

IZS

TERAMO

/

WOAH Reference Laboratory
for Brucellosis

Reference Centre  World Organisation
for Animal Health
Founded as OIE

***BRUCELLA CANIS*: da malattia
trascurata a rischio zoonotico
emergente.**

**Sviluppo di un kit operativo per la
gestione di focolai in un'ottica One
Health**

**I RISULTATI DELLA RICERCA CORRENTE CONDOTTA DALL'ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELL'ABRUZZO E DEL MOLISE- ANNO 2024**

Teramo, 10 giugno 2025

Brucellosi canina: sviluppo di strumenti diagnostici e modelli gestionali per il controllo di *B. canis* (BruDog)

Responsabile scientifico: Dott. F. De Massis



Obiettivi a breve termine

- Colmare le lacune diagnostiche ed epidemiologiche su *Brucella canis*

Obiettivi a lungo termine

- Sviluppare strumenti e strategie per ridurre il rischio di diffusione nei cani e di infezione nell'uomo
- Fornire strumenti decisionali operativi in ottica "One Health" per la gestione degli animali e degli allevamenti infetti

Brucellosi canina

- La trasmissione avviene in seguito al contatto con animali infetti, per via **orale e/o venerea, tessuti e fluidi** infetti.
- *B. canis* ha un fenotipo rugoso (come *B. ovis*). I normali test per le *Brucelle* lisce non funzionano.

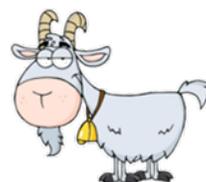
La brucellosi canina è una

zoonosi

Rough phenotype



B. abortus



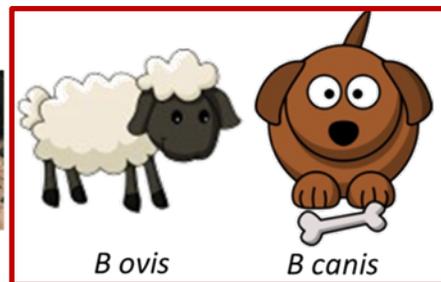
B. melitensis



B. suis



B. neotomae



B. ovis

B. canis



B. ceti



B. pinnipedialis



B. microti



B. inopinata



B. papionis



B. vulpis

Brucellosi canina: segni clinici

- ✓ Problemi riproduttivi ed infertilità:

femmine: aborto spontaneo

maschi: danni apparato riproduttivo.



. 2. Scrotal asymmetry. Note the stud dog's left testicle is smaller than the right testicle.

- ✓ Tutti i cani sono vulnerabili

- ✓ Decorrenza **subclinica** o **asintomatica** → sottostima → diffusione



Fig. 1 Puppies from a late-term abortion (56 days' gestation).



FIGURE 1. Radiograph of the lumbar spine showing vertebral body endplates that are irregular with permeative lysis centered at the disc spaces (arrows). ©The Ohio State University

