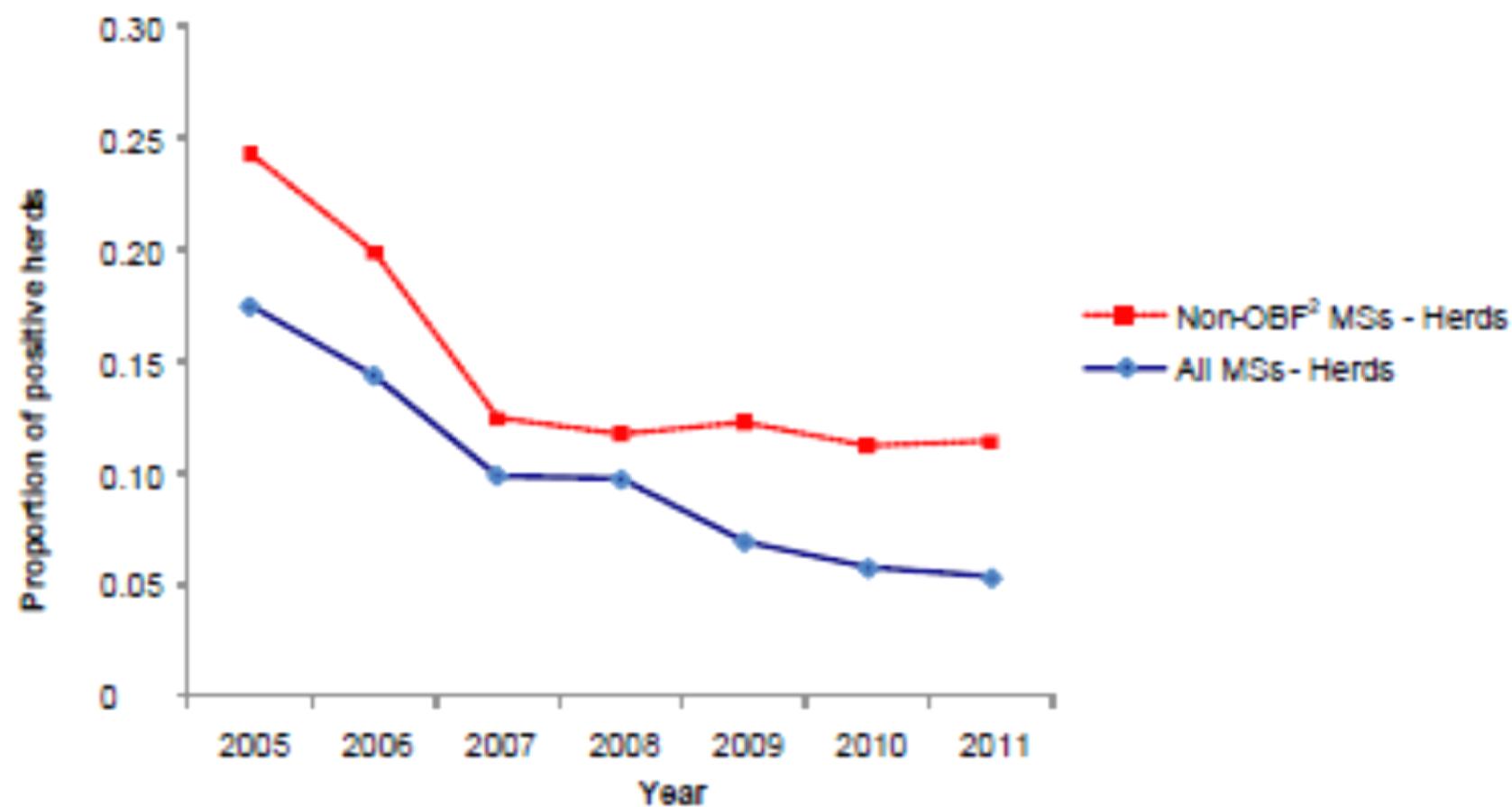


Figure BR10. Proportion of existing sheep and goat herds infected with or positive for Brucella, 2005-2011¹

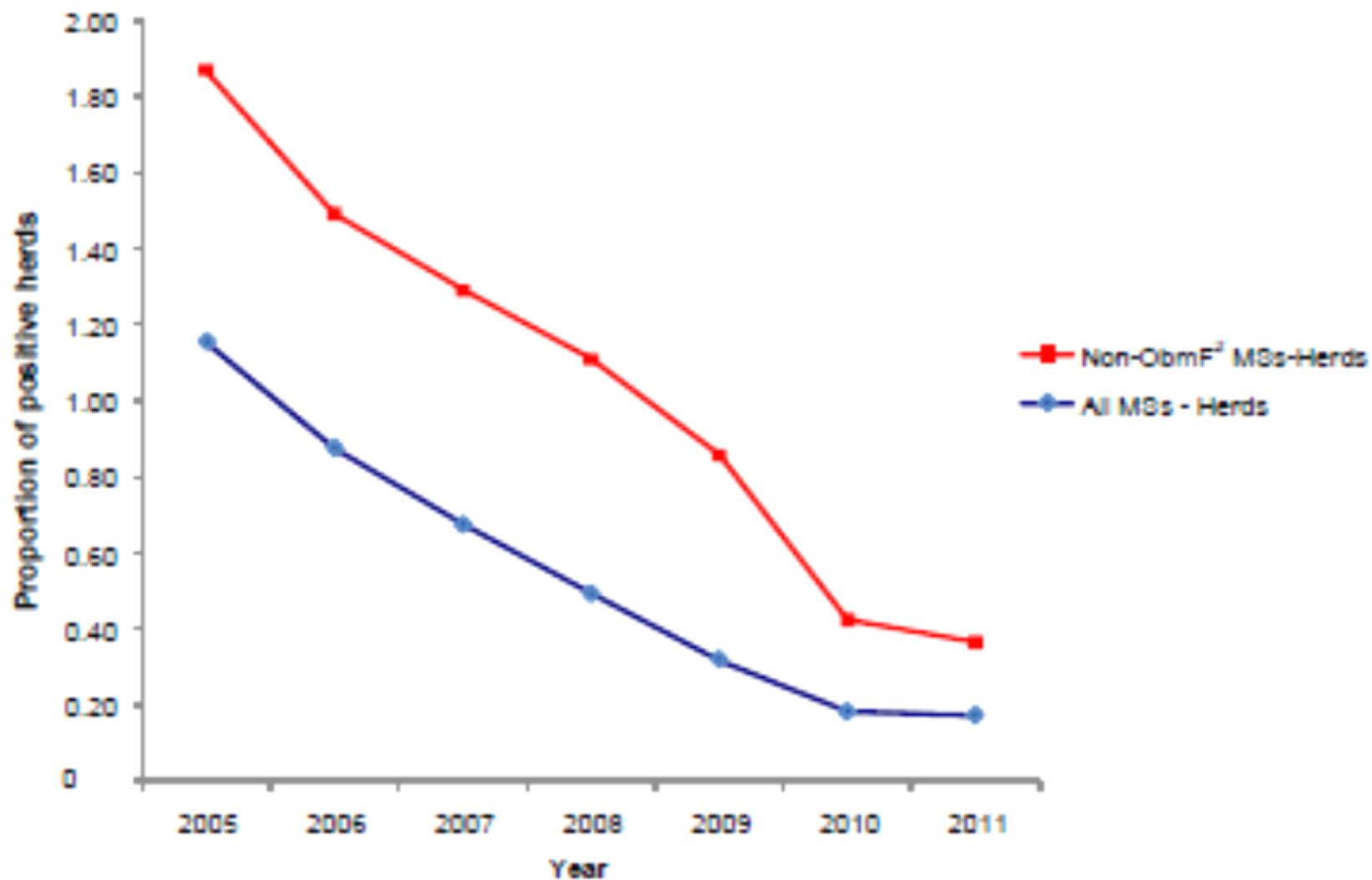


Table BR3. Brucella in cattle herds in five co-financed non-OBF MSs,¹ 2011

Non-officially free MSs	No of existing herds	No of tested herds	No of positive herds	% existing herds positive	% tested herds positive
Cyprus	356	302	0	0	0
Italy ²	117,462	37,537	898	0.76	2.39
Portugal ³	58,503	38,753	216	0.37	0.56
Spain ⁴	126,435	111,367	136	0.11	0.12
United Kingdom ⁵	25,677	22,978	25	0.10	0.11
Total (5 MSs in 2011)	328,433	210,837	1,275	0.38	0.60

Legislation

-  **Directive 64/432/EEC**
 - all O.F. herds have to be tested twice a year
 - testing can be reduced according to Directive
-  **Decree 27 August 1994, n° 651**
 - all positive cattle has to be slaughtered within 30 days, with 2 negative testing at a distance of 42 days one from the other in order to repopulate and 2 negative testing at a distance of 6 months (4-8 months) in order to re-gain the qualification

O.F. Provinces at 19-04-2012



Bovine brucellosis
OBF provinces

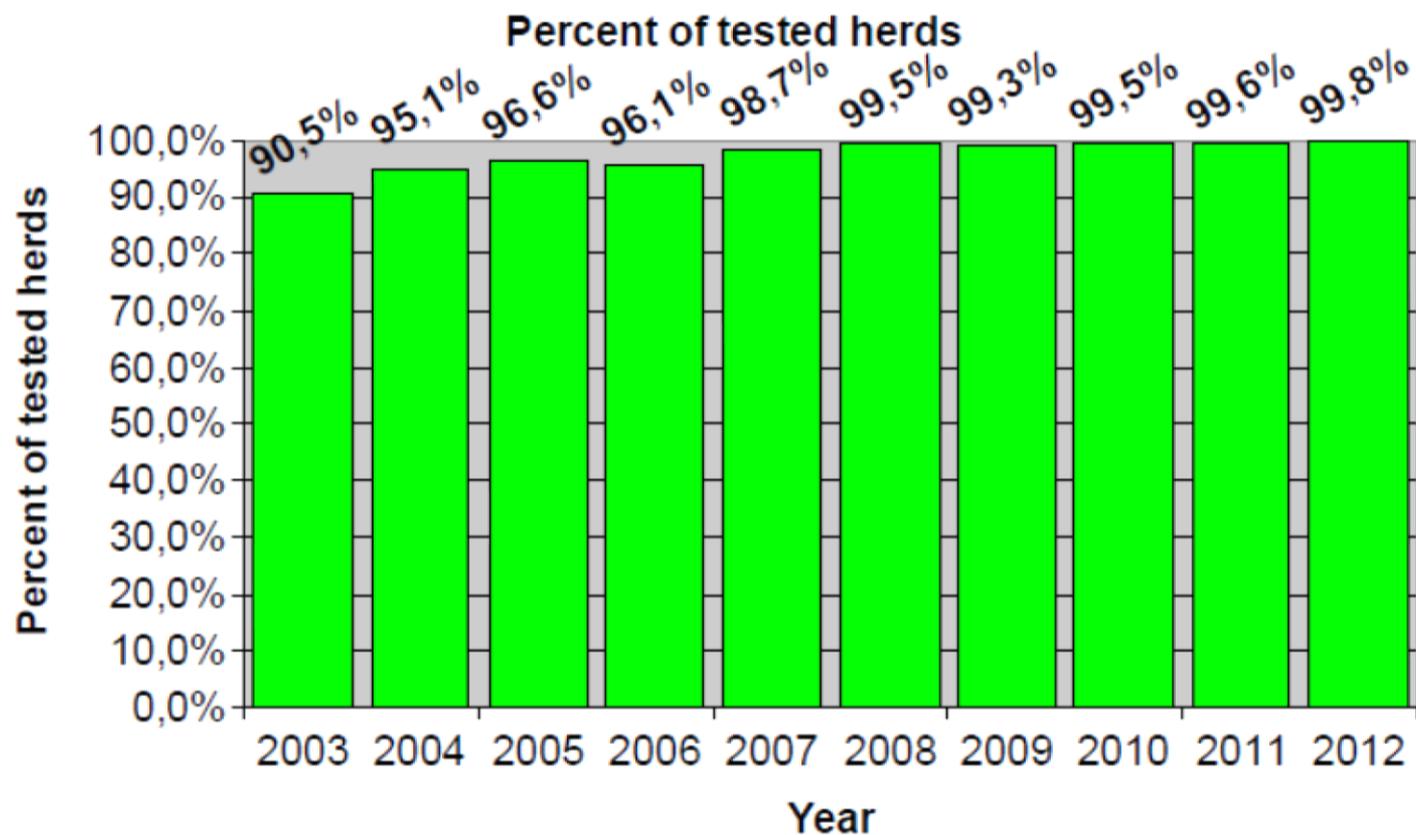
■ (70)

