



ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO



CRN Brucellosi

Centro di Riferenza Nazionale

La brucellosi nell'era dell'epidemiologia molecolare

Giuliano Garofolo
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise - G. Caporale
Sala Conferenze Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta
Via Bologna 148 – Torino





ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO



CRN Brucellosi

Centro di Riferenza Nazionale



Indice

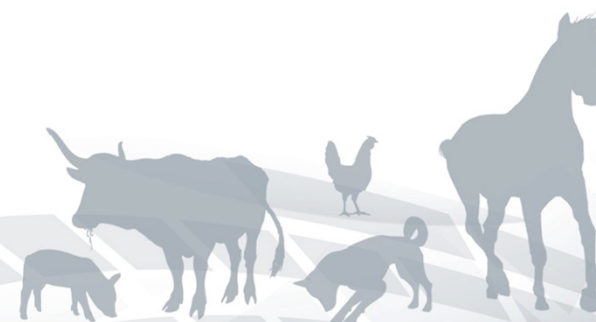
Brucellosi

Epidemiologia molecolare

MLVA

WGS

Un caso



Brucellosi FACTSHEET

Una delle zoonosi più diffuse al mondo (500,000 casi l'anno)

Infezioni nell'uomo non sono letali

Zoonosi sottovalutata “negletta” che crea problemi di sanità pubblica

Brucella è un patogeno poco studiato

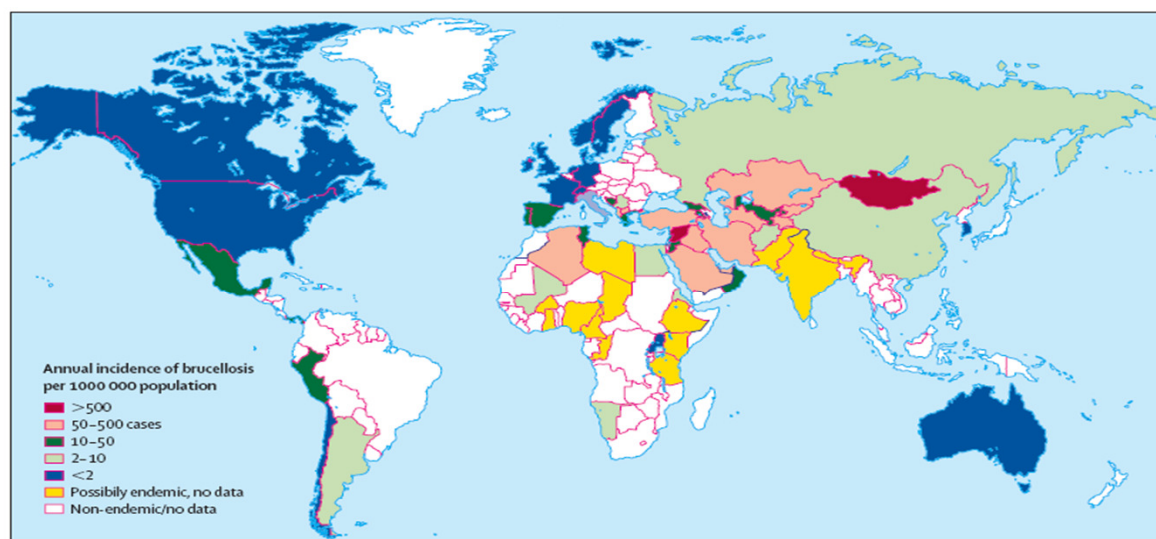
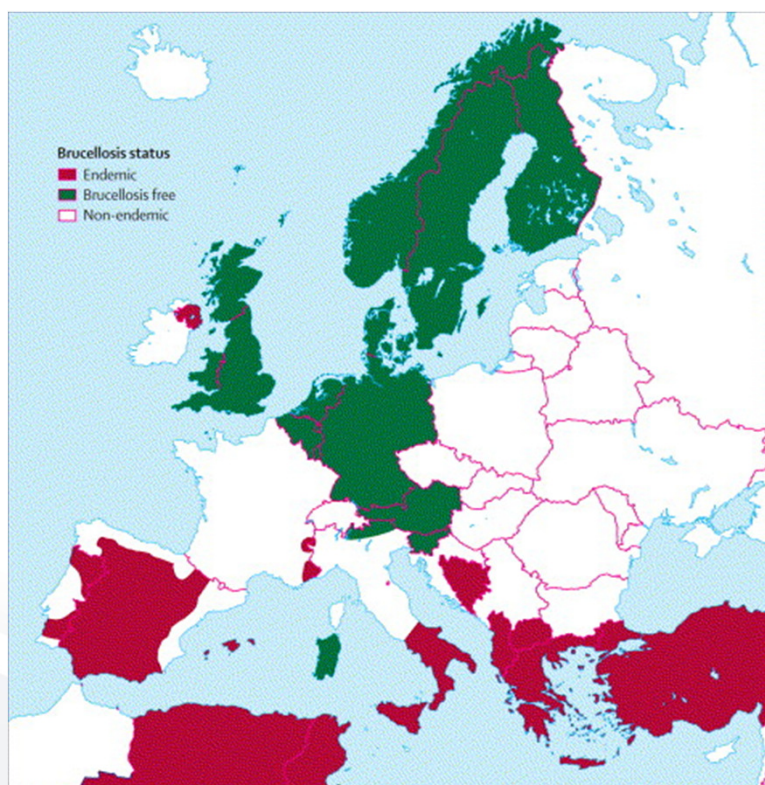


Figure 1: Worldwide incidence of human brucellosis



Mediterraneo



Pappas *et al.* 2006

Neglected disease in the
developing countries
“neglected disease of the
poverty” in Europe
(Hotez and Gurwith 2011)





Food-borne vs occupazionale

Alimentare

Occupazionale

Malattia da
viaggio

Infezioni da
laboratorio

Trasmissione
sessuale

Live Nativity and Brucellosis, Sicily

Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 12, No. 12, December 2006

ORIGINAL ARTICLE

10.1111/j.1469-0691.2005.01204.x

Correlation between animal and human brucellosis in Italy during the period 1997–2002

F. De Massis¹, A. Di Girolamo², A. Petrini¹, E. Pizzigallo² and A. Giovannini¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale', Teramo and ²Clinica Malattie Infettive, Università degli Studi 'G. d'Annunzio', Chieti, Italy

Garofolo et al. BMC Res Notes (2016) 9:277
DOI 10.1186/s13104-016-2074-7

BMC Research Notes

SHORT REPORT

Open Access



Cases of human brucellosis in Sweden linked to Middle East and Africa

Giuliano Garofolo^{1*}, Antonio Fasanella², Elisabetta Di Giannatale¹, Ilenia Platone¹, Lorena Sacchini¹, Tiziana Persiani¹, Talar Boskani³, Kristina Rizzardi³ and Tara Wahab³

Relationship between occupational exposure and exposure via food

Fig. 3 shows the monthly distribution of human cases in relation to monthly percentage of lamb

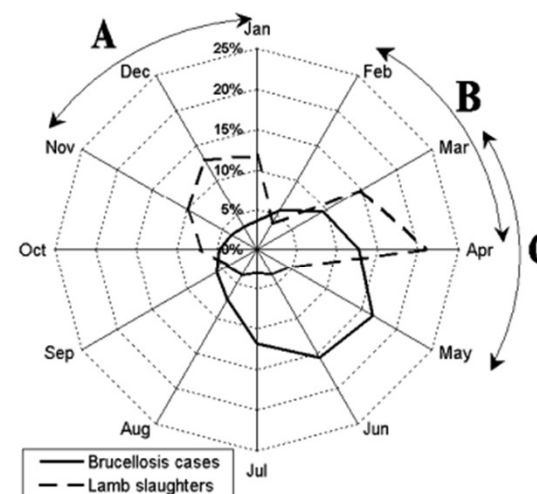
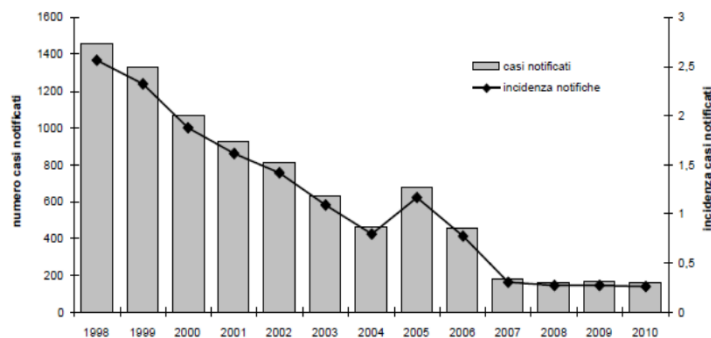


Fig. 3. Relationship between the monthly distribution of human cases of brucellosis in Italy and the percentage of lamb slaughters (1997–2002). A, secondary period of peak incidence (expected for occupational exposure). B, expected period of peak incidence for occupational exposure. C, expected period of peak incidence for foodborne exposure.