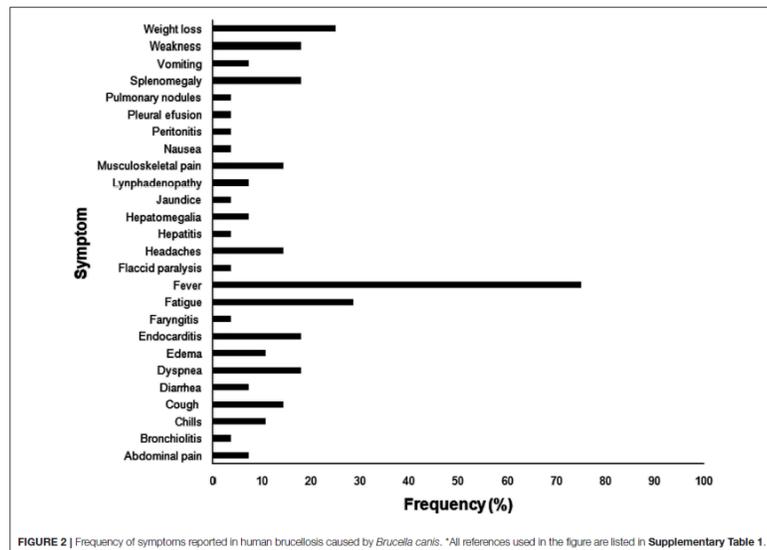
Brucella canis persiste nel sangue

Hollet, 2006, DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.04.011

Wanke, 2006 DOI: 10.1016/j.anireprosci.2004.05.005

Impatto sulla salute umana

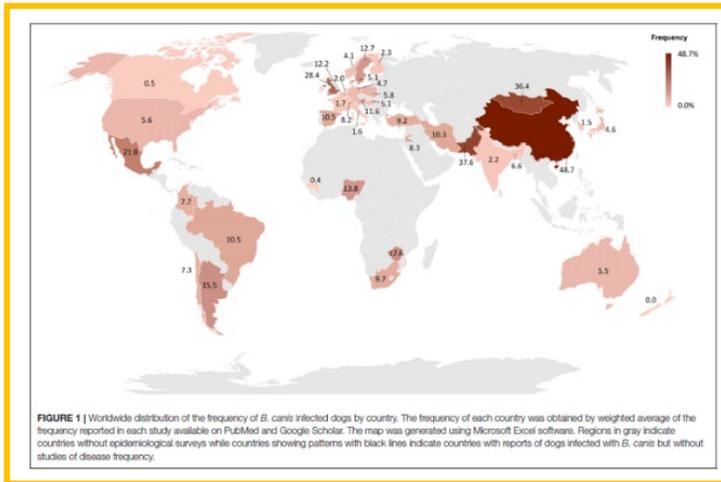
- **Infezione da *B. canis* nell'uomo: sintomi aspecifici simili all'influenza** (Santos R. L., 2021 doi: 10.3389/fvets.2021.594291)
- **Contatto con cani infetti** (HAIRS, 2021) → Rischio elevato per: proprietari cani e bambini, operatori di canili ed allevamenti commerciali, tecnici di laboratorio.
- **Infezioni *B. canis* nell'uomo: sottostimate e raramente diagnosticate** (NO test diagnosi sierologica per l'uomo).



Santos R. L., 2021 doi: 10.3389/fvets.2021.594291

- **Canada 2021** (Amhed- Bentey, J. et al, doi.org/10.3201/eid2709.204701)
- **Netherlands 2022** (Kolwijck, E. et al, doi.org/10.1093/cid/ciac425)
- **UK 2023**: 2 laboratory-confirmed cases (<https://www.bva.co.uk>)

- ✓ **Commercio illegale**
- ✓ **Trasporto non documentato**
(specie da Stati non-EU)



Santos R. L., 2021 doi: 10.3389/fvets.2021.594291

EU Enforcement Action on illegal trade of cats and dogs

PAGE CONTENTS

[Do you really know where your pet comes from?](#)

[Why is it worth to be an aware pet-buyer?](#)

[How much does it cost us?](#)

[EU enforcement action](#)

[Different elements involved in the illegal pet trade](#)

[Related links](#)

The illegal movement of cats and dogs not only impacts the health and welfare of pet animals and public health, but also affects consumers and causes economic damage in tax evasion and undeclared revenues.



Unfair commercial practices



Tax evasion and undeclared revenues



Impact on the health and well pet animals

Do you really know where your pet comes from?



Non sono richiesti **test** per *B. canis* prima o dopo importazione.

Aumento della movimentazione di cani attraverso i confini internazionali



Aumento della distribuzione della brucellosi canina

UK (2017)

– 2 cases Imports from Romania
Lumbosacral diskospondylitis,
B. canis isolated from blood
Since July 2020, > 40 cases
Two human cases confirmed

Netherland (2016–2018)

– investigations in imported dogs (Romania, Eastern Europe)
10 notified seropositive cases and 8 littermates → 14 (78%) had
musculoskeletal disease (lameness and neck or back pain;
discospondylitis diagnosed in 11).
First human case confirmed recently

France (ANSES, pers. com)

since 2020, 3 individual cases
a male dog (no symptom)
imported from US for breeding ;
B. canis isolated from semen
– a 3-y old female dog (neutered)
imported from Romania, with
persisting discospondylitis
– a 5-mo old dog adopted from a
French kennel (American Bully)
– 5 kennels : abortions a few
weeks / months after imports
from Russia (or Bielorussia ?) –
strains isolated from aborted
material + testicles (1-y male)

Sweden (E. Lahti, pers. com)

– Cluster in 2020 ; male imported
from the NL, with links to Mexico

Poland

(Buhmann et al., 2019)
– 6.7 % of submitted samples
presented positive PCR results

Ukraine (2020)

3-y old male Labrador retriever,
orchitis and epididymitis

Germany (Buhmann et al., 2019)