ITALIAN REGIONS	ITALIAN OBF PROVINCES
Emilia-Romagna	whole Region
Lombardia	whole Region
Marche	whole Region
Sardegna	whole Region
Toscana	whole Region
Trentino Alto Adige	whole Region
Umbria	whole Region
Piemonte	whole Region
Friuli Venezia Giulia	whole Region
Liguria	Imperia, Savona
Veneto	whole Region
Lazio	Frosinone, Latina, Rieti, Viterbo
Abruzzo	Pescara
Molise	Campobasso
Puglia	Brindisi
Valle d'Aosta	whole Region
TOTAL	70

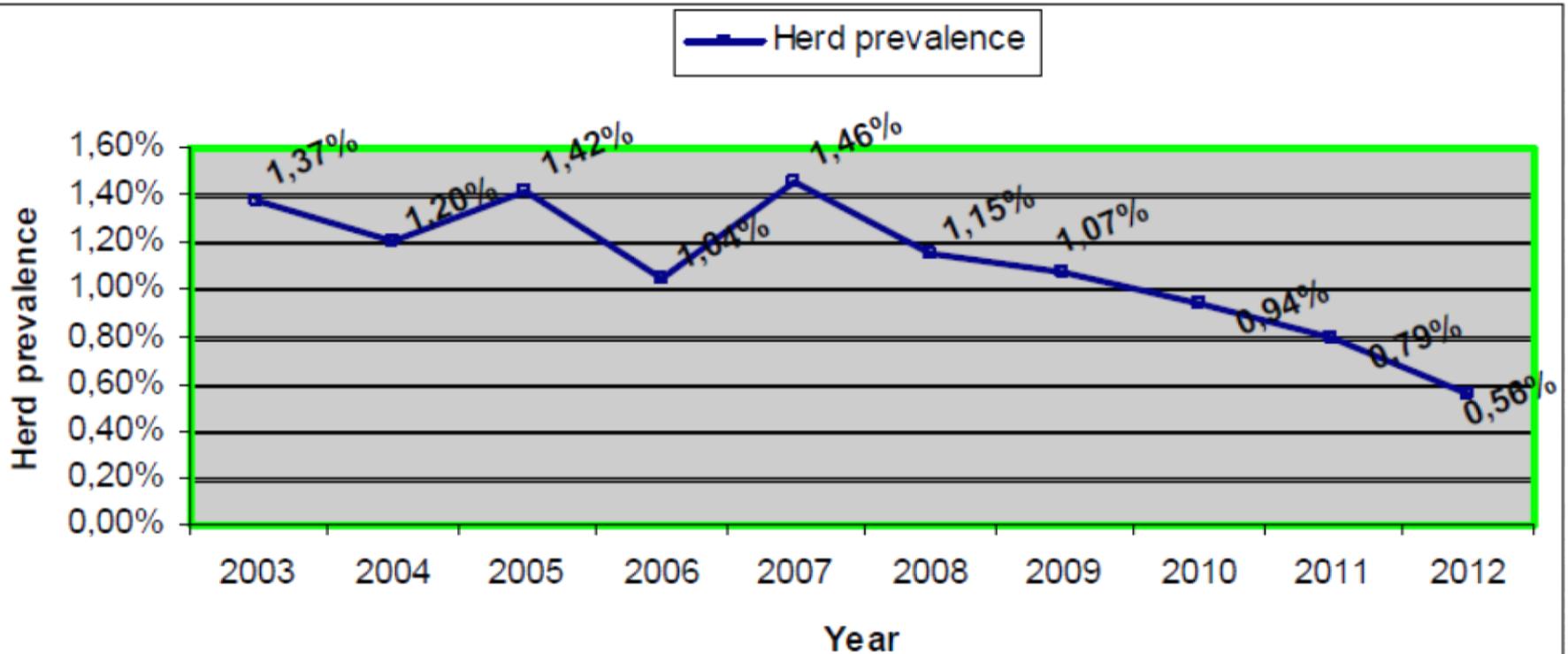
Province e Regioni Ufficialmente indenni da Brucellosi bovina al 10.04.2013



Bovine herds tested for brucellosis in Italy



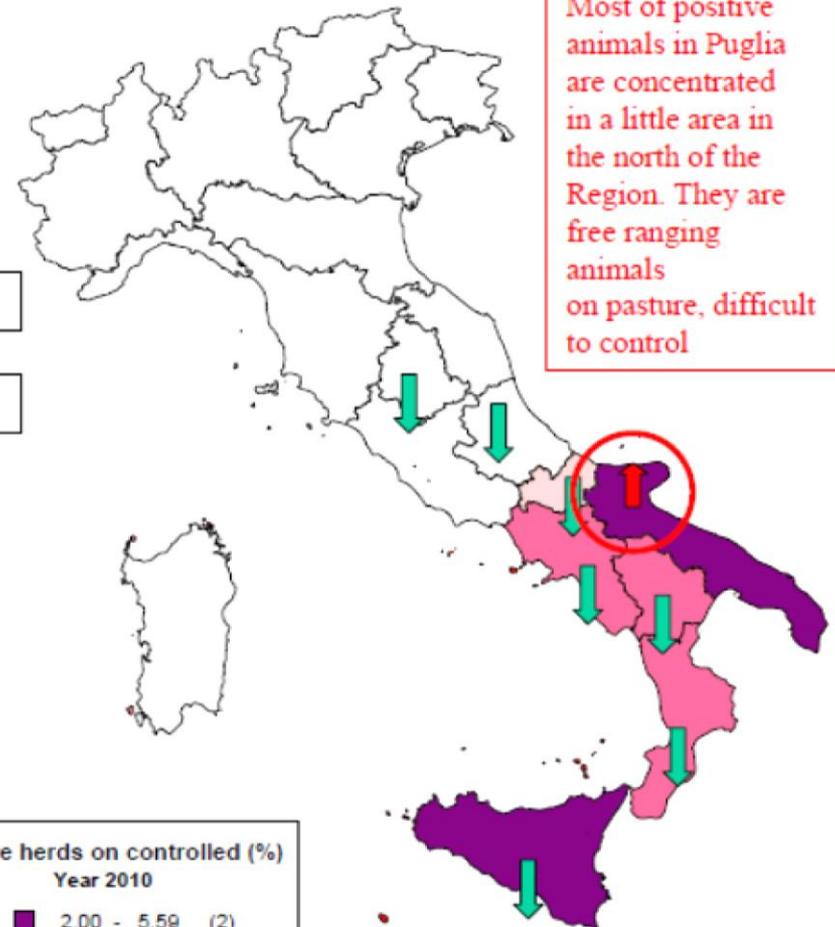
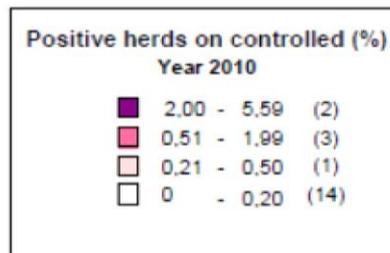
Bovine brucellosis positive herds



Year 2012: bovine brucellosis positive herds

Region	% positive herds
Sicilia	2,79%
Puglia	2,01%
Calabria	1,70%
Basilicata	1,08%
Campania	1,08%
Molise	0,30%
Abruzzo	0,10%
Bolzano UI	0,00%
Emilia Romagna UI	0,00%
Friuli Venezia Giulia UI	0,00%
Lazio	0,00%
Liguria	0,00%
Lombardia UI	0,00%
Marche UI	0,00%
Piemonte UI	0,00%
Sardegna UI	0,00%
Toscana UI	0,00%
Trento UI	0,00%
Umbria UI	0,00%
Valle d'Aosta UI	0,00%
Veneto UI	0,00%
ITALY	0,56%

 Decrease 2012
 Increase 2012



Most of positive animals in Puglia are concentrated in a little area in the north of the Region. They are free ranging animals on pasture, difficult to control



Ordinanza Ministeriale 14-11-2006 for Calabria – Campania – Puglia - Sicilia



- 1) Identification of infected animals with electronic bolus or special ear tag in order to guarantee traceability (Art.8);
- 2) Obligation to sample infected and suspected animals in the slaughterhouse (Art.11);
- 3) Obligation to slaughter all TB, brucellosis and leukosis infected animals within 15 days from the notification to the owner; slaughtering ordered by ASL instead of Major (Art.12);
- 4) In case of non-cooperative farmers cut of community funding - premi PAC (Art.13);
- 5) Obligation to carry out a proper epidemiological enquiry in the infected holding and in the slaughterhouse on the basis of the annexes to the ordinanza (Art.14);
- 6) Transhumance allowed for officially free holdings only, with pre-movement testing (Art.15);
- 7) In case of eventual further failure from the Region, substitution of the regional powers with special representative of the CCA (Commissario ad acta – Art.19);
- 8) Fine for anyone non respecting the rules of the ordinanza (Art.20).

Measures applied and results

- From 7 May to 12 June 2007 118 buffalo herds controlled randomly, with support of Carabinieri, in the province of Caserta with a result of 50,8% herd prevalence and 19,4 % animal prevalence;
- From 21-12-2007 Special Order (appointment of a Government Commissioner) for the control of buffalo brucellosis in Caserta; emergency status up to 31/12/2009.