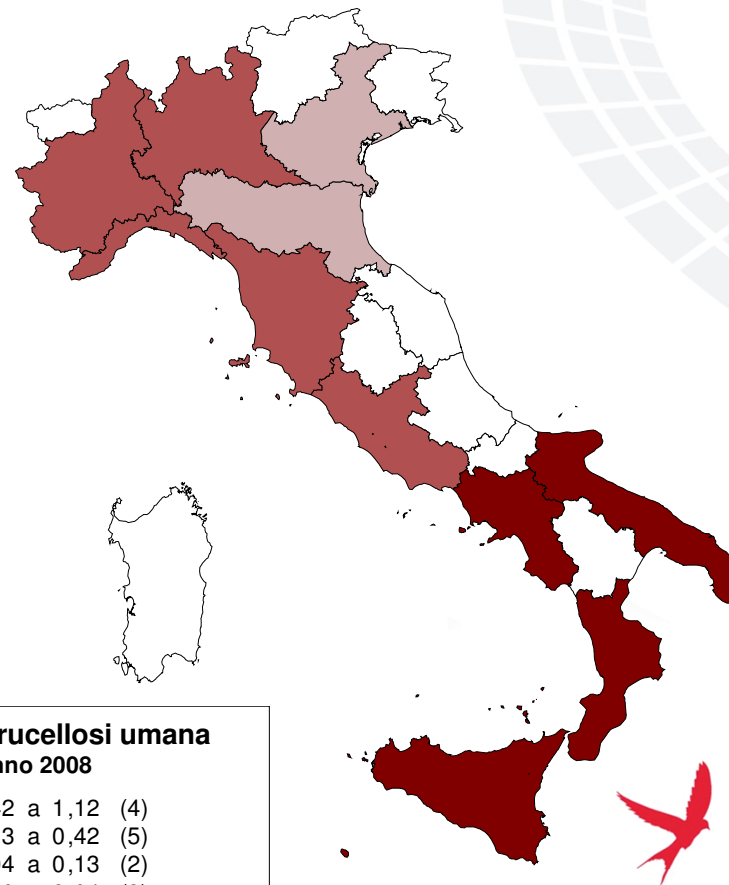
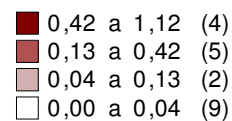


Brucellosi in Italia

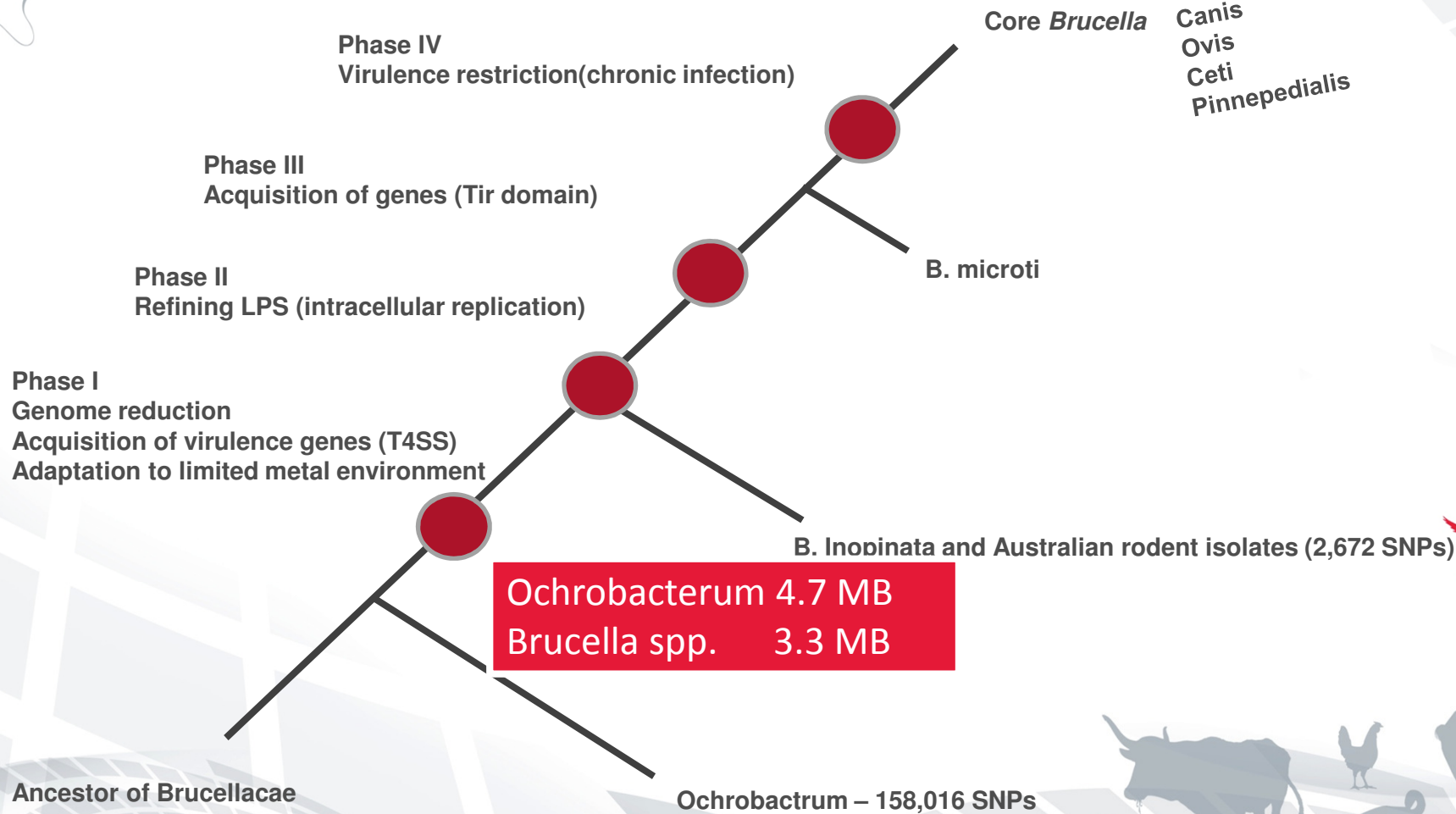


Negli anni '70 incidenza di 5 casi per 100000 mentre attualmente si registra incidenza 0,2
L'89% dei casi notificati tra il 1998 e il 2010 sono stati registrati in Campania, Puglia, Calabria e Sicilia.