4 young (7 to 30-mo old)
female dogs with
discospondylitis
Imports from Macedonia,
Moldavia, Romania

Italy (2020)

breeding kennel hosting Chihuahua, Pomeranian
Spitz, Maltese and Poodle toy (Ancona)

Portugal (INIAV, pers. com)

– 2018–2019: 2 kennels with
seropositive results (9/16, 56%) +
PCR positive puppies

Spain (Buhmann et al., 2019)

– 11.1% of submitted samples
presented positive PCR results

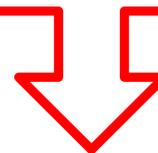
Switzerland (2019)

21-mo old male with
epididymitis and orchitis
– imported from Germany
(2018) 1 kennel



Focolaio in Italia

Aprile 2020: due feti abortiti di Chihuahua sono stati inviati presso i Laboratori di IZSUM (AN) per la ricerca di agenti abortigeni



Anamnesi:
MESI DI CASI DI ABORTO, INFERTILITÀ, DISORDINI RIPRODUTTIVI



LNR identifica
Brucella canis

First Isolation of *Brucella canis* from a breeding kennel in Italy

Fabrizio De Massis¹, Flavio Sacchini¹, Daniela Averaimo^{1*}, Giuliano Garofolo¹, Pierdavide Lecchini², Luigi Ruocco², Roberto Lomolino², Ugo Santucci², Elisa Sgariglia³, Silvia Crotti³, Antonio Petrini¹, Giacomo Migliorati¹, Nicola D'Alterio¹, Stefano Gavaudan³ and Manuela Tittarelli¹

¹National and OIE Reference Laboratory for Brucellosis, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Teramo, Italy.
²Direzione generale della sanità animale e dei farmaci veterinari, Ministero della Salute, Roma, Italy.
³Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati", Perugia, Italy.

*Corresponding author at: National and OIE Reference Laboratory for Brucellosis, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Campo Boario, 64100 Teramo, Italy.
E-mail: d.averaimo@izs.it.

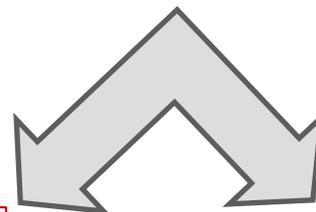
Veterinaria Italiana 2021, **57** (3), 215-226. doi: 10.12834/VetIt.2497.15848.1
Accepted: 01.09.2021 | Available on line: 31.12.2021

De Massis et al., 2021. doi: 10.12834/VetIt.2497.15848.1

683 cani in allevamento: tutti testati

- 475 femmine (69.5%)
- 208 maschi (30.5%)

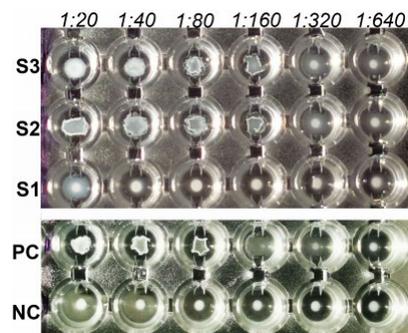
- **241 di 683 (35.3%) positivi test sierologici (microplate Serum Agglutination Test, mSAT)**
- **68 di 683 (10.0%) positivi isolamento batterico**



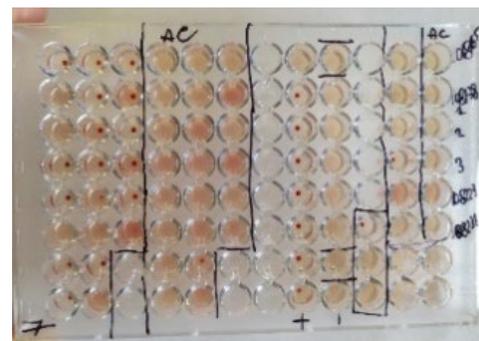
➤ **64 dei 241 (26.6%) positivi all'isolamento e mSAT.**

➤ **4 dei 241 (1,66%) positivi all'isolamento e negativi a mSAT.**

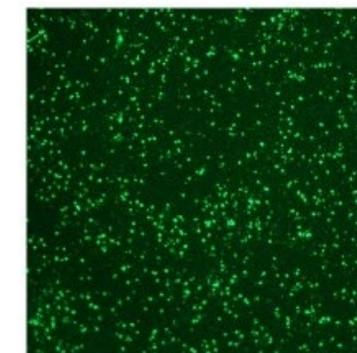
Sviluppo e validazione di test diagnostici



mSAT



***B. ovis*-FdC**



IFAT (IgG)

