

Analisi MLVA-16 per *Brucella melitensis* e *Brucella abortus* in Basilicata

I. Platone^{1*}, G. Garofolo¹, E. Di Giannatale¹, I. Iezzi¹, V. Quaranta²,
M. Vignola², A.C. Romano², L. Palazzo²

¹ Centro di Referenza Nazionale e Laboratorio di Referenza OIE per la Brucellosi,
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale', Teramo, Italy

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata

* i.platone@izs.it

Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

OIE
Reference Laboratory
Brucellosis

IZS
istituto zooprofilattico sperimentale
della puglia e della basilicata

Introduzione

La brucellosi è una malattia cosmopolita che registra una consistente prevalenza nei Paesi del Mediterraneo, nell'Asia, in America Latina, e in Medio Oriente. È una zoonosi largamente diffusa e la trasmissione agli uomini si può verificare tramite la manipolazione di materiale infetto o attraverso l'ingestione di alimenti lattiero caseari contaminati.

La malattia è endemica nei paesi che si affacciano sul bacino del Mediterraneo. Le informazioni derivanti dallo studio della filogenesi di *Brucella* consentono di seguire l'andamento della malattia sul territorio e di valutare l'origine dei singoli focolai, tutto finalizzato al controllo della malattia negli animali e di conseguenza negli uomini. Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare la diversità genetica di ceppi di *Brucella melitensis* e di *Brucella abortus* presenti in Basilicata nel periodo 1998-2014 per approfondire l'evoluzione molecolare in una regione non ufficialmente indenne e con bassi livelli di prevalenza. I dati in nostro possesso hanno mostrato che l'andamento generale è in linea con le altre regioni meridionali sebbene ci siano delle piccole differenze.

Risultati

Il pannello MLVA-11 per i 7 isolati di *B. melitensis* 3 ha permesso di individuare 5 isolati con genotipo 96, un isolato con genotipo 87 e un isolato con genotipo 92 (**Figura 1**). L'analisi del pannello MLVA-16 ha rilevato ben 6 profili diversi. I 3 genotipi MLVA-11 sono risultati complessi genetici italiani appartenenti al lignaggio *West Mediterranean*, suggerendo come la Basilicata poco si discosti dallo scenario italiano attuale.

Difatti l'analisi del pannello VNTR completo delle varianti genetiche lucane per i tre complessi genetici MLVA-11 ritrovati ha mostrato che:

- ▶ per il genotipo 96 esse sembrano connesse con le regioni dell'Italia continentale e in particolare con Puglia, Molise e Calabria (**Figura 1**);
- ▶ per il genotipo 87 esse sembrano correlate a Calabria e Sicilia (**Figura 1**);
- ▶ per il genotipo 92 esse sembrano correlate alla Campania (**Figura 1**).

La clusterizzazione dei dati relativi ai ceppi di *B. abortus* lucani raccolti nel periodo 1998-2014, ha consentito di individuare 5 profili MLVA-11 differenti (72-77-82-181-210). Mentre i genotipi 72, 82 e 210 sono cloni genetici molto noti in Italia, i genotipi 77 e 181 sono varianti nuove nel nostro paese ed indicano una connessione con isolati cinesi e portoghesi. È interessante notare come queste ultime varianti appartengano tutte a *B. abortus biovar 1* suggerendo come probabilmente la variabilità genetica del gruppo *B. abortus bv 1, 2, 4* in Italia sia maggiore rispetto a quanto finora rilevato. L'analisi dei 16 loci ha infine evidenziato ben 12 profili diversi di *Brucella* interconnessi con i profili dei distretti geografici limitrofi. Confrontando i dati ottenuti con il database italiano si è difatti evidenziato che:

- ▶ i ceppi lucani del gruppo genetico delle biovarianti 1, 2 e 4 sembrano epidemiologicamente correlate con la limitrofa regione Campania (**Figura 2**);
- ▶ i ceppi lucani del gruppo genetico delle biovarianti 3, 5, 6, 7 e 9 hanno rilevato collegamenti con l'Italia continentale e la Sicilia (**Figura 2**).

In conclusione, poiché la presenza di brucellosi negli animali è il fattore di rischio principale per la brucellosi nell'uomo, la conoscenza dei genotipi di *Brucella* spp. presenti in un territorio costituisce un importante strumento epidemiologico per la formulazione di politiche e strategie per il controllo della malattia.

Figura 1. Albero filogenetico tipo *Minimum Spanning Tree* di *Brucella melitensis* 3 per i genotipi MLVA-11 96, 87 e 92. Le provenienze geografiche sono evidenziate con colori diversi, in nero con relativa ombreggiatura gli isolati lucani.