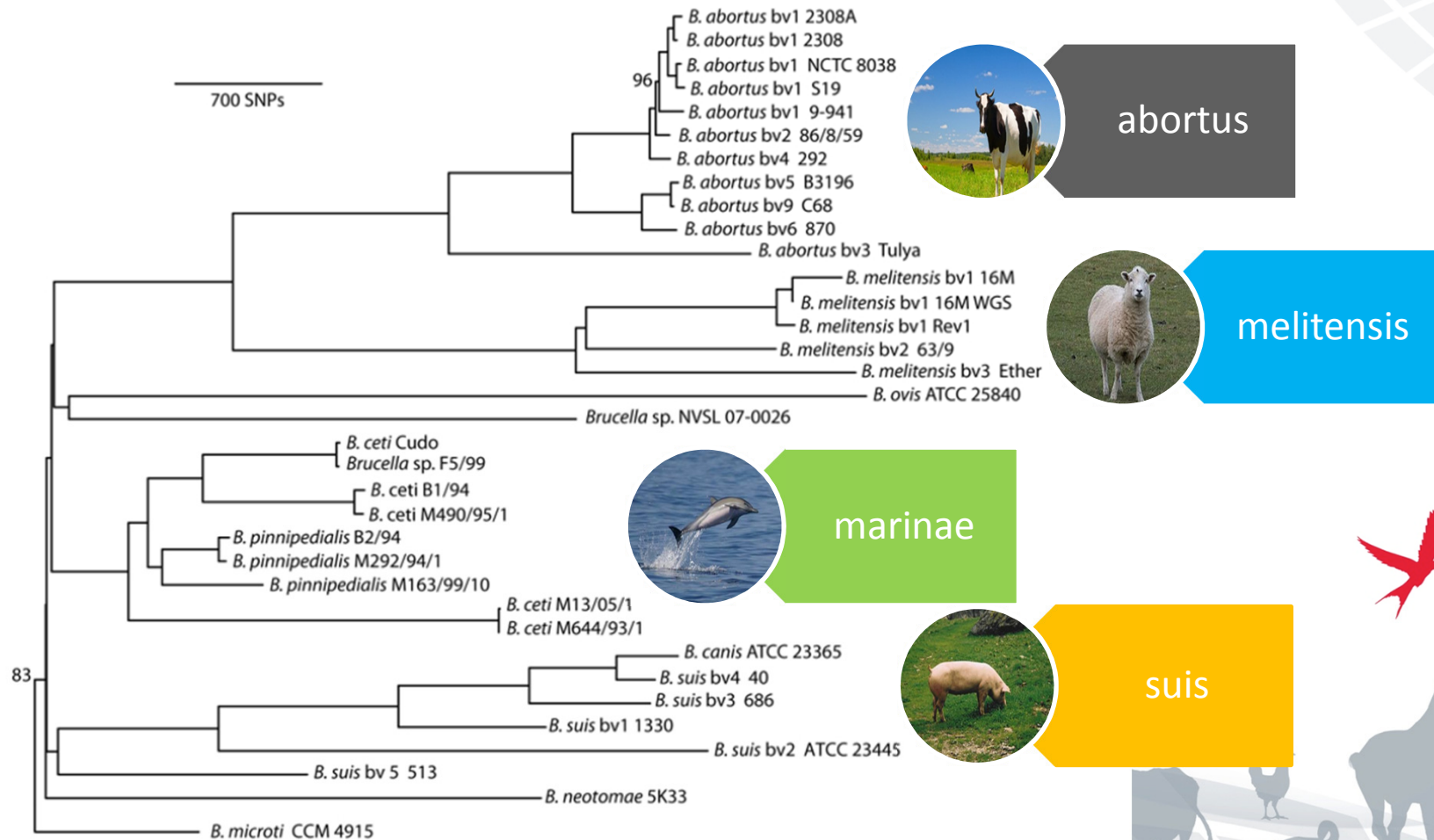
Incidenza brucellosi umana
anno 2008



Modello evolutivo della virulenza di Brucella

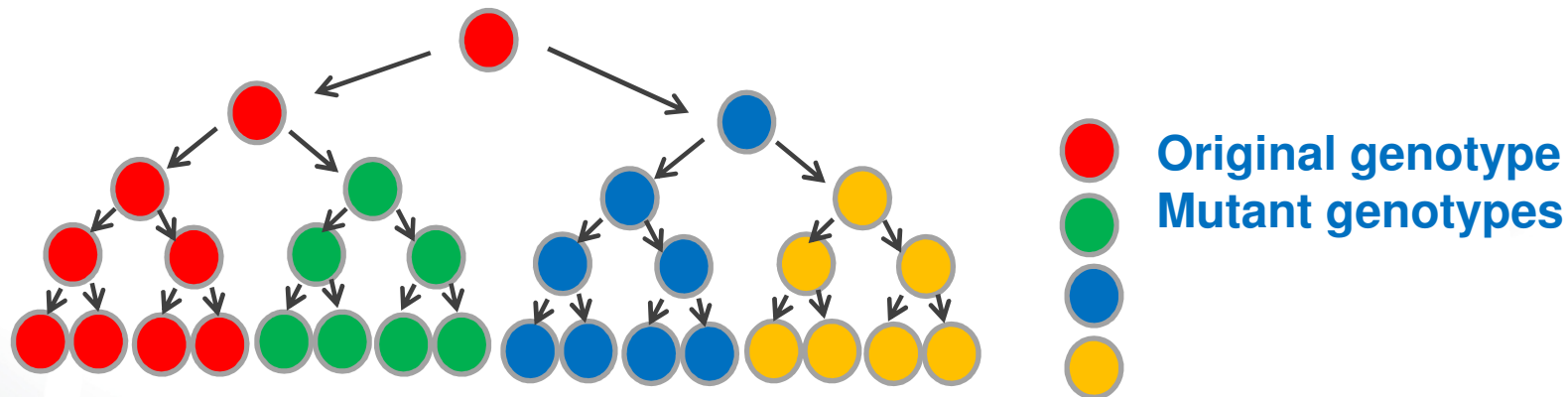


Evoluzione



Brucella

- Brucella è geneticamente monomorfica
- Ricombinazione omologa è assente



SNPs can theoretically occur at any nucleotide throughout a genome, therefore, if entire genomes are compared and examined for SNPs, a sufficient number may be found to provide resolution at even short evolutionary scales.

- Diversity reduction
- Periodic selection
- bottlenecking





ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

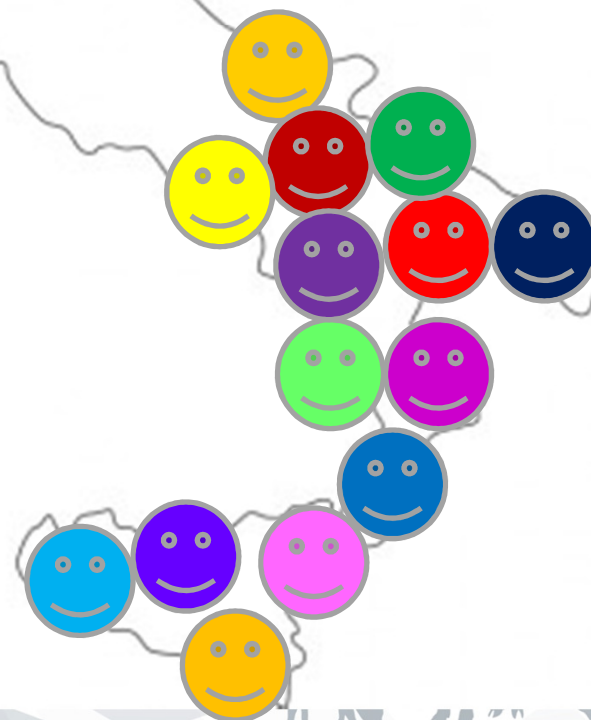


CRN Brucellosi

Centro di Riferenza Nazionale



Sorveglianza epidemiologica





ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

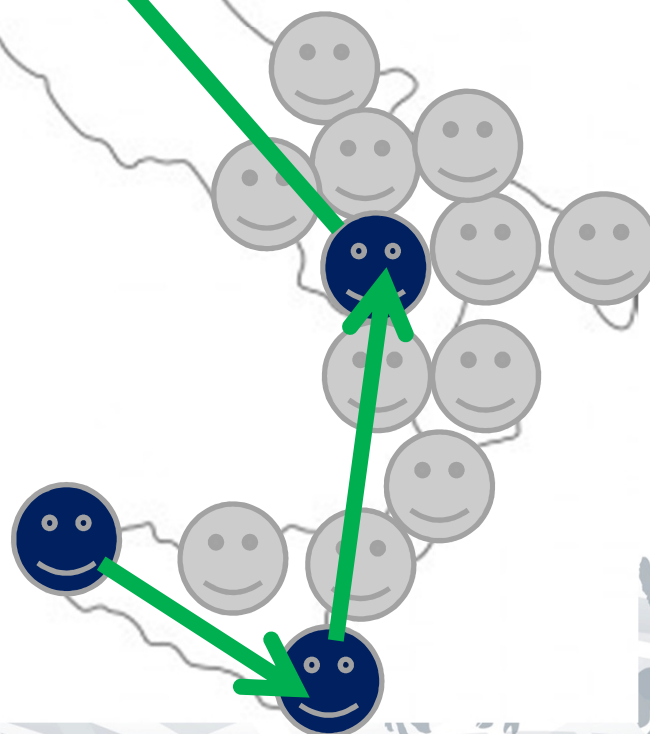


CRN Brucellosi

Centro di Riferenza Nazionale



Epidemiologia molecolare



Epidemiologia

- L'epidemiologia tradizionale cerca le relazioni che ci sono tra gente, animali, posti e oggetti che possono aver contribuito alla diffusione di una malattia





ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Epidemiologia molecolare

CRN Brucellosi

Centro di Riferenza Nazionale

Epidemiologia molecolare cerca relazioni **fenotipiche e genetiche** degli agenti responsabili di malattie infettive per suggerire la loro sorgente, le loro relazioni biologiche, le vie di trasmissione



Epidemiologia
globale



Epidemiologia
molecolare

Focolaio



Brucella



B. abortus (biovar 1,2,3,4,5,6,9) (cattle & bovidae)

B. melitensis (biovar 1,2,3) (Sheep and goats)

B. suis (biovar 1-5) (suine; reindeer, wild boar)

B. ovis (rams)

B. canis (dogs)

B. neotomae (desert wood rat))

B. ceti (marine mammals)

B. pinnipedialis (marine mammals)

B. microti (common vole)

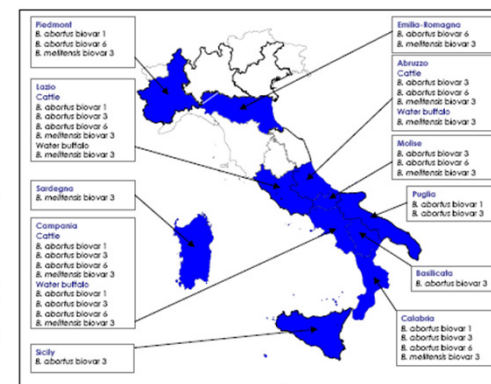


Figure 1
Geographic distribution of Brucella strains isolated from cattle and water buffalo in Italy between 2001 and 2006

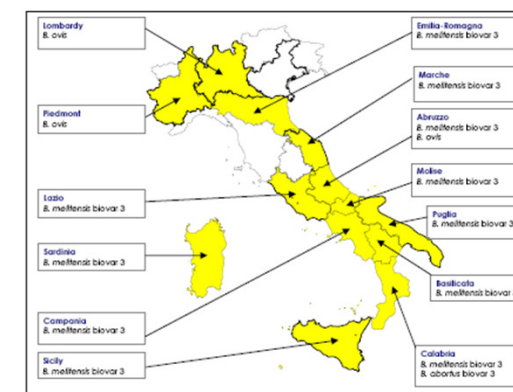


Figure 2
Geographic distribution of Brucella strains isolated from sheep and goats in Italy between 2001 and 2006

Typing of *Brucella* field strains isolated from livestock populations in Italy between 2001 and 2006