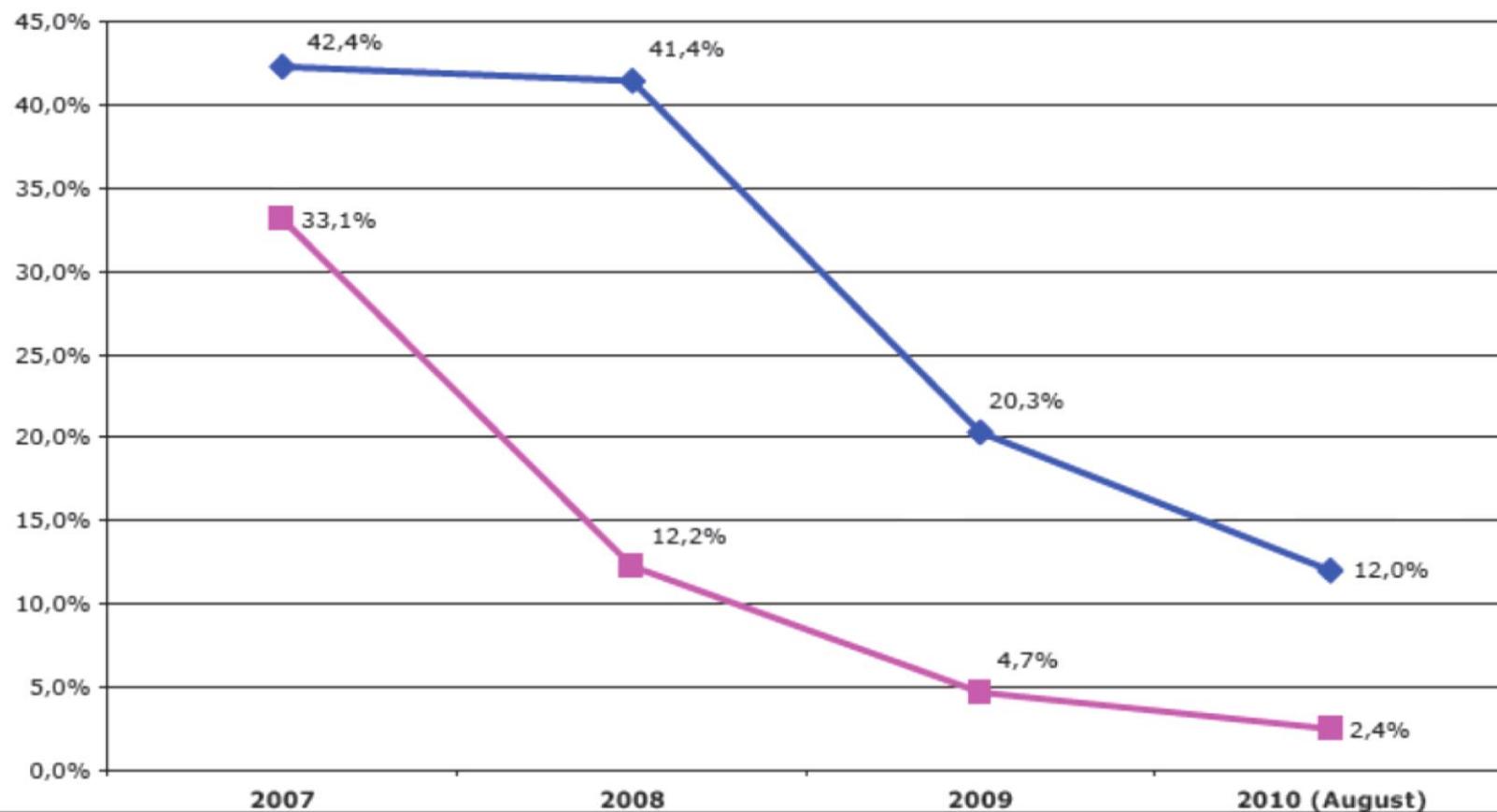
3. Implementation of the SANAN system

- SANAN is a specific system through the web and the National Database (BDN) to update on real time the information on the controls effected on the animals for TB, BRC and EBL (Decision 2002/677/EEC)
- In Campania the information on buffaloes through SANAN are now updated up to 98%

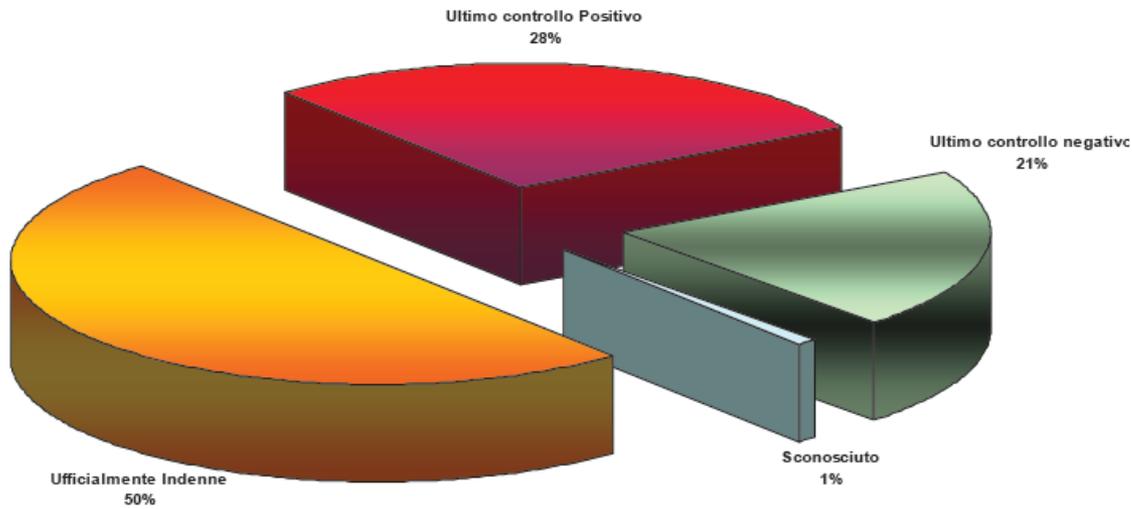
Bufaline Brucellosis: Prevalence and incidence 2007 – 2010 (August)

Caserta Province

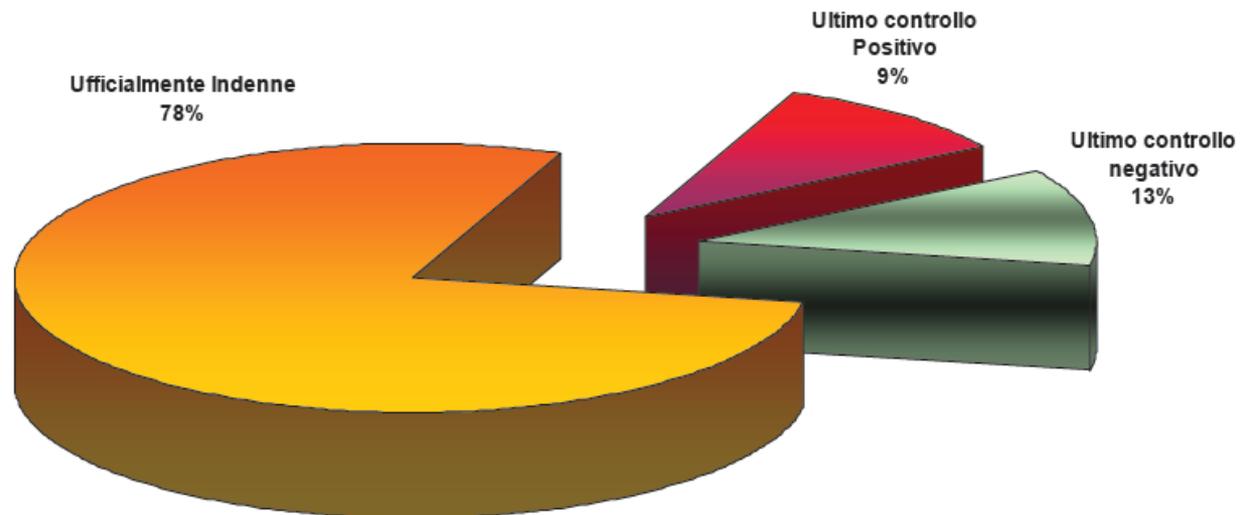
Prevalence
Incidence



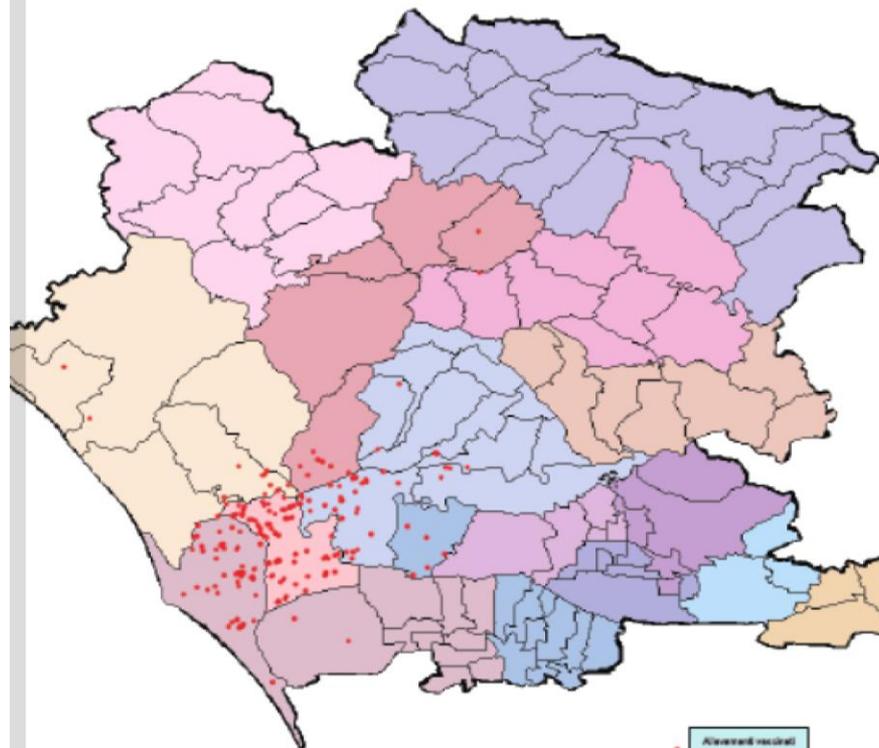
Caserta Province: herds sanitary status December 31 2009



Caserta Province: herds sanitary status August 30 2010



Provincia di Caserta: allevamenti vaccinati



- Allevamenti vaccinati
- DISTRETTO
- 05 - CASERTA
 - 06 - ARICCI
 - 07 - MAZDALONI
 - 08 - TEANO
 - 09 - RODICANOFINA
 - 10 - PIEDIMONTE S. MARTE
 - 11 - ALIFE
 - 12 - CARZZI
 - 13 - MARCONI
 - 14 - MARSANO
 - 15 - AMBITO 1 LAURIA
 - 16 - AMBITO 2 S. ANGELO DEL LINDO
 - 17 - AMBITO 3 S. MARCIANO
 - 18 - AMBITO 4 CASUA
 - 19 - AMBITO 5 CASSALUNGA
 - 20 - AMBITO 6 CARCELLO ED ARNONE