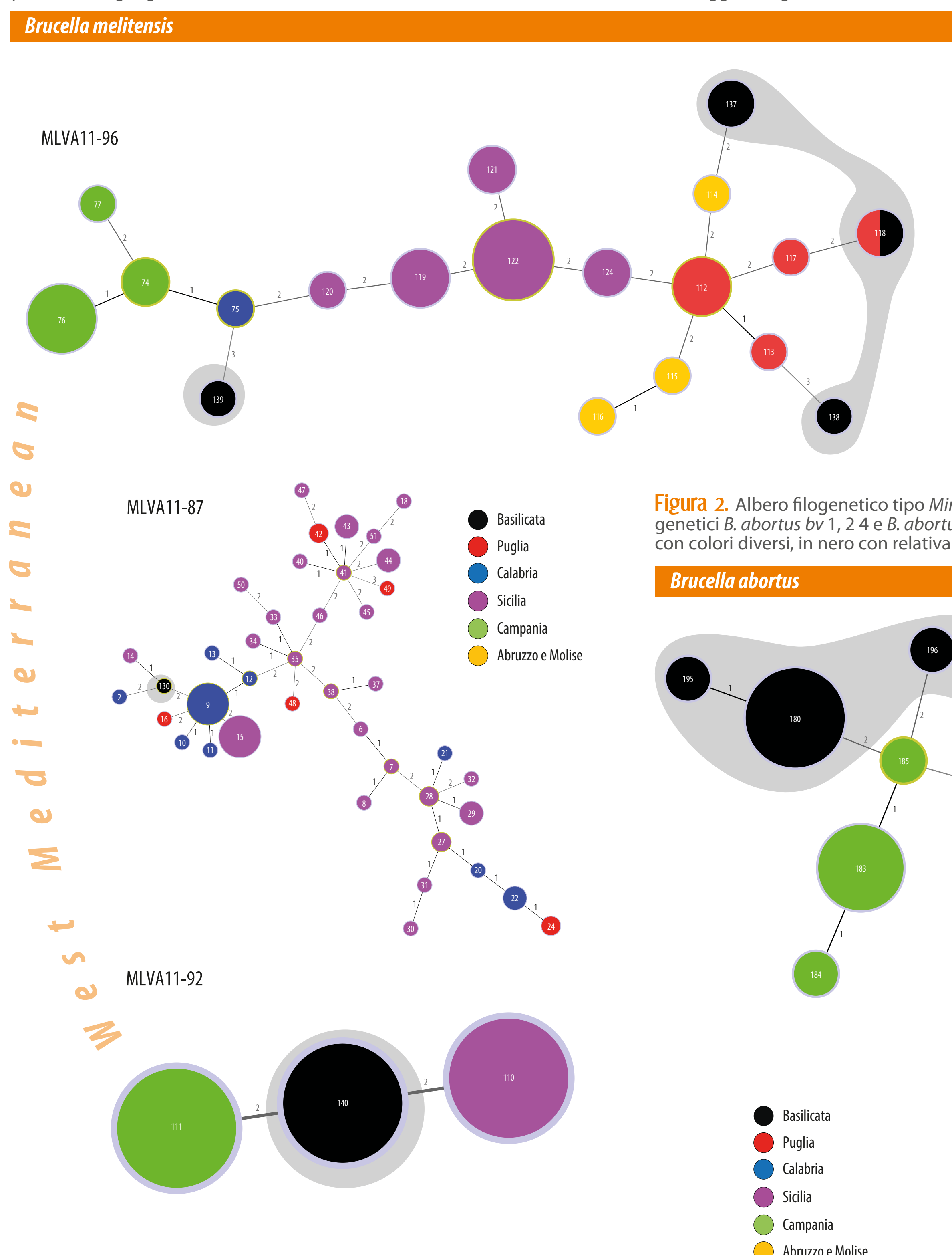


Tabella 1. Isolati di *Brucella melitensis* e di *B. abortus* inclusi nello studio.