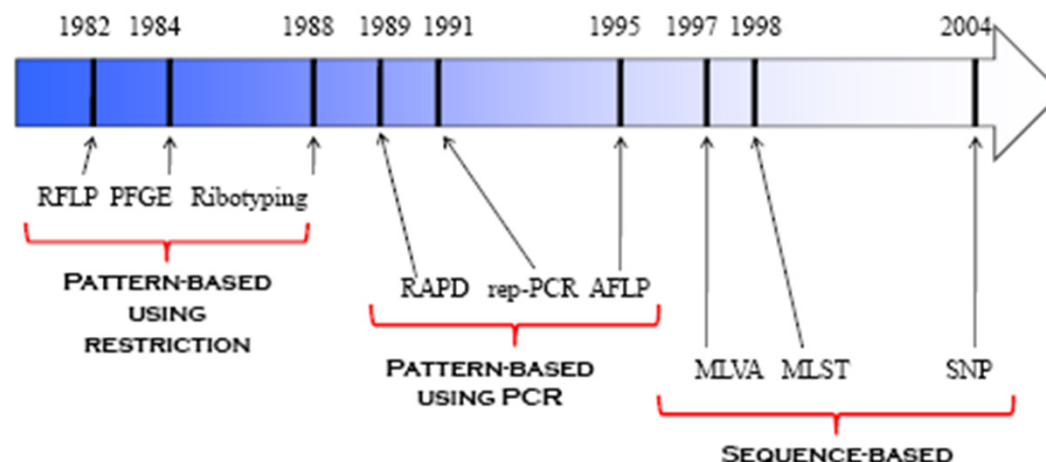
Elisabetta Di Giannatale⁽¹⁾, Fabrizio De Massis^(1,2), Massimo Ancora⁽¹⁾,
Katiuscia Zilli⁽¹⁾ & Alessandra Alessiani⁽¹⁾

B. abortus biovar 1, 3, 6
B. melitensis biovar 3





Brucella typing



Metodi su base genomica:

Diventati disponibili dal momento che sono state disponibili le prime Sequenze complete di Brucella

1. dati generati da tali approcci sono facilmente conservabili e comparabili laborator
2. Approccio multi locus mitiga gli errori che potrebbero generarsi con le metodiche a locus singolo
3. Vantaggiosi perché utilizzano marker a diversa velocità di mutazione

WGS

MLVA



 **CRN Brucellosi**
Centro di Riferenza Nazionale



MLVA Brucella

Variable Number Tandem Repeats

sono sequenze di DNA che possono variare da 2 fino a 100 nucleotidi organizzate in domini ripetuti



MLVA profile of strain 1: 6-3-6-4-3-5-4-7
MLVA profile of strain 2: 6-3-4-4-2-5-7-7

ATTCGATTTCGATTTCG
ATTCG è ripetuta 3 volte

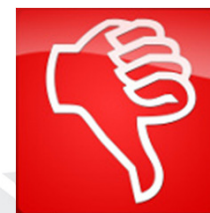
Indagini epidemiologiche per singoli focolai

Dinamiche di popolazione

Andamento locale della malattia

Analisi evolutive

Filogeografia





 **CRN Brucellosi**
Centro di Riferenza Nazionale



HOOF-Prints

MLVA8-MLVA10-MLVA11-MLVA15-MLVA16 Orsay

MLVA21 Weybridge

MLVA15 Flagstaff

MLVA10 Ames

Bricker et al. 2003, Le Fleche et al. 2006 Whatmore et al (2006), Tiller et al (2010)

MLVA-16

Online database was developed on MLVA16.
This permits an inter-laboratory comparison

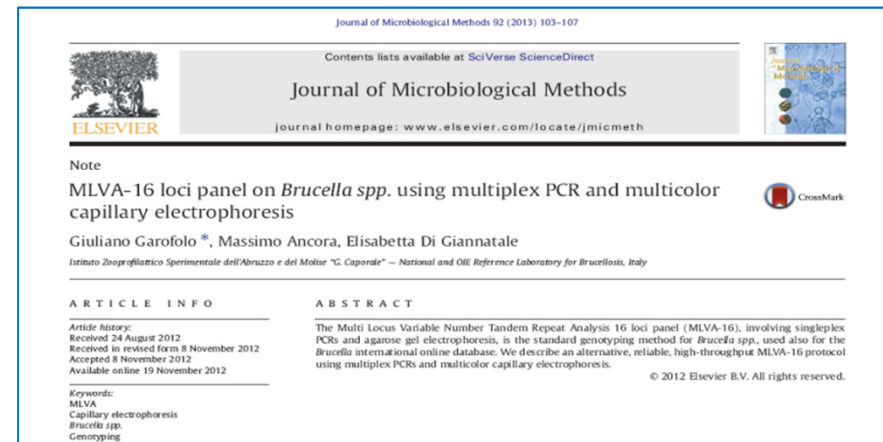
MLVA – Metodi

 **MLVAbank** for Microbes Genotyping

Public Databases

Brucella v4

Owned by public_databases

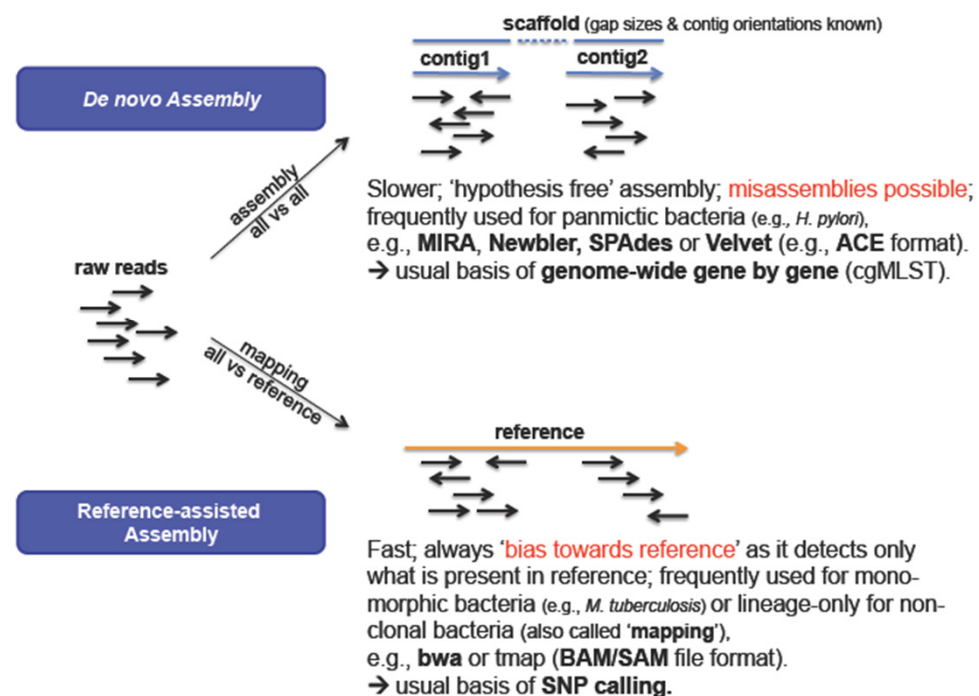


The MLVA-16 protocol normally employs singleplex PCRs and AE. While even MLVA-16 lab-on-chip systems have already been tested (De Santis et al., 2011) the use of capillary electrophoresis (CE) in MLVA-16 has never been tried. In the study, a multiplex PCR system with a multicolor CE for the MLVA-16 panel was designed, tested, and shown to improve reliability.



WGS

Reference-Assisted vs. *De Novo* Assembly



Indagini epidemiologiche per singoli focolai

Andamento locale della malattia

Filogeografia

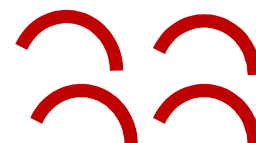
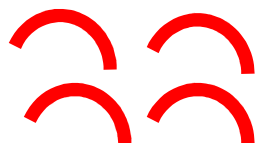


Dinamiche di popolazione

Analisi evolutive



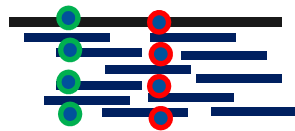
Reference assisted – SNP analysis



Sequenze con Illumina NextSeq™ 500



Mappare contro RefSeq genome Brucella melitensis bv. 1 str. 16M



Variant calling di alta qualità

AGT

AGG

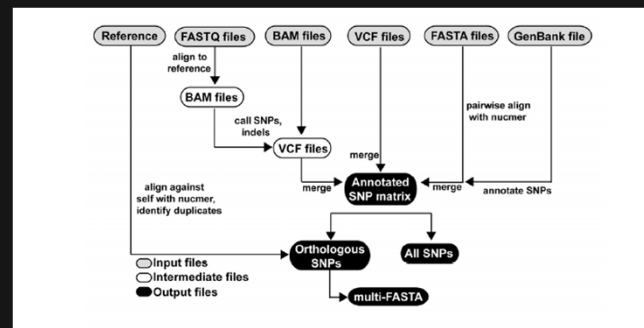
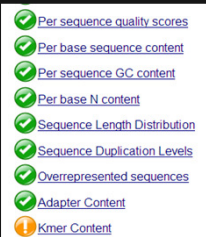
TGT

TGT



Metodo di analisi

- FASTQC per controllo qualità
- BWA-mem per mappare le sequenze
- SNVs usando GATK con metodo UnifiedGenotyper
- ISG per estrarre gli SNVs da tutti i genomi
- Ispezione dei SNV usando un BAM viewer
- SNPs coverage > 30X
- SNPs proporzione > 90%
- SNPs da regioni duplicate vengono rimossi come quelli definiti ambigui e mancanti in tutti gli altri genomi