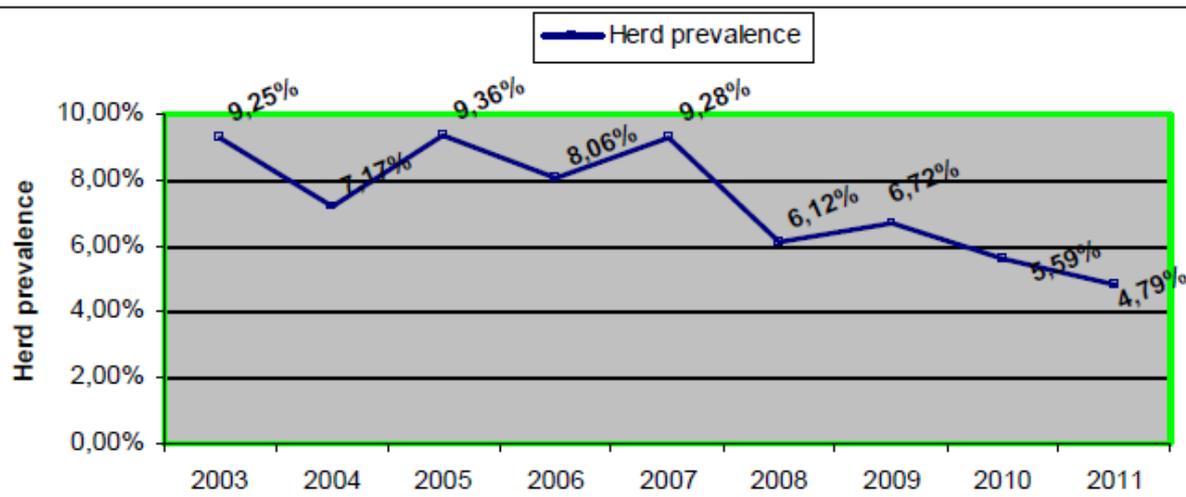


Caserta Province
buffalo vaccinated
herds 2008-2010

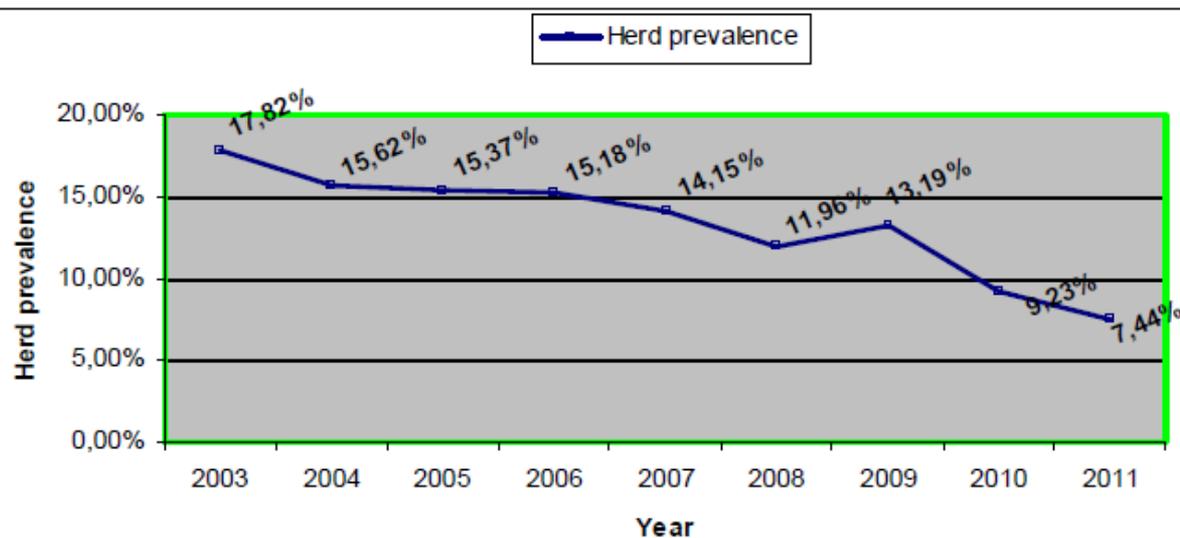
N vaccinated herds= 197
N vaccinated animals= 9923



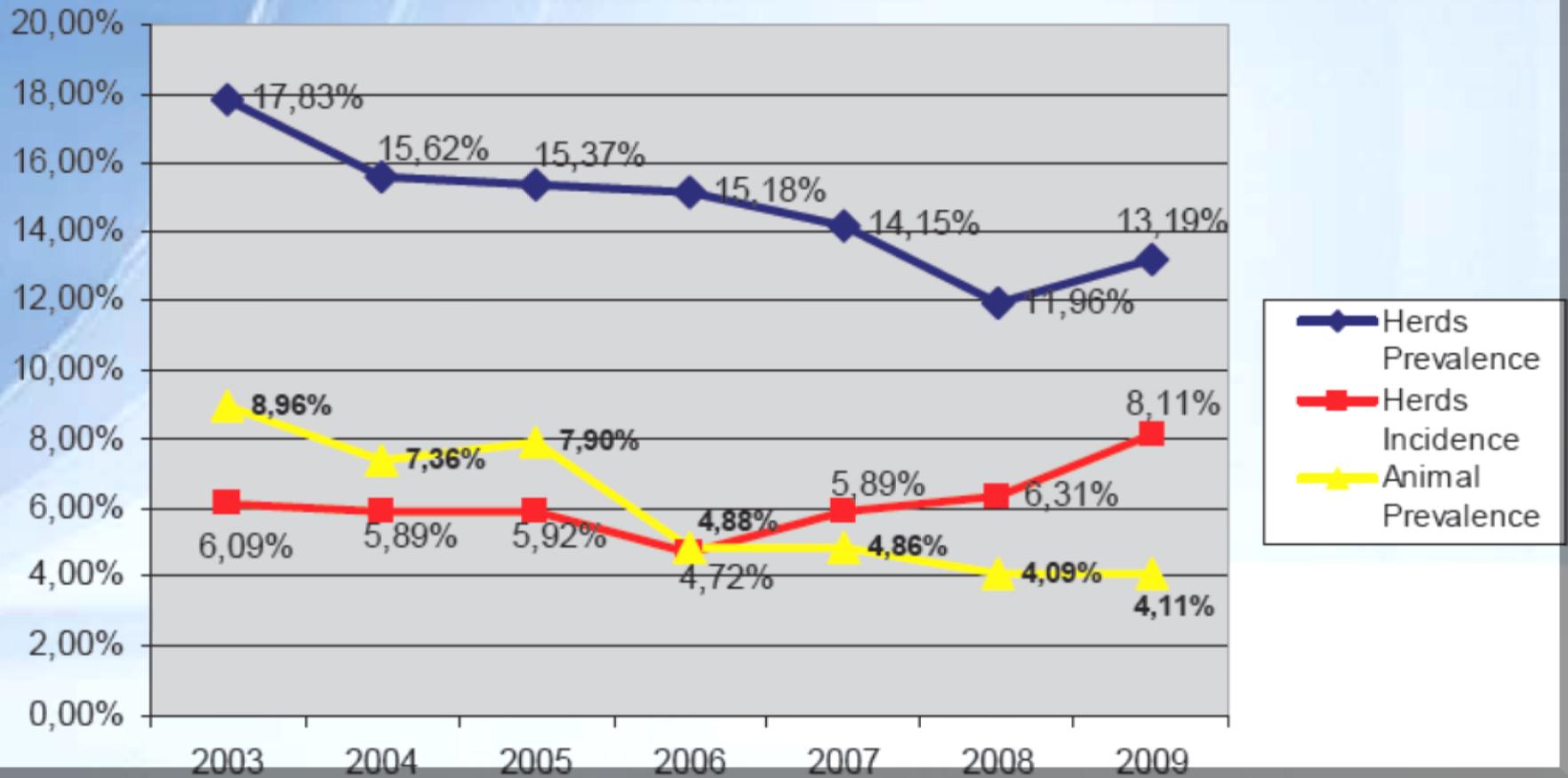
Bovine brucellosis positive herds in Sicily