N° accettazione	Anno di accettazione	Sede	Specie	Biotipo	MLVA_11	bruce_06	bruce_08	bruce_11	bruce_12	bruce_42	bruce_43	bruce_45	bruce_55	bruce_18	bruce_19	bruce_21	bruce_04	bruce_07	bruce_09	bruce_16	bruce_30
367	1998	Acerenza	Ovino	<i>B. melitensis</i> biotipo 3	87	3	6	3	14	1	1	3	3	7	42	8	4	6	5	6	3
9_98	1998	Marsicovetere	Ovino	<i>B. melitensis</i> biotipo 3	96	3	5	3	13	1	1	3	3	7	42	8	8	4	5	9	3
1068	2001	Guardia Perticara	Ovino	<i>B. melitensis</i> biotipo 3	96	3	5	3	13	1	1	3	3	7	42	8	9	5	9	8	3
7699	2005	Abriola	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	6	6	3	3
5459	2005	Grumento Nova	Ovino	<i>B. melitensis</i> biotipo 3	92	3	5	3	13	1	1	3	3	9	42	8	5	5	6	8	3
2779	2005	Marsicovetere	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	3	6	42	8	4	6	3	6	4
8207	2005	Viggiano	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	210	4	5	3	12	2	2	3	3	6	42	8	4	6	3	8	4
11313	2006	Brindisi di Montagna	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	6	3	3	3
12866	2007	Accettura (MT)	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 1	82	4	5	4	12	2	2	3	3	6	42	8	4	6	3	8	4
12837	2007	Vaglio di Basilicata	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	6	3	3	3
14122	2007	Viggiano	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	5	6	5	3
4416	2008	Potenza	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	6	3	3	3
3990	2008	Potenza	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	6	3	3	3
11091 - camp.A	2008	San Severino Lucano	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	5	6	5	3
9421 - camp.A	2009	San Severino Lucano	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	210	4	5	3	12	2	2	3	3	6	42	8	4	5	6	5	3
9421 - camp.B	2009	San Severino Lucano	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	5	6	5	3
6985	2009	Viggiano	Ovino	<i>B. melitensis</i> biotipo 3	96	3	5	3	13	1	1	3	3	7	42	8	7	3	7	6	3
6984	2009	Viggiano	Ovino	<i>B. melitensis</i> biotipo 3	96	3	5	3	13	1	1	3	3	7	42	8	9	8	7	10	3
8586	2010	Viggiano	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	5	6	3	3
6581	2010	Brienza	Ovino	<i>B. melitensis</i> biotipo 3	96	3	5	3	13	1	1	3	3	7	42	8	7	3	7	6	3
737	2010	Episcopia	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	5	6	5	3
5887	2010	Laurenzana	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	6	6	3	3
12191 - camp.A	2010	Picerno	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	6	6	3	3
11683	2010	Picerno	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	210	4	5	3	12	2	2	3	3	6	42	8	4	6	6	3	3
12191 - camp.B	2010	Picerno	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	6	6	3	3
739	2010	San Severino Lucano	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	5	6	5	3
5263	2010	Viggiano	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	5	6	6	3
2431	2010	Viggiano	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	6	6	3	3
4906	2011	Anzi	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	6	6	3	3
4907 - camp.A	2011	Anzi	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	6	6	3	3
4907 - camp.B	2011	Anzi	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	6	6	3	3
4904	2011	Laurenzana	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	6	6	3	3
5141	2011	Laurenzana	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	6	6	3	3
7117	2011	Sasso di Castalda	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 1	82	4	5	4	12	2	2	3	3	6	42	8	4	6	3	6	4
6803	2011	Viggiano	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 1	77	4	5	4	12	2	2	3	1	6	42	8	4	5	6	5	3
14247	2011	Brienza	Ovino	<i>B. abortus</i> biotipo 1	77	4	5	4	12	2	2	3	1	6	42	8	4	6	8	3	3
11617	2012	Brienza	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	6	7	3	3
11610	2012	Brienza	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	6	7	3	3
10946	2012	Corleto Perticara	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	5	6	5	3
3539	2012	Laurenzana	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	6	6	3	3
6030	2012	Anzi	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 1	82	4	5	4	12	2	2	3	3	6	42	8	4	6	3	6	4
747	2013	Brienza	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	6	7	3	3
935	2013	Calvello	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 1	181	4	5	4	12	2	2	3	3	6	40	8	4	7	3	7	4
9431	2013	Laurenzana	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	6	6	3	3
12503	2013	Grumento Nova	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	6	6	3	3
12688	2013	Campomaggiore	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	6	6	3	3
1482	2014	Corleto Perticara	Bovino	<i>B. abortus</i> biotipo 3	72	4	5	3	12	2	2	3	1	6	42	8	4	6	6	3	3

Conclusioni

1. Questi dati preliminari mostrano che la situazione epidemiologica lucana è congruente con quella delle altre regioni dell'Italia meridionale(3).
2. Sebbene la Basilicata sia una regione con una limitata estensione territoriale, il nostro studio ha consentito di individuare un'ampia variabilità genetica segnalando una continua e ripetuta introduzione della malattia sul territorio. La circolazione dei ceppi virulenti è probabilmente avvenuta nel passato attraverso ripetute e continue movimentazioni dei capi di bestiame dalle regioni limitrofe.
3. Le linee di introduzione sembrano essere tre: (i) una orientale dalle vicine Puglia e Molise, (ii) una occidentale dalla Campania e (iii) una meridionale dalla Calabria e dalla Sicilia (**Figura 3**).
4. Infine questi dati confermano come una continua e completa sorveglianza dei genotipi circolanti sull'intero territorio nazionale potrebbe essere uno strumento di prevenzione della diffusione della malattia sul territorio.