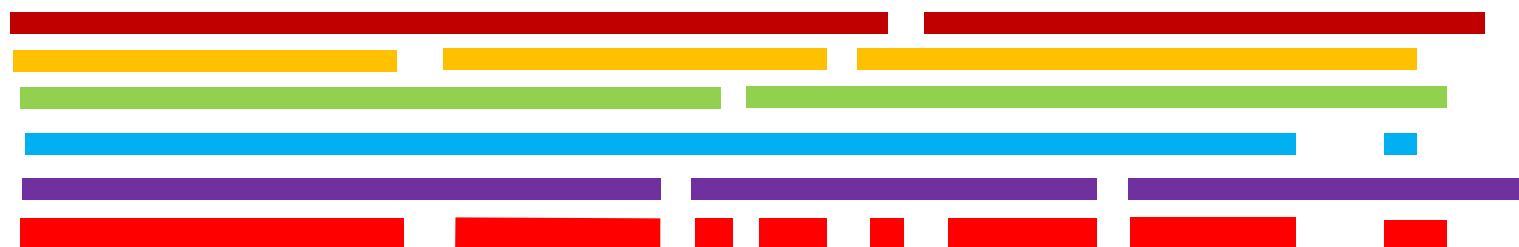




 **CRN Brucellosi**
Centro di Riferenza Nazionale



De novo assembly gene by gene Core Genome MLST



Regioni codificanti comuni

Con sequenze con buona identità
nucleotidica

8 genomi completi rappresentativi
di tutte le biovarianti

RefSeq genome *Brucella melitensis* bv. 1 str. 16M

The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. DeVecchio VG, et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2002 Jan 8

8 genomi

Brucella melitensis ATCC 23457

Brucella melitensis M28

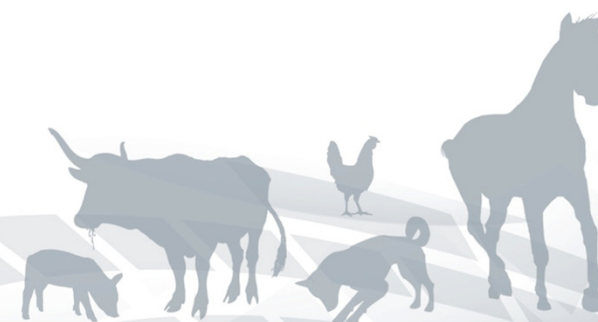
Brucella melitensis M5-90

Brucella melitensis NI

Brucella melitensis bv. 3 str. Ether

Brucella melitensis 20236

Brucella melitensis 2008724259





ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

 **CRN Brucellosi**
Centro di Riferenza Nazionale



Sviluppo cgMLST

Ref. genome Brucella melitensis bv. 1 str. 16M

MLST target definer di Ridom SeqShere+.

Filtro lunghezza minima = scarta gene inferiori a 50 pb

Filtro codoni di partenza e di stop

Filtro geni omologhi= scarta tutti i geni multicopia

I geni ricavati sono stati comparati tra tutti genomi selezionati usando BLAST.

Tutti i geni con un'identità nucleotidica del 90% presenti in tutti i genomi sono stati utilizzati per il pannello cgMLST

2751 loci per cgMLST

193 loci accessori

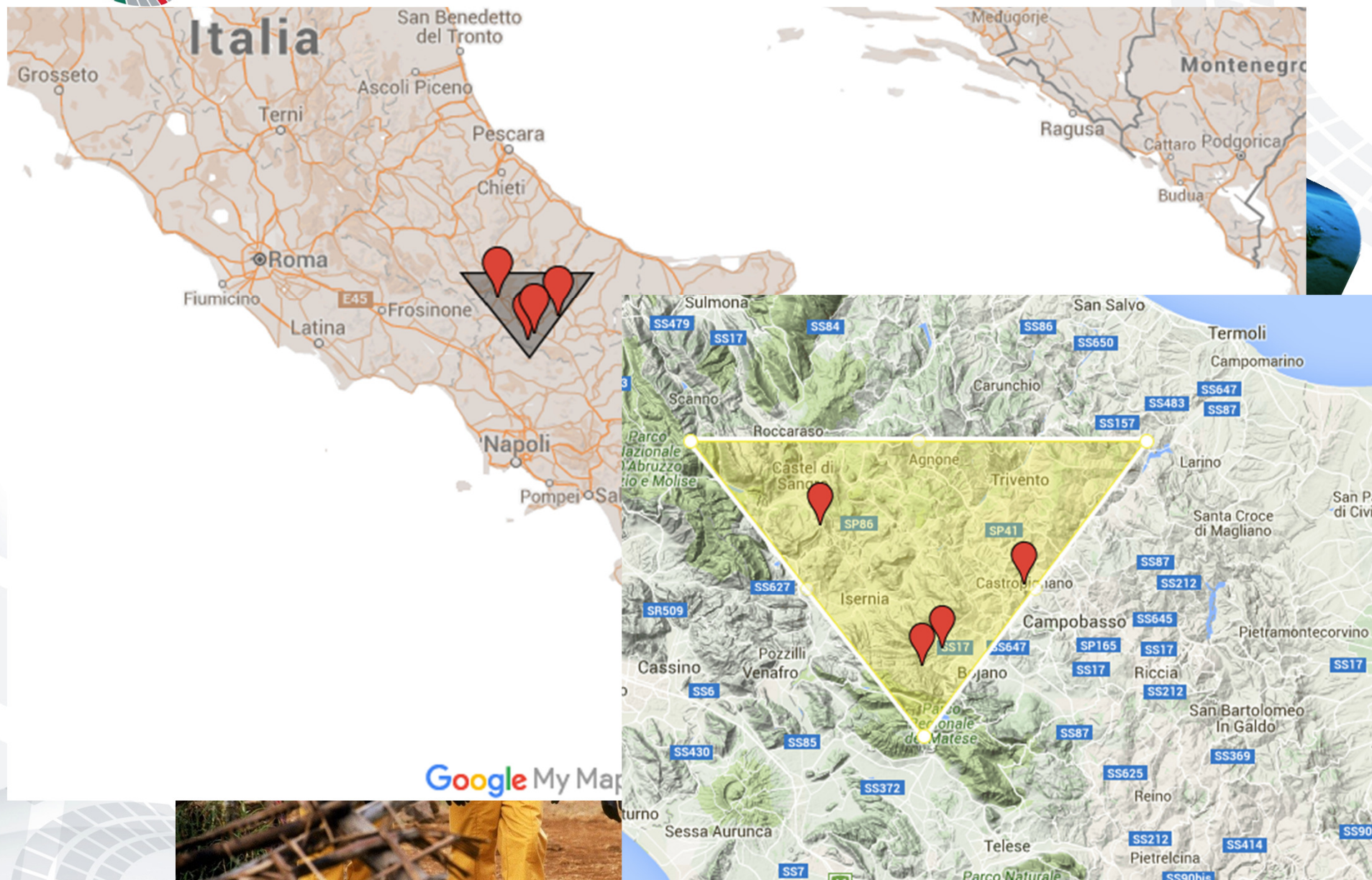
141 loci scartati

Core genome cv
80%

Costruire albero filogenetico

- Si può costruire un albero filogenetico usando il metodo Neighbour-Joining (NJ) methods
- Ma si preferisce il metodo di massima verosimiglianza: RaxML e FastTree
- Verifica della filogenesi con metodo di massima parsimonia
- Bootstrap viene utilizzato per verificare la filogenesi

FOCOLAIO





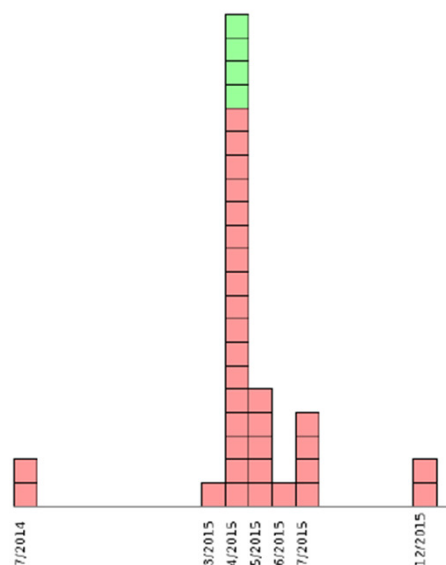
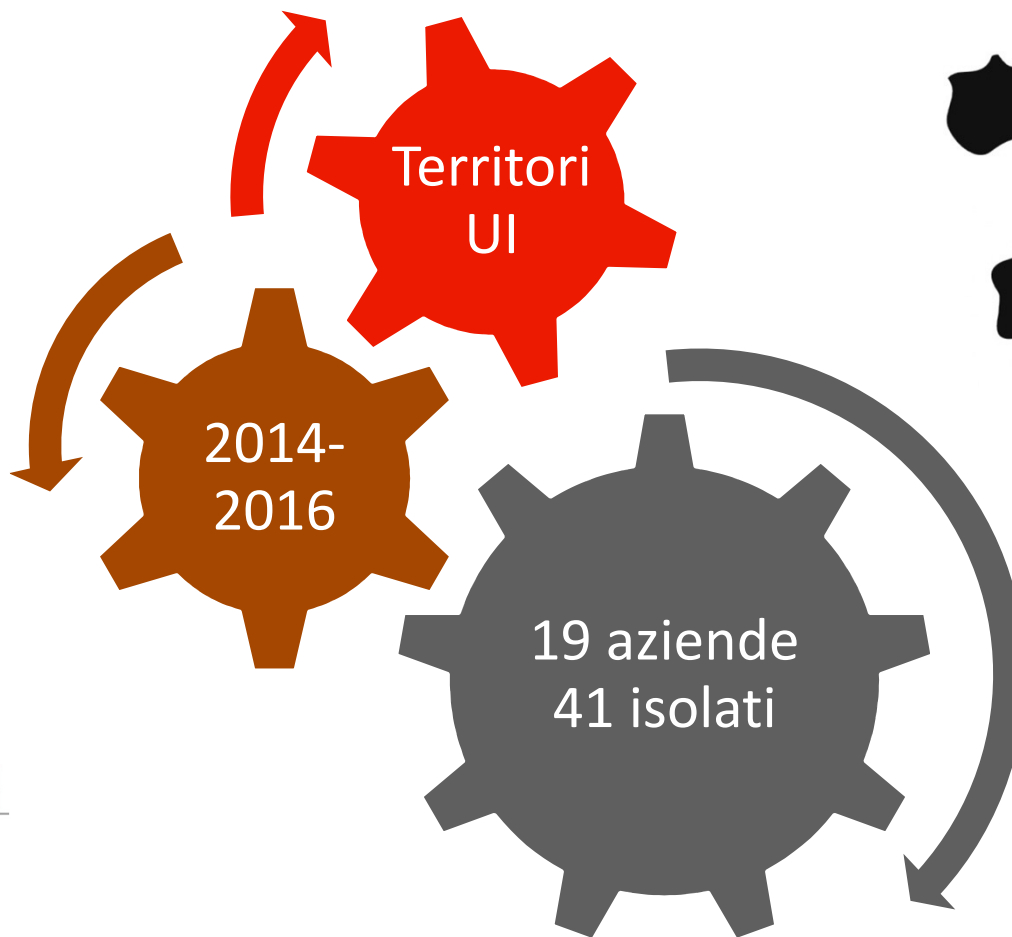
ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