S&G brucellosis positive herds in Sicily



Prevalence - Incidence

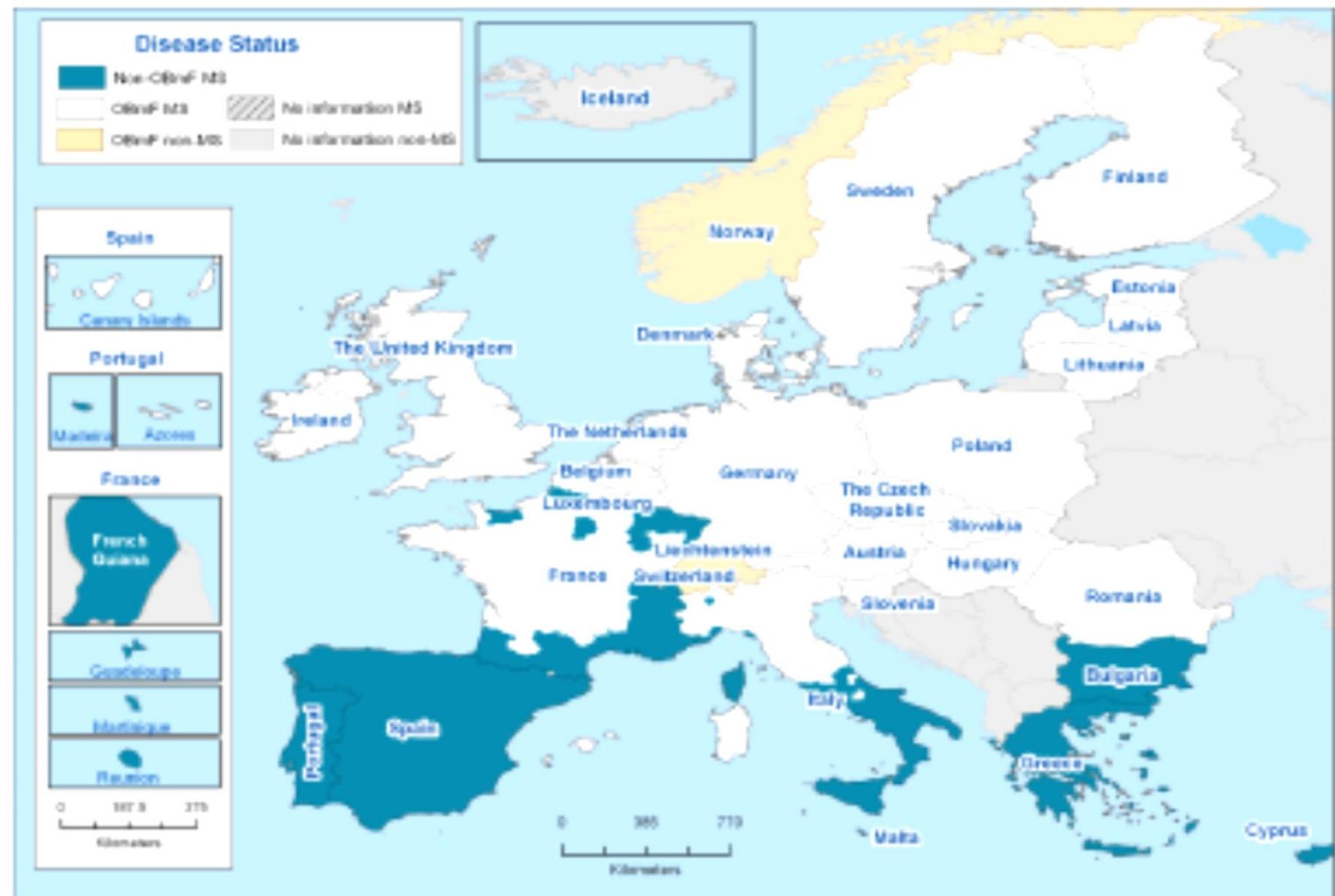


VACCINATION IN SICILY

YEAR 2004 - 2009

YEAR	Total number of holdings	Total number of animals	Information on young animals subjected to the programme of vaccination			
			Total number of holdings eligible for vaccination	Total number of holdings vaccinated	Total number of young animals vaccinated	Number of doses of vaccine used
2004	3.914	372.623	2.307	0	0	0
2005	9.162	1.060.611	3.389	1.177	46.277	46.277
2006	9.266	822.906	2.237	1.424	60.702	60.702
2007	9.241	1.010.667	2.475	1.316	60.247	60.247
2008	9.161	946.368	2.051	893	37.927	37.927
2009	9.009	1.015.103	4.847	388	14.138	14.138

Figure BR8. Status of countries regarding ovine and caprine brucellosis, 2011



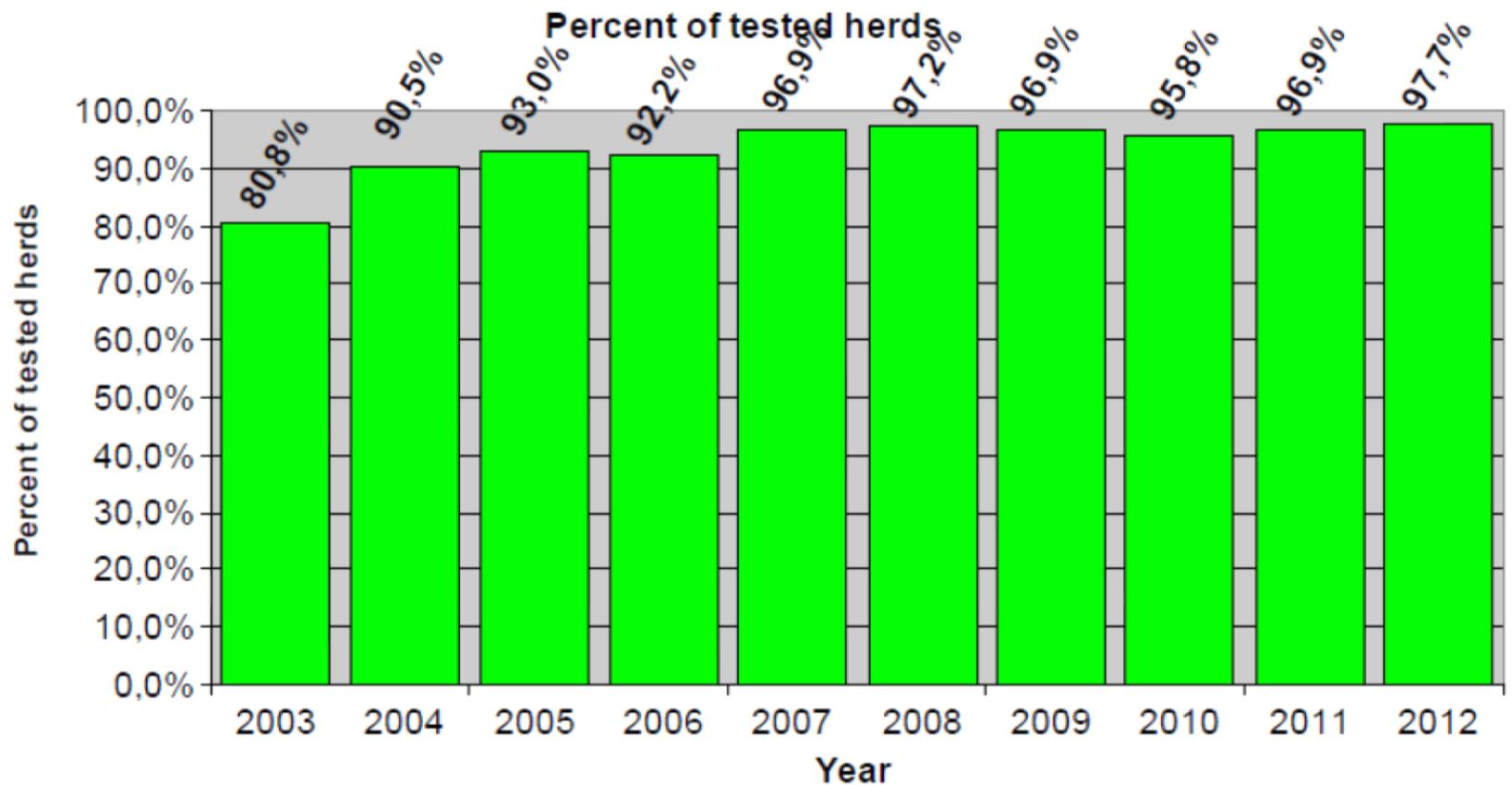
OBF Provinces at 19-04-2012



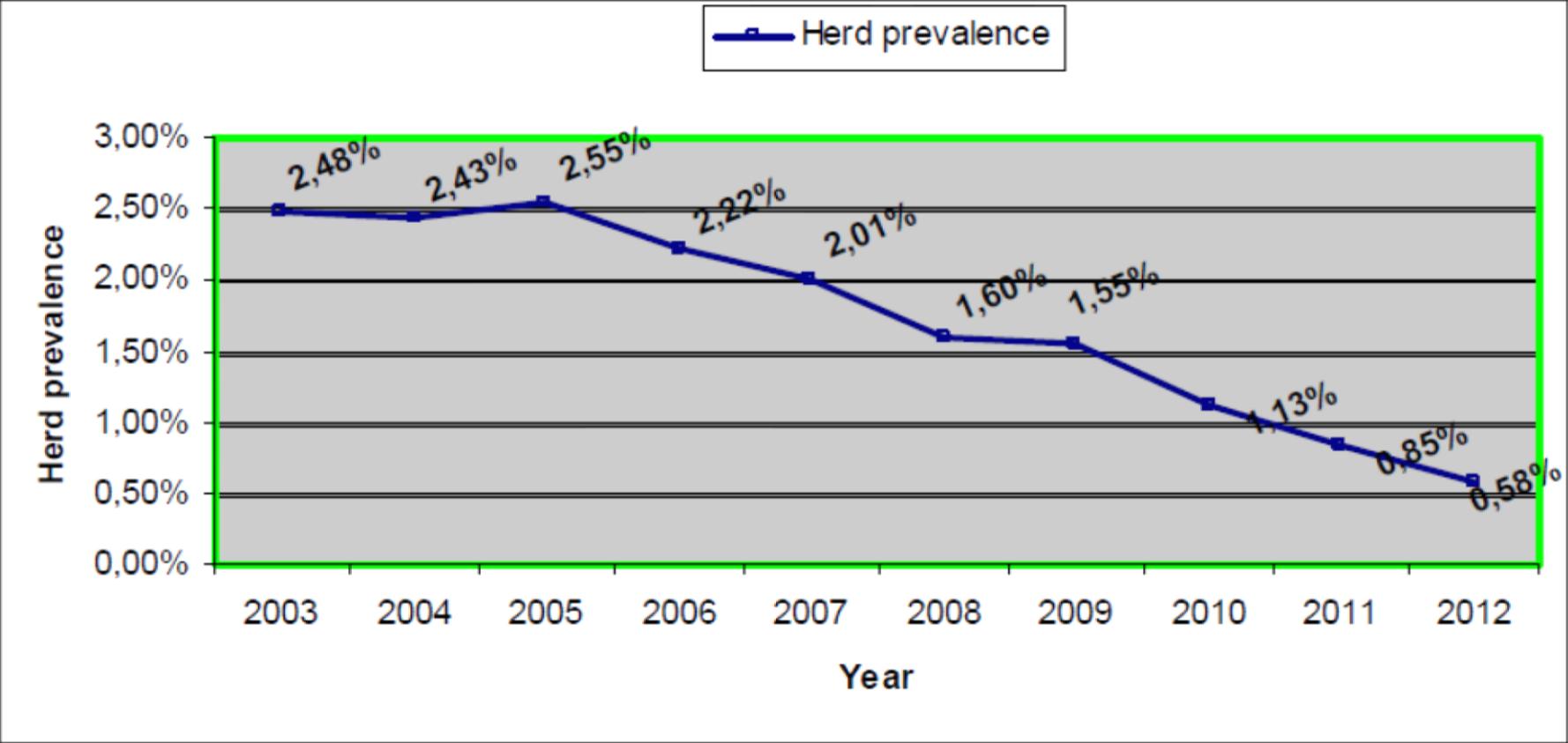
**Sheep and goat
brucellosis**
OBF provinces
 (70)

ITALIAN REGIONS	ITALIAN OBF PROVINCES
Lombardia	whole Region
Marche	whole Region
Sardegna	whole Region
Toscana	whole Region
Trentino Alto Adige	whole Region
Umbria	whole Region
Piemonte	whole Region
Friuli Venezia Giulia	whole Region
Liguria	Savona
Veneto	whole Region
Lazio	Latina, Rieti, Roma, Viterbo
Abruzzo	Pescara
Molise	whole Region
Emilia Romagna	whole Region
Valle d'Aosta	whole Region
TOTAL	70