Test in-house (reagenti IZS-Teramo)

	Infected (n=61) ¹		Uninfected (n=143) ²	
	Positive	Negative	Positive	Negative
mSAT, n (%)	59 (96.7)	2 (3.3)	11 (7.7)	132 (92.3)
<i>B. ovis</i>-CFT, n (%)	59 (96.7)	2 (3.3)	5 (3.5)	138 (96.5)
IFAT, n (%)	60 (98.3)	1 (1.7)	1 (0.7)	142 (99.3)

¹Confirmed by *Brucella canis* isolation. ²From another kennel.

Sviluppo e validazione di test diagnostici



microorganisms



Article

Evaluation of Three Serological Tests for Diagnosis of Canine Brucellosis

Fabrizia Perletta , Chiara Di Pancrazio *, Diamante Rodomonti, Tiziana Di Febo, Mirella Luciani , Ivanka Marinova Krasteva , Marta Maggetti , Francesca Profeta, Romolo Salini , Fabrizio De Massis , Flavio Sacchini  and Manuela Tittarelli 

	mSAT ²	<i>B. ovis</i> -CFT ³	IFAT ⁴
Sensitivity, % (95% CI ¹)	96.7 (88.8–98.7)	96.7 (88.8–98.7)	98.4 (91.3–99.4)
Specificity, % (95% CI ¹)	92.3 (86.7–95.1)	96.5 (92.1–98.2)	99.3 (96.2–99.8)
Accuracy, % (95% CI ¹)	93.6 (89.4–96.2)	96.6 (93.1–98.3)	99.0 (96.5–99.7)

¹ CI = confidence interval; ² mSAT = Microplate agglutination test. ³ *B. ovis*-CFT = *B. ovis* Complement fixation test. ⁴ IFAT = Immunofluorescence antibody test.

	mSAT ² + <i>B. ovis</i> -CFT ³	(mSAT ² + <i>B. ovis</i> -CFT ³) + IFAT ⁴
Sensitivity, % (95% CI ¹)	100.0 (95.3–100.0)	98.4 (91.3–99.6)
Specificity, % (95% CI ¹)	89.5 (83.4–93.5)	99.3 (96.2–99.8)
Accuracy, % (95% CI ¹)	92.6 (88.2–95.5)	92.6 (88.2–95.5)

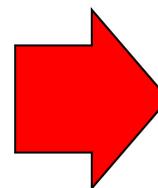
¹ CI = confidence interval. ² mSAT = Microplate agglutination test. ³ *B. ovis*-CFT = *B. ovis* Complement fixation test. ⁴ IFAT = Immunofluorescence antibody test.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms11092162>

Protocollo per la diagnosi di *Brucella canis* (LNR- IZS Teramo)

Test di Screening (LNR/IIZZSS):

1. Microplate Serum Agglutination test (mSAT)
2. *B. ovis* Complement Fixation Test (*B. ovis*-FdC)



Test di Conferma (LNR):

1. IFAT
2. Immunoblotting

Test Batteriologici

(Sangue, Urine, Tamponi diagnostici, etc.)

- Isolamento batterico
 - PCR Real time

Kit operativo per la gestione del focolaio

Received: 22 December 2022 | Revised: 10 July 2023 | Accepted: 25 July 2023

DOI: 10.1002/prca.202200116

Proteomics
Clinical Applications

RESEARCH ARTICLE

Proteomics and bioinformatics investigations to improve serological diagnosis of canine brucellosis

Mirella Luciani¹ | Ivanka Krasteva¹ | Tiziana Di Febo¹  | Fabrizia Perletta¹ |
Federica D'Onofrio² | Fabrizio De Massis¹ | Nicola D'Alterio¹ | Flavio Sacchini¹ |
Manuela Tittarelli¹