CRN Brucellosi

Centro di Riferenza Nazionale



Focolaio



Epi Curve

Grouped by column "Epi Info"

FOCOLAIO_FROSINONE_2014_2016

FOCOLAIO_ROMA_2014_2015

ROUTINE





CRN Brucellosi
Centro di Riferenza Nazionale



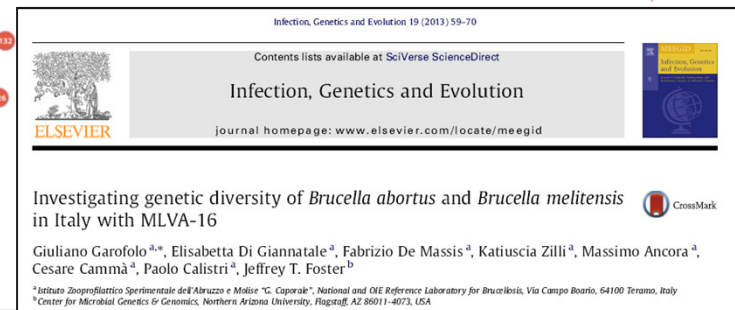
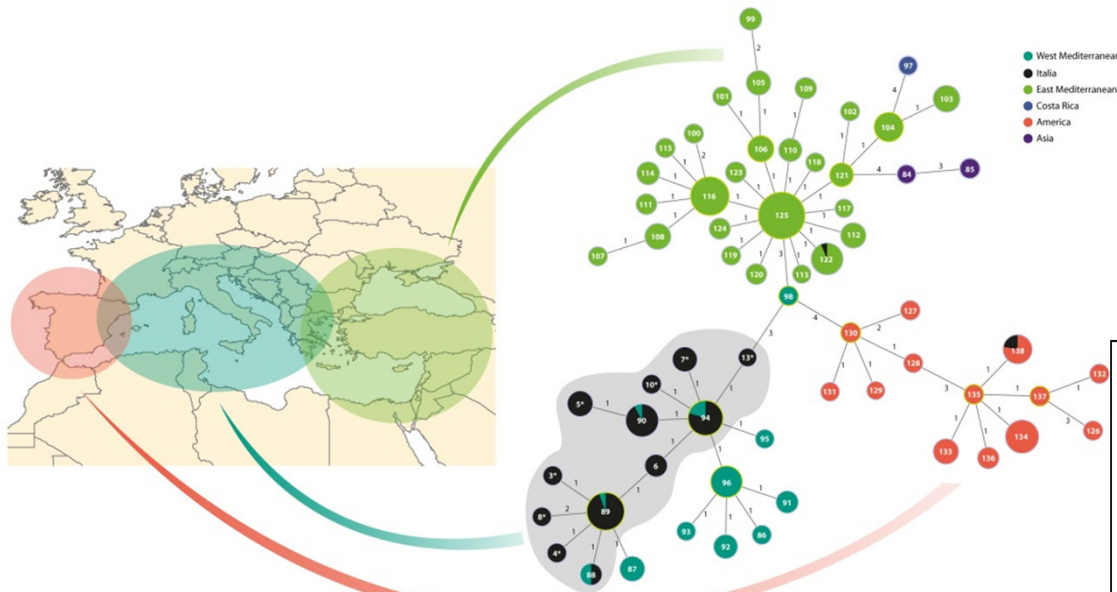
Global epidemiology – MLVA11

MLVA

Genotipo 87
West Mediterranean



Isolato Italiano





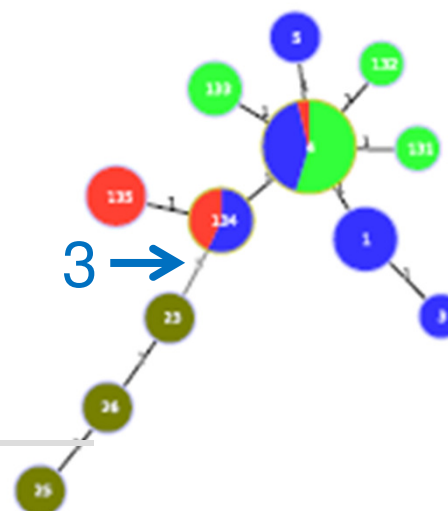
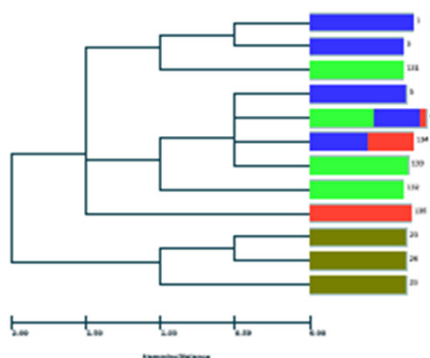
ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

CRN Brucellosi

Centro di Riferenza Nazionale



Outbreak investigation - MLVA16



Genotipo MLVA11 identico

Mutazioni per 3 dei cinque loci ipervariabili!!!!

BRUCE_0	BRUCE_0	BRUCE_1	BRUCE_1	BRUCE_4	BRUCE_4	BRUCE_4	BRUCE_5	BRUCE_1	BRUCE_1	BRUCE_2	BRUCE_0	BRUCE_0	BRUCE_0	BRUCE_1	BRUCE_3
6	8	1	2	2	3	5	5	8	9	1	4	7	9	6	0
3	6	3	14	1	1	3	3	7	42	8	6	7	8	6	3
3	6	3	14	1	1	3	3	7	42	8	7	7	6	8	3