Sheep and goat herds tested in Italy

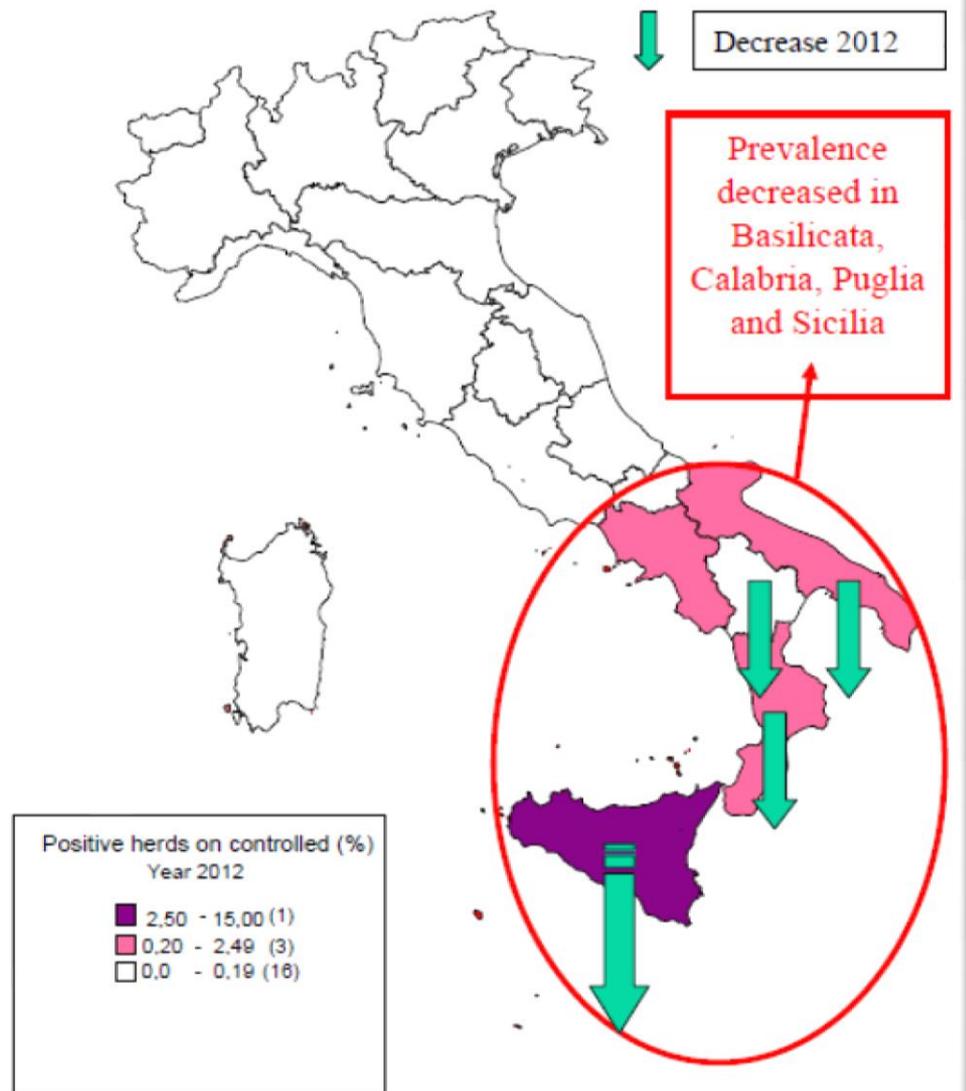


Positive herds



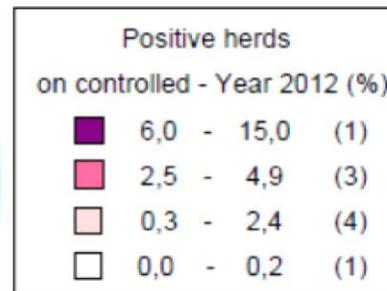
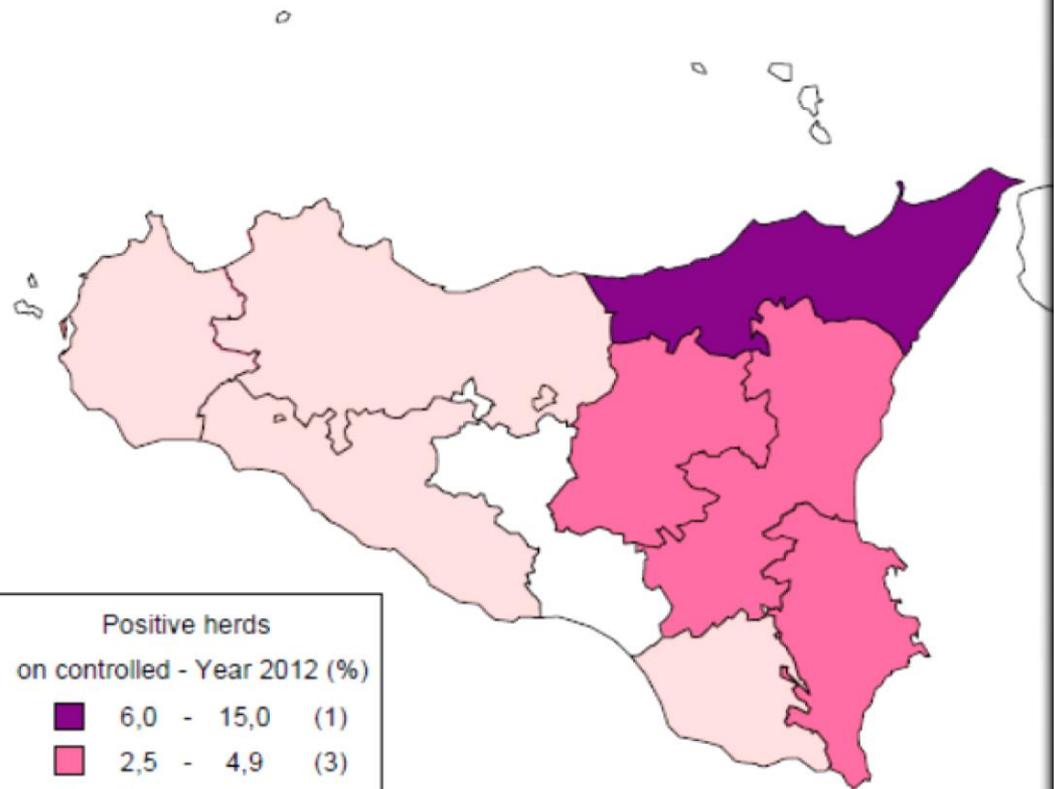
Percentage of infected flocks in 2012

Region	Percentage infected flocks
Sicilia	5,58%
Calabria	1,09%
Campania	0,92%
Puglia	0,41%
Molise	0,11%
Basilicata	0,09%
Toscana	0,01%
Abruzzo	0,00%
Bolzano	0,00%
Emilia Romagna	0,00%
Friuli Venezia Giulia	0,00%
Lazio	0,00%
Liguria	0,00%
Lombardia	0,00%
Marche	0,00%
Piemonte	0,00%
Sardegna	0,00%
Trento	0,00%
Umbria	0,00%
Valle d'Aosta	0,00%
Veneto	0,00%
Total	0,58%



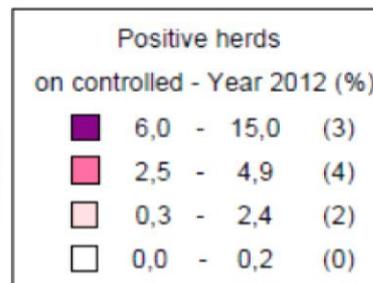
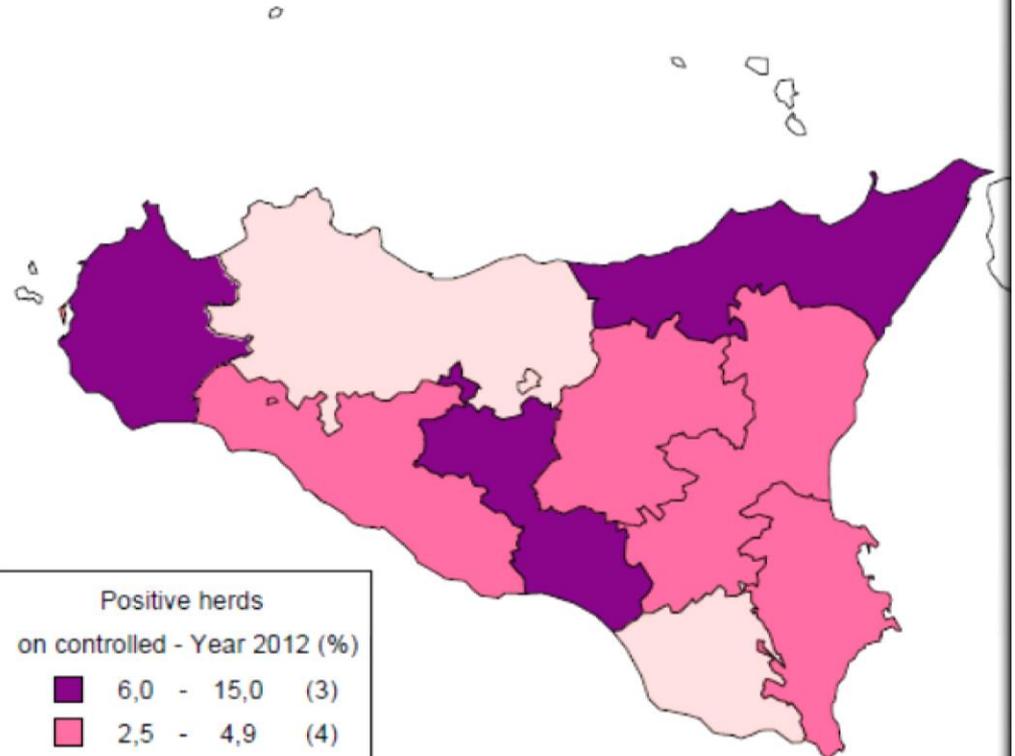
Bovine brucellosis positive herds in 2012

PROVINCE	POSITIVE HERDS
MESSINA	6,27%
CATANIA	4,43%
ENNA	3,59%
SIRACUSA	2,86%
PALERMO	1,27%
TRAPANI	1,03%
RAGUSA	0,73%
AGRIGENTO	0,60%
CALTANISSETTA	0,00%
SICILY	2,79%