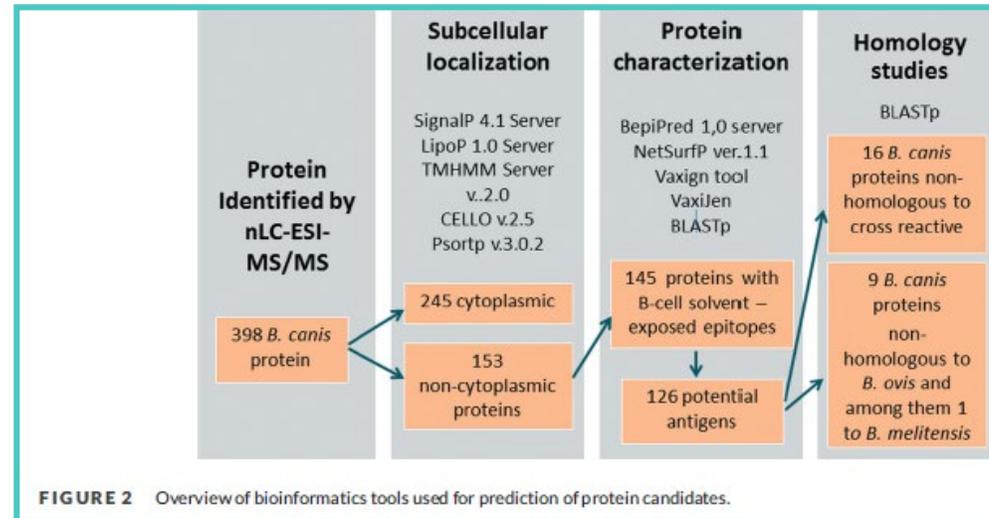


FIGURE 2 Overview of bioinformatics tools used for prediction of protein candidates.

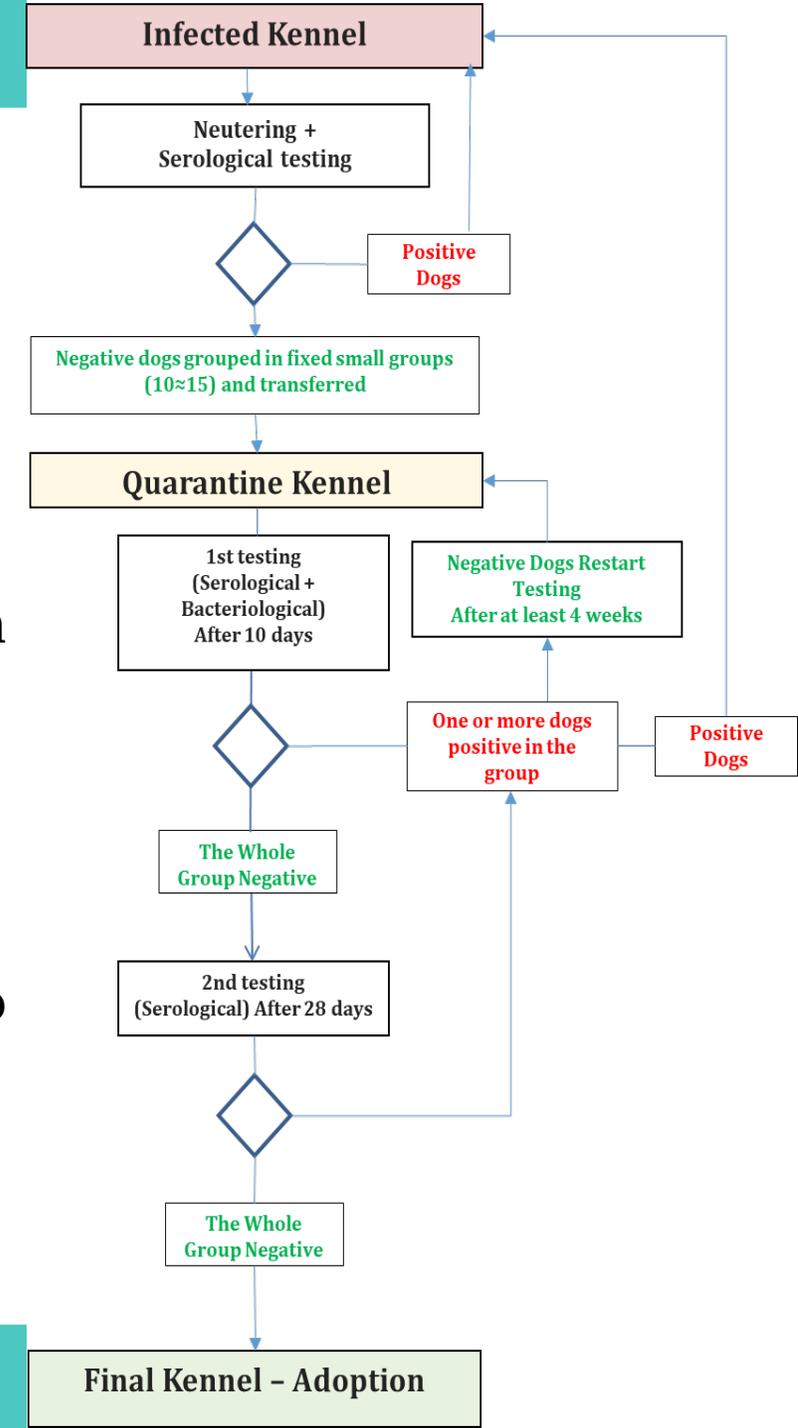
TABLE 1 *B. canis* proteins resulted non-homologous to *B. ovis*.