WGS *B. melitensis* approccio globale

America

Africa

Euroasian

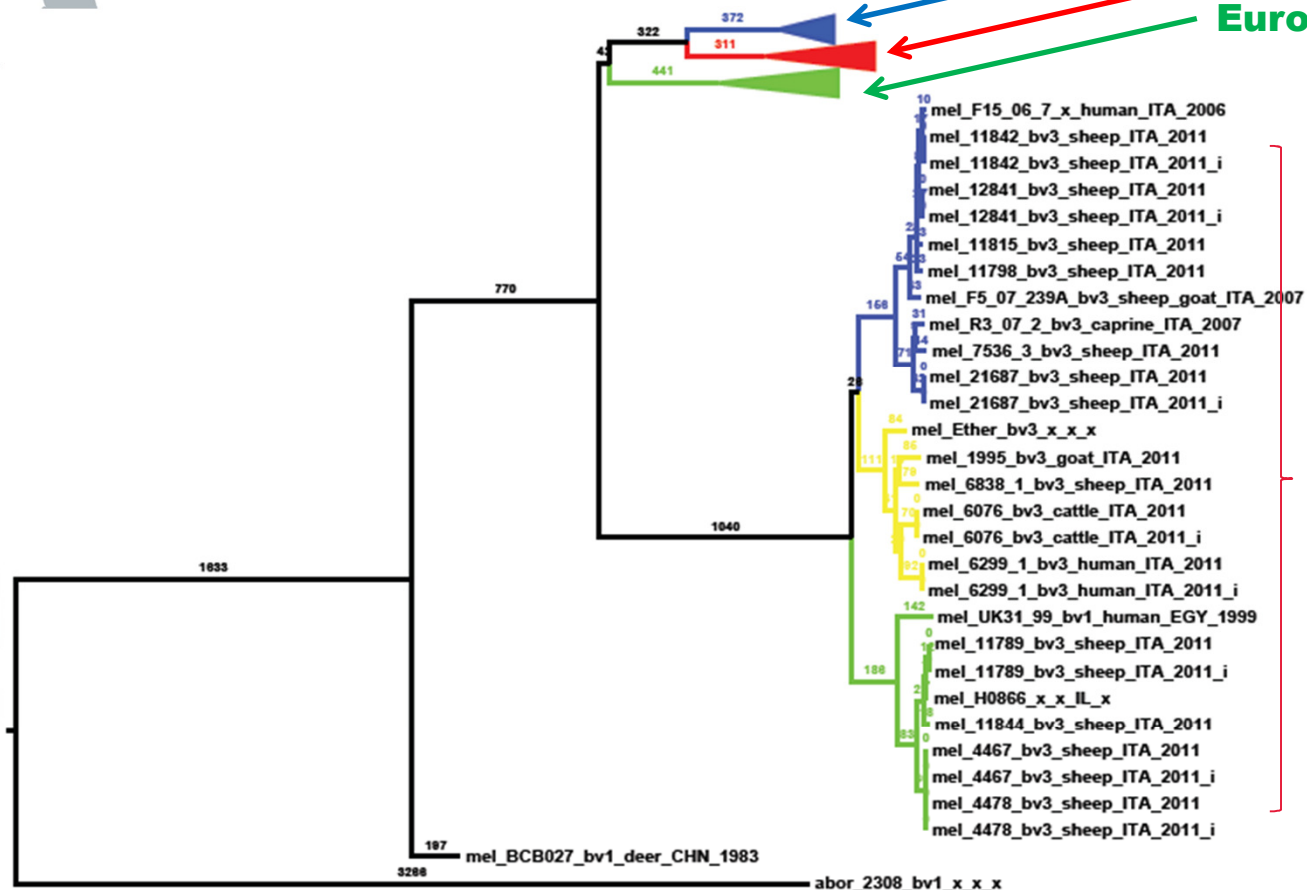


1

2

1961
Mediterranean

3



600.0



ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

CRN Brucellosi

Centro di Riferenza Nazionale



B. melitensis from Italy

***Brucella melitensis* bv. 3 str. Ether**
Strain also known as NCTC10509; ATCC 23458; BCCN R3. This is the *Brucella melitensis* biovar 3 reference strain originally isolated by Prof. G. Gargani (Univ. di Firenze, Italy) from a goat in Italy in 1961 (Meyer and Morgan 1973).

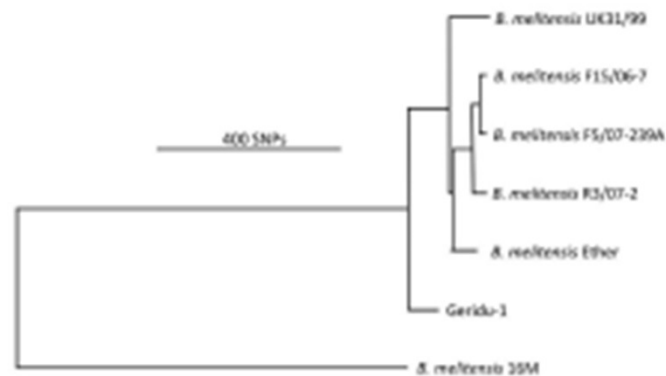


FIG 2 Phylogenetic tree showing the position of the medieval Geridu-1 strain within the Ether clade. Only those SNPs which correlated with sufficient coverage in the Geridu-1 alignment were included in the construction of the tree.

RESEARCH ARTICLE

Recovery of a Medieval *Brucella melitensis* Genome Using Shotgun Metagenomics

Gemma L. Kay,^a Martin J. Sergeant,^a Valentina Giuffrè,^{b,c} Pasquale Bandiera,^c Marco Milanese,^d Barbara Bramanti,^e Raffaella Bianucci,^{a,f,g} Mark J. Pallen^a

Division of Microbiology and Infection, Warwick Medical School, University of Warwick, Coventry, United Kingdom; Division of Paleopathology, Department of Translational Research on New Technologies in Medicine and Surgery, University of Pisa, Pisa, Italy; Department of Biomedical Sciences^d and Department of History,^e University of Sassari, Sassari, Italy; Department of Biosciences, Centre for Ecological and Evolutionary Synthesis, University of Oslo, Oslo, Norway; Department of Public Health and Pediatric Sciences, Laboratory of Physical Anthropology, University of Turin, Turin, Italy; Anthropologie Bioculturelle, Droit, Ethique et Santé, Aix Marseille Université, Marseille, France^g





ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

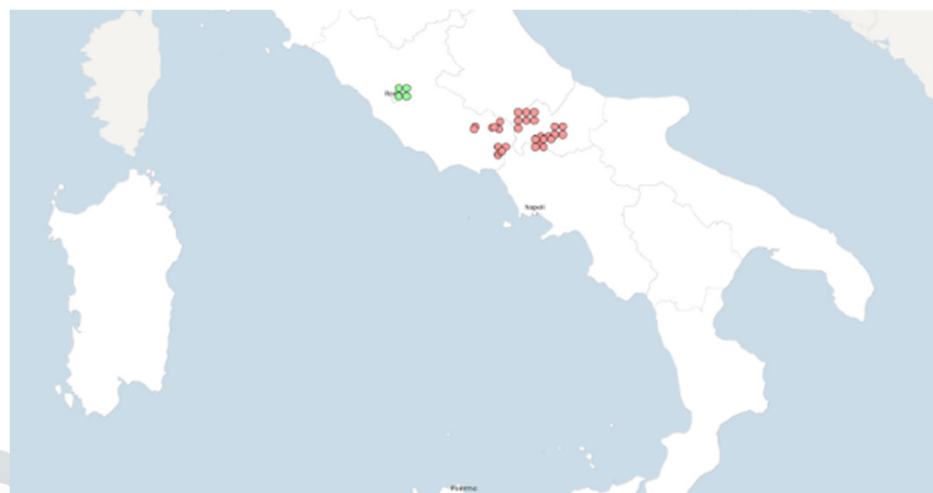
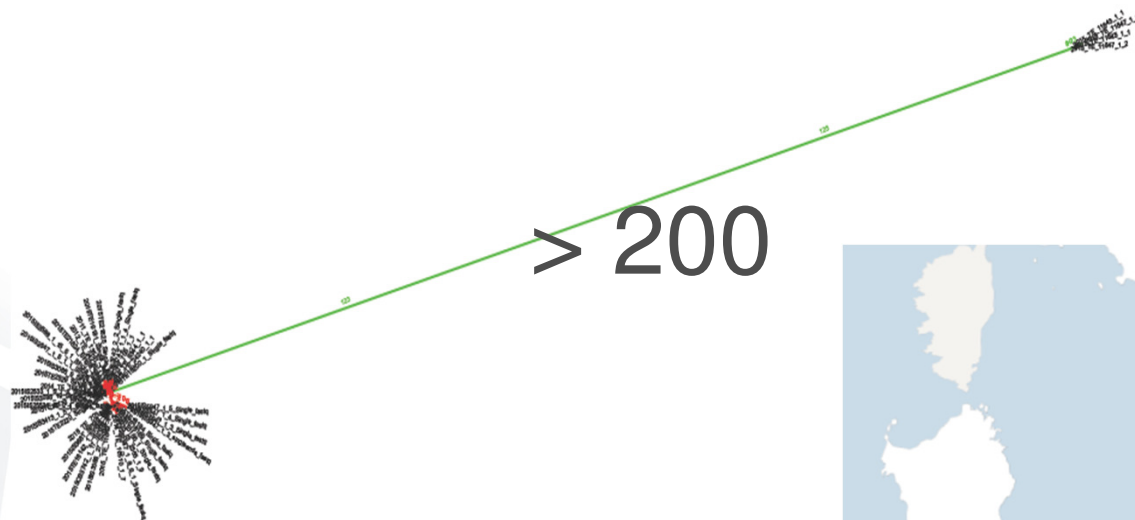
 **CRN Brucellosi**
Centro di Riferenza Nazionale

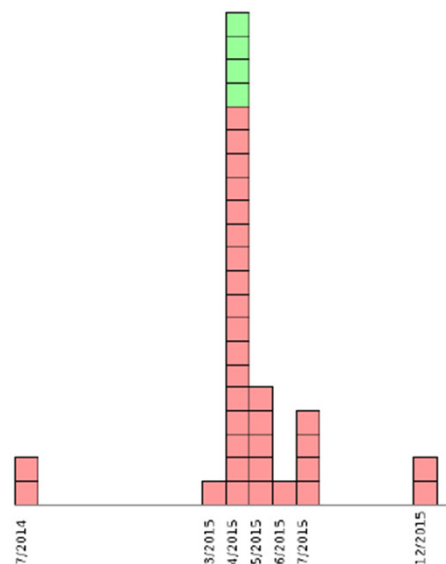


SNPs analysis

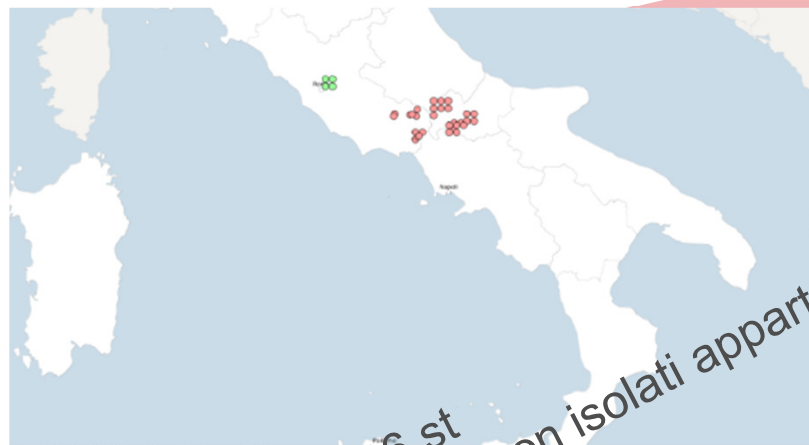
41 isolati

2 clusters
separati da
> 200 SNPs





Epi Curve
Grouped by column "Epi Info"
● FOCOLAIO_FROSINONE_2014_2016
● FOCOLAIO_ROMA_2014_2015
● ROUTINE