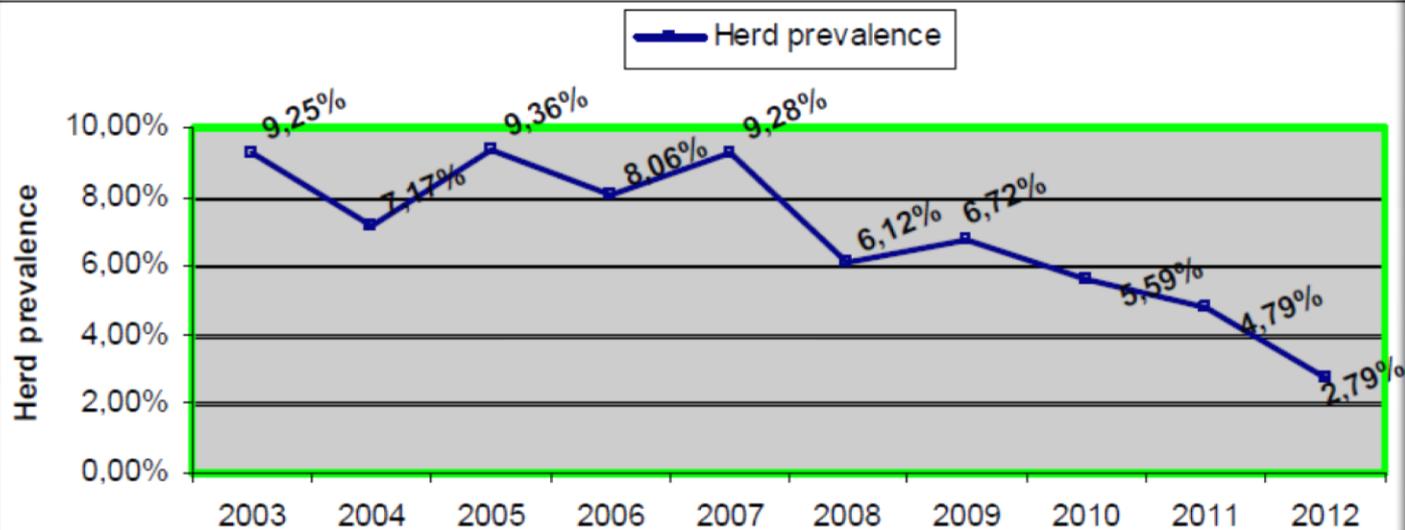


S&G brucellosis positive herds in 2012

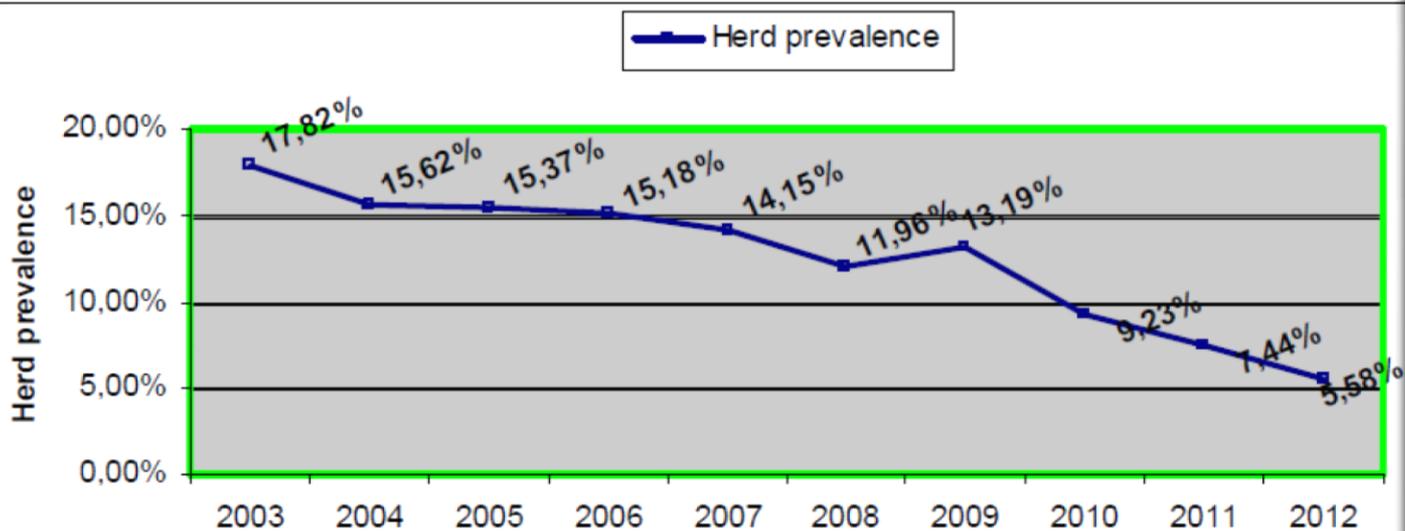
PROVINCE	POSITIVE HERDS
TRAPANI	13,04%
MESSINA	10,91%
CALTANISSETTA	10,11%
ENNA	5,07%
AGRIGENTO	4,15%
CATANIA	3,86%
SIRACUSA	2,99%
RAGUSA	2,17%
PALERMO	2,13%
SICILY	5,58%



Bovine brucellosis positive herds in Sicily



S&G brucellosis positive herds in Sicily



Overall picture

- At national level slight increase of holdings controlled and steady decrease, since 2009, of herd prevalence for both bovine and S&G brucellosis
- Liguria and Lazio presented to the European Commission for the recognition as OF and still under evaluation
- Evident decrease of herd prevalence in Sicilia, with major problems concentrated in the province of Messina and good outcome in Catania and Enna, as evidenced in EU audit from 18 to 21 March 2013
- S & G vaccination with REV1 stopped in Sicily since 2011, with cut of community co-financing from 2005 to 2010 because of inadequate implementation of vaccination

Actions at a Regional level (Sicily)

Proposed in November 2012 for areas with major problems

- follow up in outbreaks of brucellosis of at least 21 days up to a maximum of 30 days
- electronic identification of all positive animals and all animals directed to transhumance
- compulsory use of SANAN system and SIMAN system
- drawing of epidemiological reports, by Region Sicily, every three months through SANAN
- GPS identification of all holdings and pasture at risk of infection through National Database
- stamping out of infected S & G holdings after 5th consecutive positive control
- audits carried out in Local Veterinary Units



Actions at a National level



Ministry of Health) ordinanza OM 09/08/2012

- Slaughter of TB, brucellosis and leukosis positive animals within 15 days from notification to the owner;
- Identification of positive and transhumant animals with electronic bolus in order to guarantee traceability;
- Registration of control activities through internet (i.e. SANAN system)
- Report of positive holdings and epidemiological enquiries through internet (i.e. SIMAN system);
- Sampling of infected and suspected animals at slaughterhouse;
- Transhumance allowed for officially free holdings only, authorized by Local Veterinary Unit (ASL) through internet (National Database), with pre-movement testing;
- Special measures for dealer premises;
- Compensation to the owner of positive animals within 90 days from the date of slaughter, checked on the National Database;
- Cut of community funding - premi PAC – for non-cooperative farmers ;
- Substitution of the regional powers with special representative of the CCA (Commissario ad acta) in case of failure of the Region;
- Fine for anyone non respecting the rules of the ordinanza;

Regione veneto – Brucellosi bovina

	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Allevamenti controllabili	14.966	13.303	12.503	11.484	11.178	10.589	9.934	9.118	9.031	7.914	7.787
Allevamenti controllabili previsti dal programma regionale	14.966	13.303	12.503	11.484	11.178	10.589	9.934	9.118	4.609	2.450	2.014
Allevamenti controllati	14.371	12.915	12.503	11.484	11.178	10.589	9.934	9.118	4.609	2.450	2.014
% Allevamenti controllati	96,0	97,1	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Capi controllabili	324.107	310.328	308.927	299.430	286.429	297.004	279.215	293.809	285.149	203.399	197.603
Capi controllati	312.954	302.529	308.927	299.430	286.429	297.004	279.215	293.809	248.681	72.256	75.722
% Capi controllati	96,6	97,5	100	100	100	100	100	100	87,2	35,5	38,3
Allevamenti positivi	7	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Allevamenti reinfettati	7	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Capi positivi	7	3	0	19	0	0	0	0	0	0	0
Capi abbattuti	5	3	0	19	0	0	0	0	0	0	0
Abbattimento totale n° allevamenti*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Capi non infetti abbattuti	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Allevamenti ufficialmente indenni	14.259	13.153	12.494	11.473	11.178	10.589	9.934	9.118	9.031	7.914	7.787
% Allevamenti ufficialmente indenni	95,3	98,9	99,9	99,9	100	100	100	100	100	100	100,0
Prevalenza	0,05	0,02	0,00	0,02	0	0	0	0	0	0	0
Incidenza	0,05	0,02	0,00	0,02	0	0	0	0	0	0	0
% Capi positivi sui controllati	0,00	0,00	0,00	0,01	0	0	0	0	0	0	0

* Numero allevamenti in cui è stato effettuato abbattimento totale

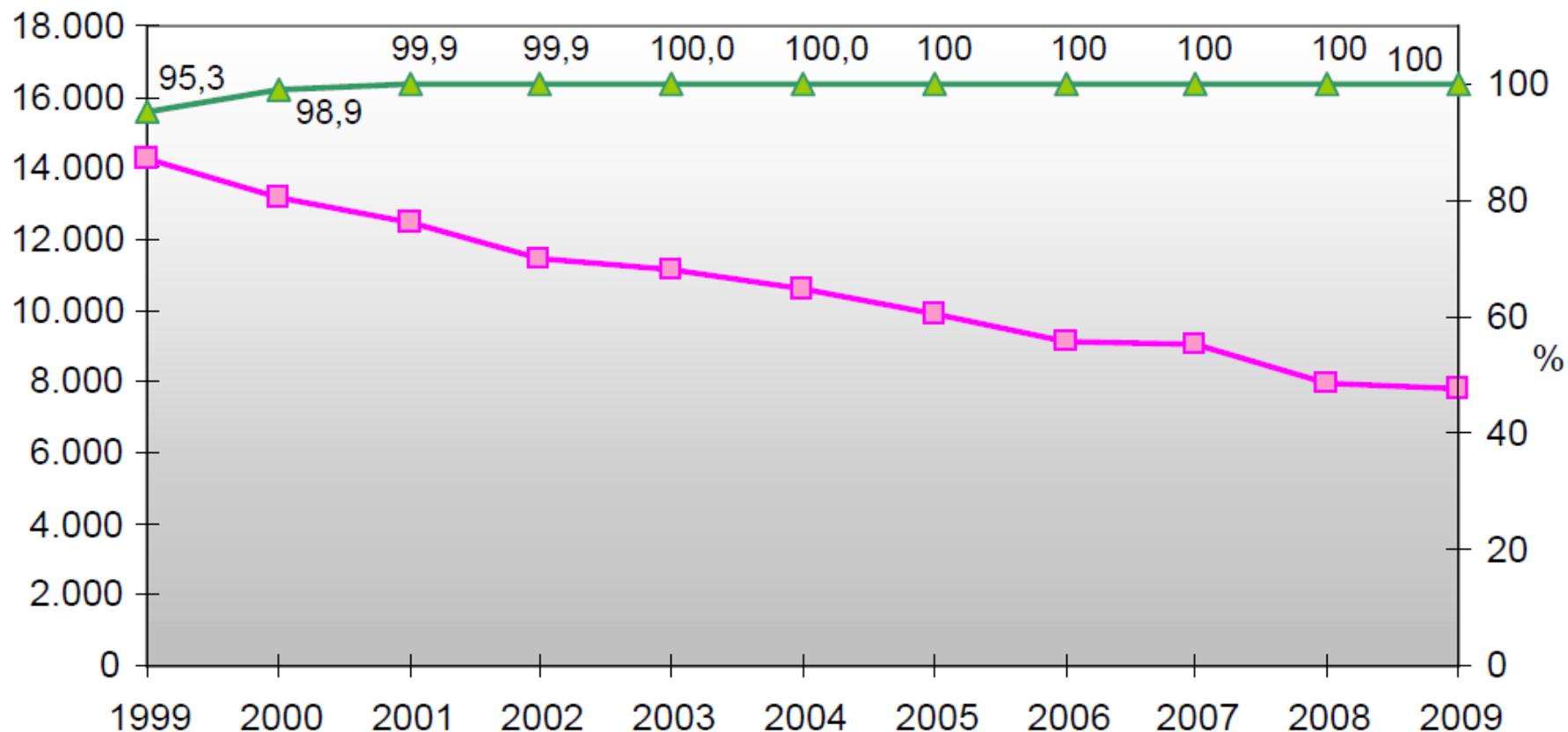
Regione veneto – Brucellosi bovina

Figura 5. Allevamenti controllabili nel programma regionale e controllati. Anni 1999-2009