Entry	Protein	GO annotations
A9M593	DNA-invertase	DNA binding, DNA integration, DNA strand exchange activity
A9M7U6	DNA-invertase	DNA binding, DNA integration, DNA strand exchange activity
A9MA74	25 kDa outer-membrane immunogenic protein	Outer membrane protein
A9MAD4	Uncharacterized protein	DUF945 domain-containing protein
A9MAQ6	Sec-independent protein translocase protein TatB	Protein transmembrane transporter activity
A9MAX4	Extracellular solute-binding protein family 3 ^a	Membrane protein, ligand-gated ion channel activity
A9MBX5	Probable sugar-binding periplasmic protein	Cellular component (periplasmic space); transporter activity
A9MD70	D-xylose ABC transporter, substrate-binding protein	ATP-binding cassette (ABC) transporter complex, substrate-binding subunit-containing; D-xylose transmembrane transport; monosaccharide binding
Q45110	25 kDa outer-membrane immunogenic protein	Outer membrane protein

^aNon homologous to *Brucella melitensis*

Kit Operativo per la Gestione del Focolaio

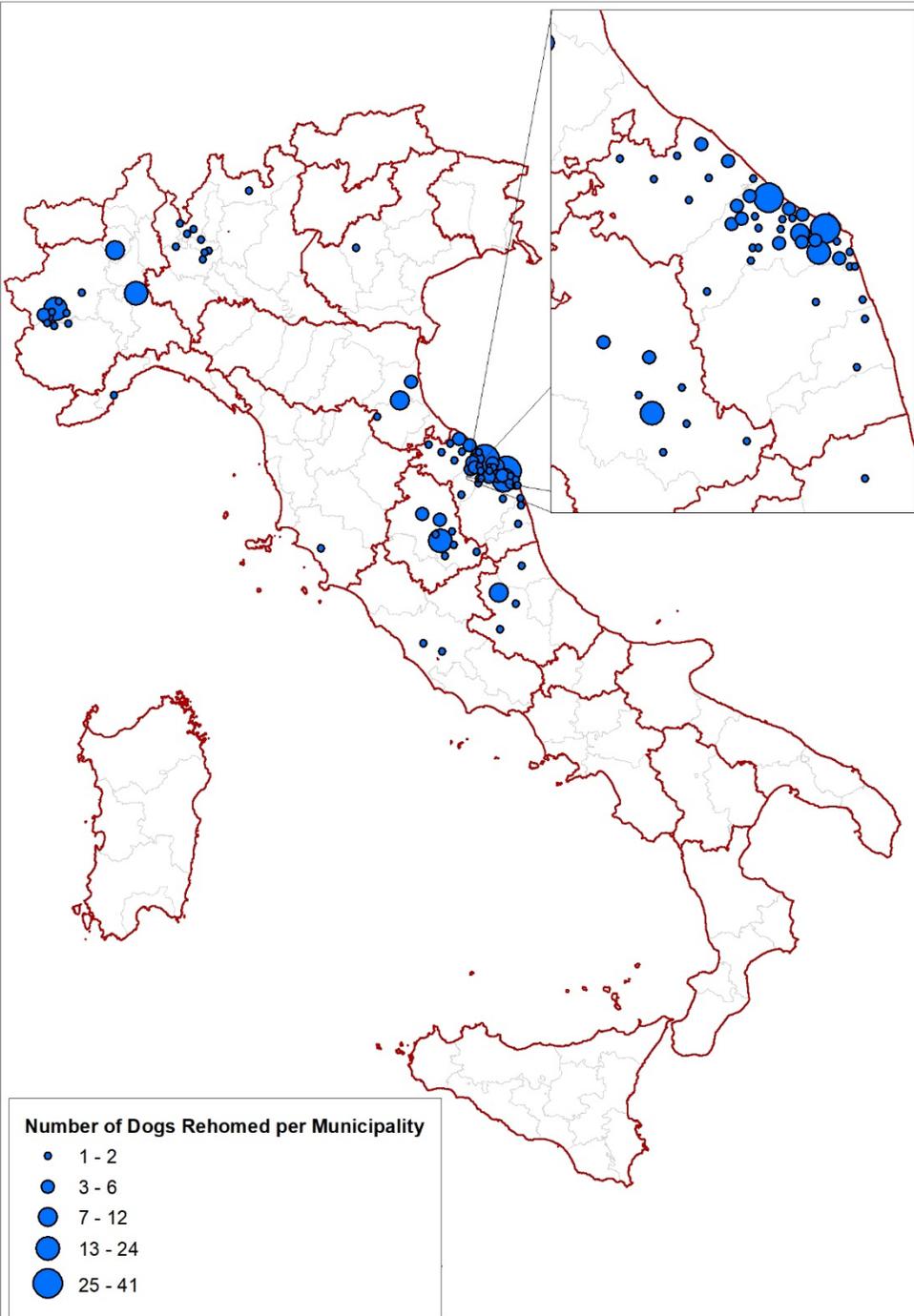
- **No kill strategy**
- **Sterilizzazione e test sierologici**
- **Cani negativi** trasferiti in piccoli gruppi in un secondo canile e ri-testati dopo 10 e 28 gg
- **Cani positivi** vengono reinviati al canile infetto
- **Cani negativi** dopo due prelievi → adottabili
- I cani sieropositivi rimasti nel canile vengono testati periodicamente.