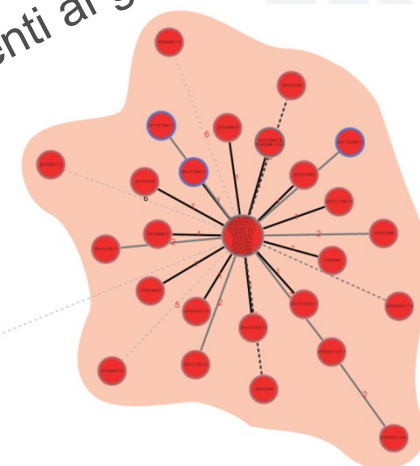


NextSeq 500

4 st < 26 st
10 aziende con isolati appartenenti al genotipo principale



138



>96% loci cgMLST sono stati identificati per i ceppi analizzati

Coverage medio 80X con 35 contigs

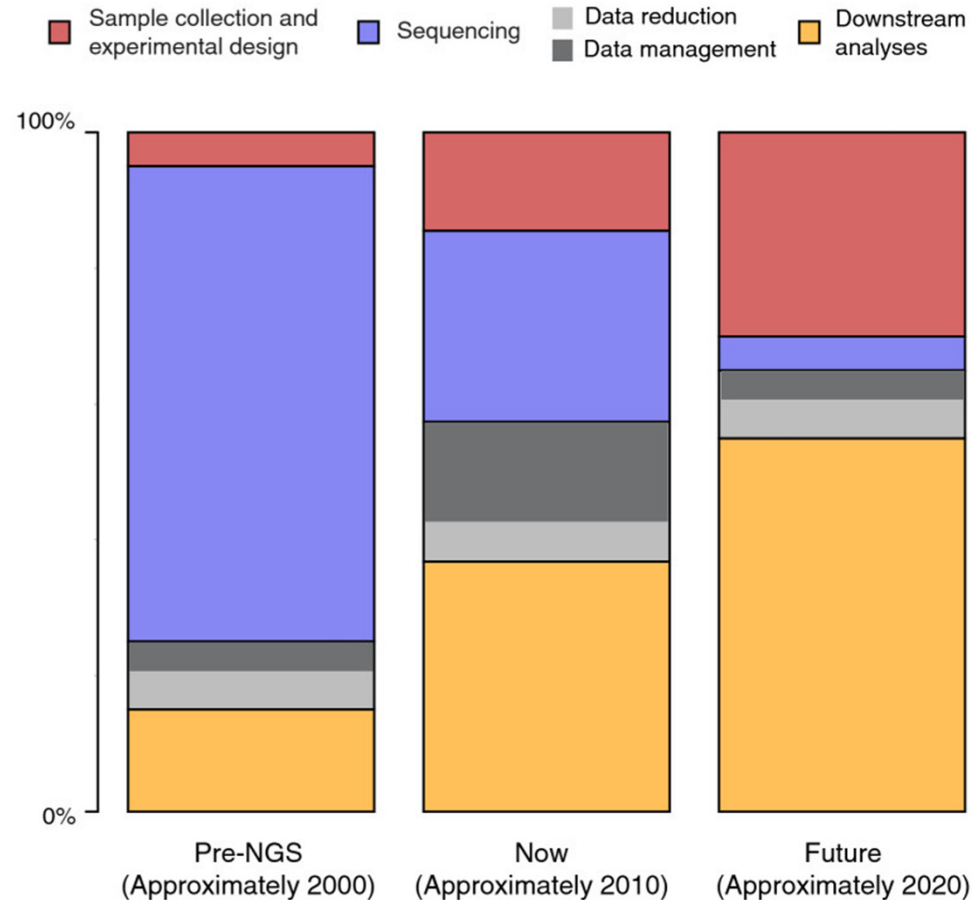
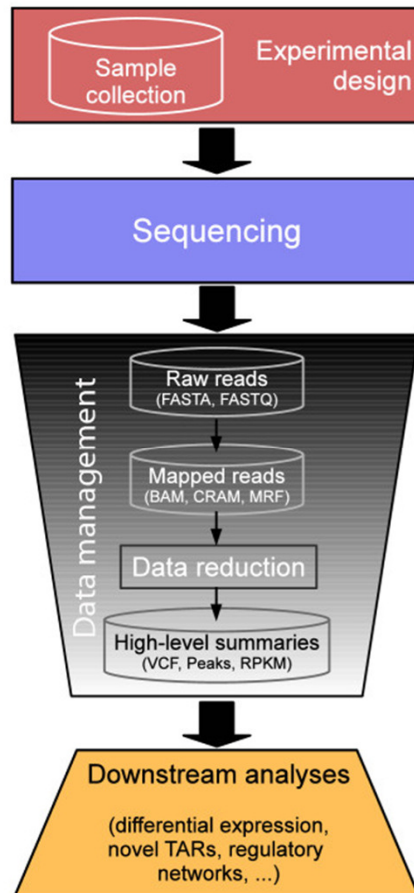
cgMLST ha individuato 2 cluster genetici separati da 138 loci

Primo cluster comprendeva 17 aziende con un massimo di 6 loci di differenza riscontrati nell'area A del focolaio con 26 ST

Secondo cluster comprendeva isolati di 2 aziende dell'area B, con una differenza massima di 2 loci con 4 ST



Whole Genome Sequencing

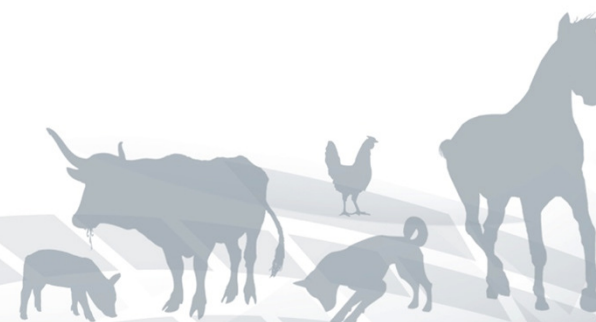
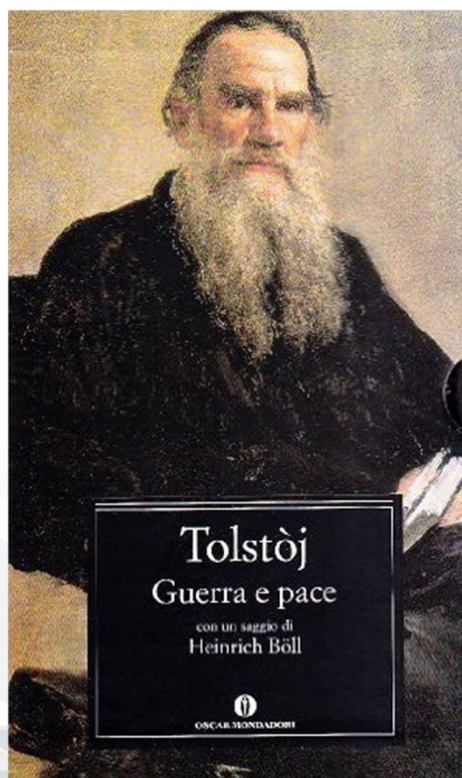


Sboner, Andrea, et al. "The real cost of sequencing: higher than you think!." *Genome biology* 12.8 (2011): 125.



WGS vs MLVA

Guerra e Pace in 140 caratteri
Finiranno nel 2138 (non abbiamo mica fretta)



Conclusioni

- MLVA è un'alternativa valida ed economica
- WGS tramite NGS non può essere utilizzato per ottenere MLVA
- cgMLST nonostante sia meno discriminante è un sistema espandibile che permette l'implementazione di una nomenclatura
- SNP analysis è estremamente risolutiva ma male interpreta i fenomeni di riombinazione
- Nessun metodo genomico può rimpiazzare l'epidemiologia tradizionale





ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

 **CRN Brucellosi**
Centro di Referenza Nazionale



Next

- Who infected whom.....
- Verificare la data di introduzione della Brucellosi
- Brucellosi e metagenomica
- Genomica comparativa per testare l'evoluzione della virulenza di Brucella



Ringraziamenti



Ministero della Salute

BACTERIOLOGY

Elisabetta Di Giannatale

Katiuscia Zilli

Lorena Sacchini

Alessandra Alessiani

Tiziana Persiani

EPIDEMIOLOGY

Fabrizio De Massis

Paolo Calistri

DIAGNOSTIC

Massimo Scacchia

Andrea Di Provvido

Daniela Averaimo

Giovanni Foschi

SEQUENCING

Cesare Cammà

Massimo Ancora

Marco Di Domenico

Maurilia Marcacci

BIOINFORMATIC

Adriano Di Pasquale

Massimiliano Orsini

Claudio Patavino

Iolanda Mangone

SEROLOGY

Manuela Tittarelli

Barbara Bonfini