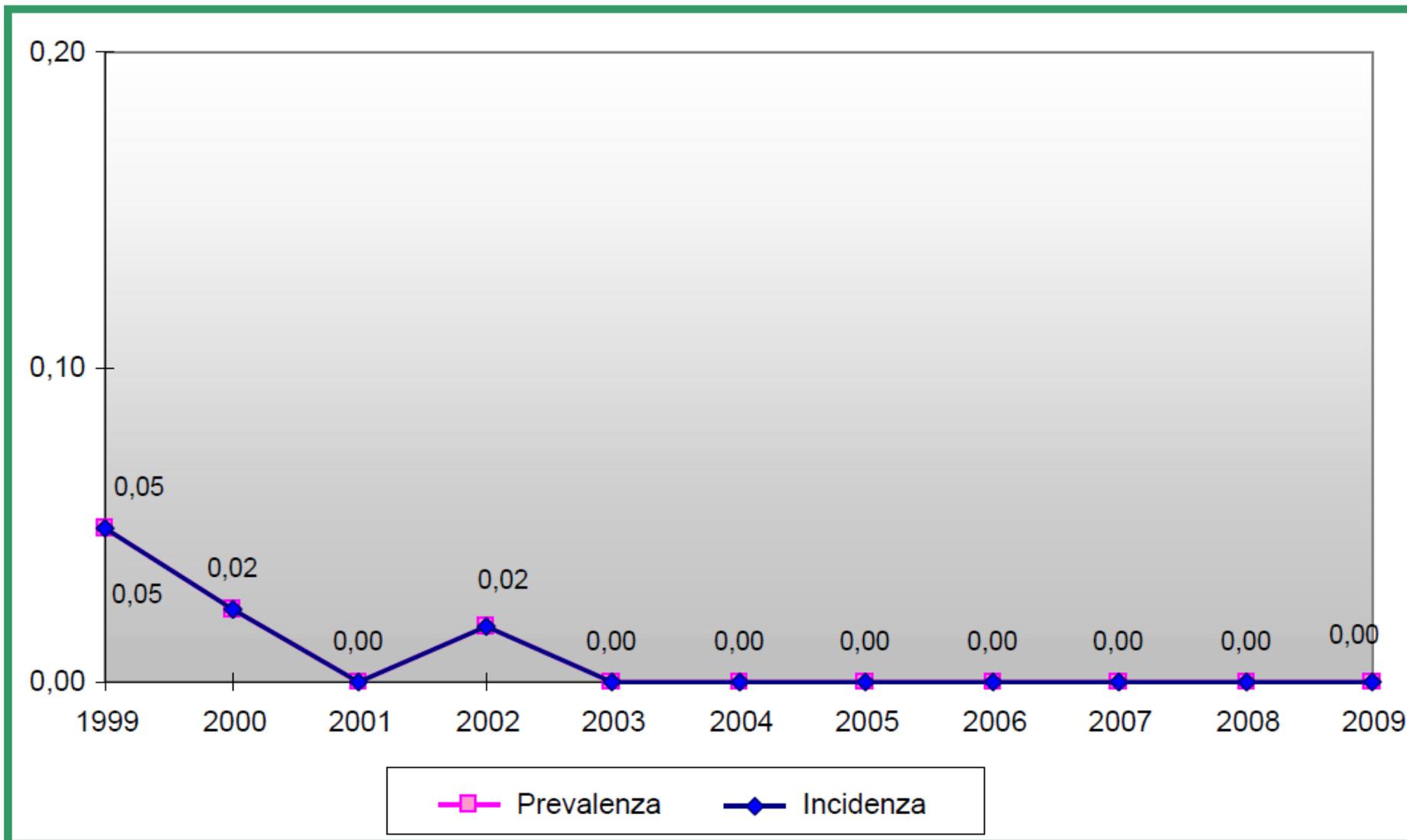
Allev. controllabili previsti dal programma regionale Allev. Controllati % Allev. controllati

Regione veneto – Brucellosi bovina



Allev. Uff. Indenni % Allev. Uff. indenni

Regione veneto – Brucellosi bovina

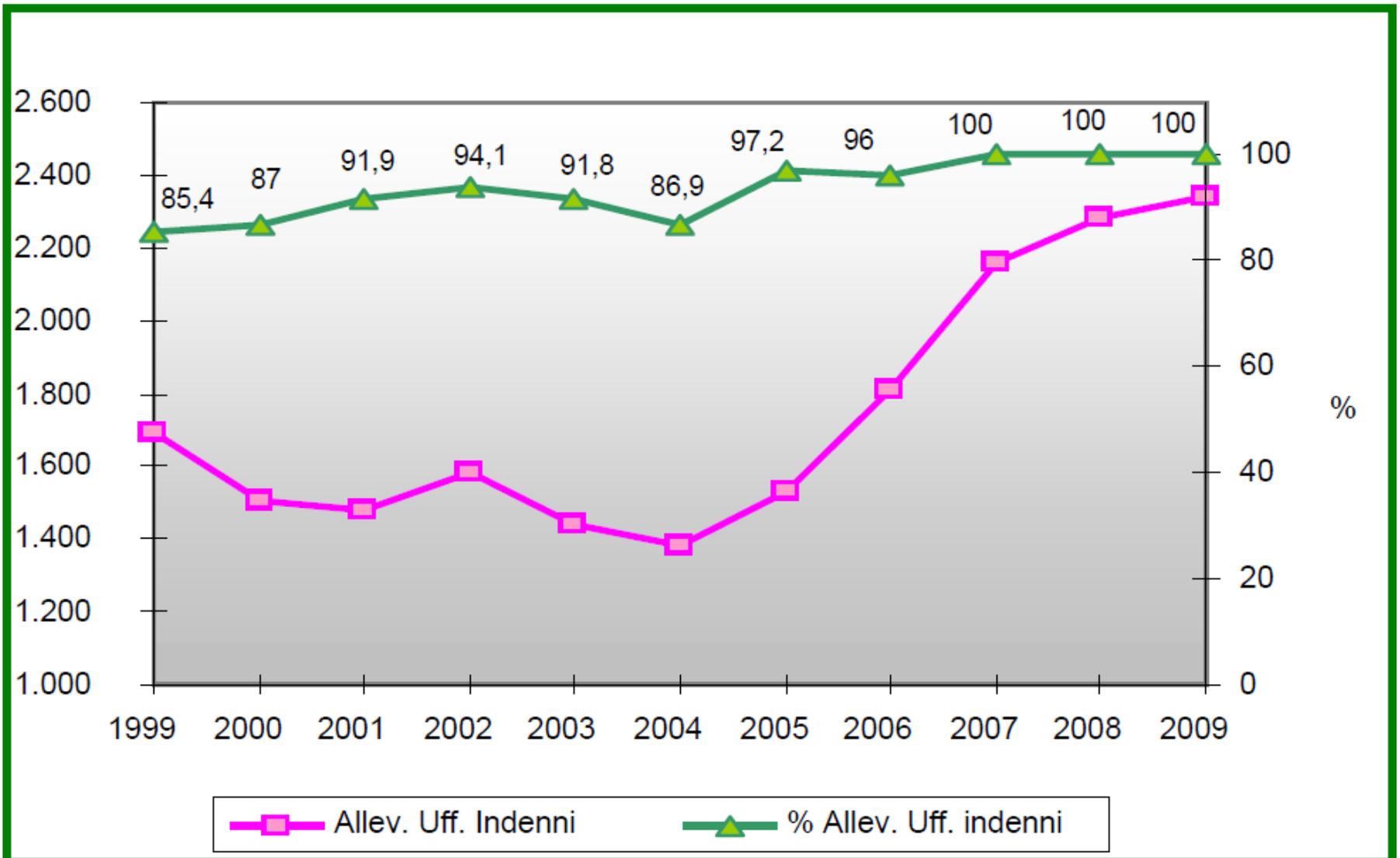


Regione veneto – Brucellosi ovi-caprina

	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Allevamenti controllabili	1.982	1.731	1.611	1.686	1.571	1.592	1.578	1.888	2.161	2.282	2.342
Allevamenti controllabili previsti dal programma regionale	1.982	1.731	1.611	1.686	1.571	1.592	1.578	1.888	2.161	1.260	877
Allevamenti controllati	1.735	1.428	1.501	1.626	1.443	1.474	1.534	1.888	2.057	1.260	877
% Allevamenti controllati	87,5	82,5	93,2	96,4	91,9	92,6	97,2	100	95,2	100	100
Capi controllabili	43.099	41.929	42.114	41.959	40.350	49.075	44.264	46.451	52.461	56.715	57.356
Capi controllati	39.443	38.733	41.459	41.137	38.249	44.942	43.376	46.451	51.460	29.166	34.540
% Capi controllati	91,5	92,4	98,4	98,0	94,8	91,6	98,0	100	98,1	51,4	60,2
Allevamenti positivi	3	1	1	0	1	0	0	0	2	0	0
Allevamenti reinfettati	3	1	1	0	1	0	0	0	2	0	0
Capi positivi	7	1	1	0	4	0	0	0	3	0	0
Capi abbattuti	7	1	1	0	4	0	0	0	22	0	0
Abbattimenti totali, n° allevamenti.*	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
Capi non infetti abbattuti	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0
Allevamenti ufficialmente indenni	1.693	1.506	1.481	1.586	1.442	1.384	1.534	1.812	2.161	2.282	2.342
% Allevamenti ufficialmente indenni	85,4	87,0	91,9	94,1	91,8	86,9	97,2	96,0	100	100	100
Prevalenza	0,17	0,07	0,07	0	0,07	0	0	0	0,10	0	0
Incidenza	0,17	0,07	0,07	0	0,07	0	0	0	0,10	0	0
% Capi positivi sui controllati	0,02	0	0	0	0,01	0	0	0	0,01	0	0

* Numero allevamenti in cui è stato effettuato abbattimento totale

Regione veneto – Brucellosi ovi-caprina



Regione veneto – Brucellosi ovi-caprina