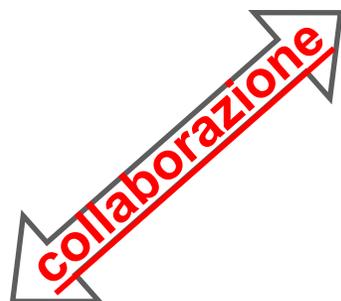


Kit Operativo per la Gestione del Focolaio: controllo dei cani adottati

I cani adottati devono essere controllati a 3, 6, 12 mesi dall'adozione e poi annualmente

Consenso informato





....E l'uomo??

1. **Solo test diretti per diagnosi nell'uomo**
2. Sieri positivi per lo sviluppo di test sierologici per l'uomo
Poche referenze in letteratura:
 - Sanchez- Jimenez, M.M. et al, 2020 [10.1016/j.heliyon.2020.e04393](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04393)
 - Lucero, N.E. et al 2009, <https://doi.org/10.1017/S0950268809990525>
 - Lucero, N.E, et al.,2005 [10.1017/S0950268809990525](https://doi.org/10.1017/S0950268809990525)
3. Programmi di sensibilizzazione: consapevolezza dei rischi, favorire diagnosi e gestione dei casi
4. **Collaborazione** tra servizi veterinari e sanitari
5. La Brucellosi canina dovrebbe essere considerata in pazienti con sintomi simil-influenzali

Efficacia del Kit Operativo

Management di grandi focolai

No-kill strategy + Controlli periodici + Selezione degli animali non infetti

- Diminuzione popolazione infetta
 - No reinfezioni
 - Riduzione spese gestione

Re-homing: anni dopo l'adozione, nessuno degli animali è risultato positivo

Conclusioni

- Migliorare la **tracciabilità canina**
- Obbligo di **notifica** della malattia ai Servizi Sanitari, WOAH ed EU
- Implementare **test diagnostici di routine** per i cani da riproduzione
- Necessità di un **quadro normativo** adeguato per la gestione dei focolai
- Promuovere un approccio **One Health** attraverso la collaborazione tra i settori della salute veterinaria e della sanità pubblica

IZS

TERAMO

WOAH Reference Laboratory
for Brucellosis

Reference Centre  World Organisation
for Animal Health
Founded as OIE

IZS

TERAMO

CENTRO DI REFERENZA
NAZIONALE PER LE
BRUCELLOSI

WOAH Reference Laboratory
for Brucellosis

Reference Centre  World Organisation
for Animal Health
Founded as OIE



Ministero della Salute
IZSAM02/21 RC



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
dell'Umbria e delle Marche