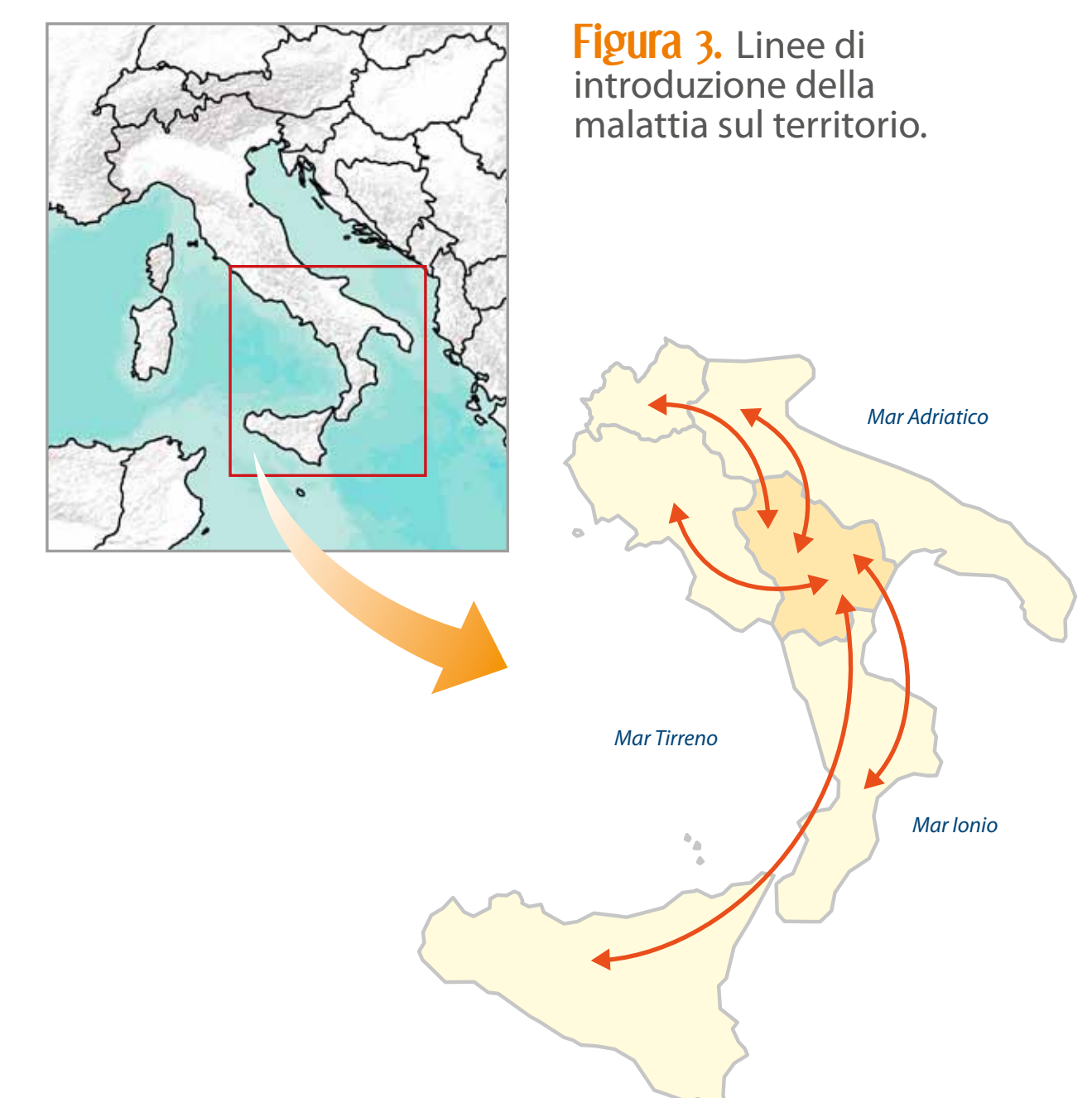
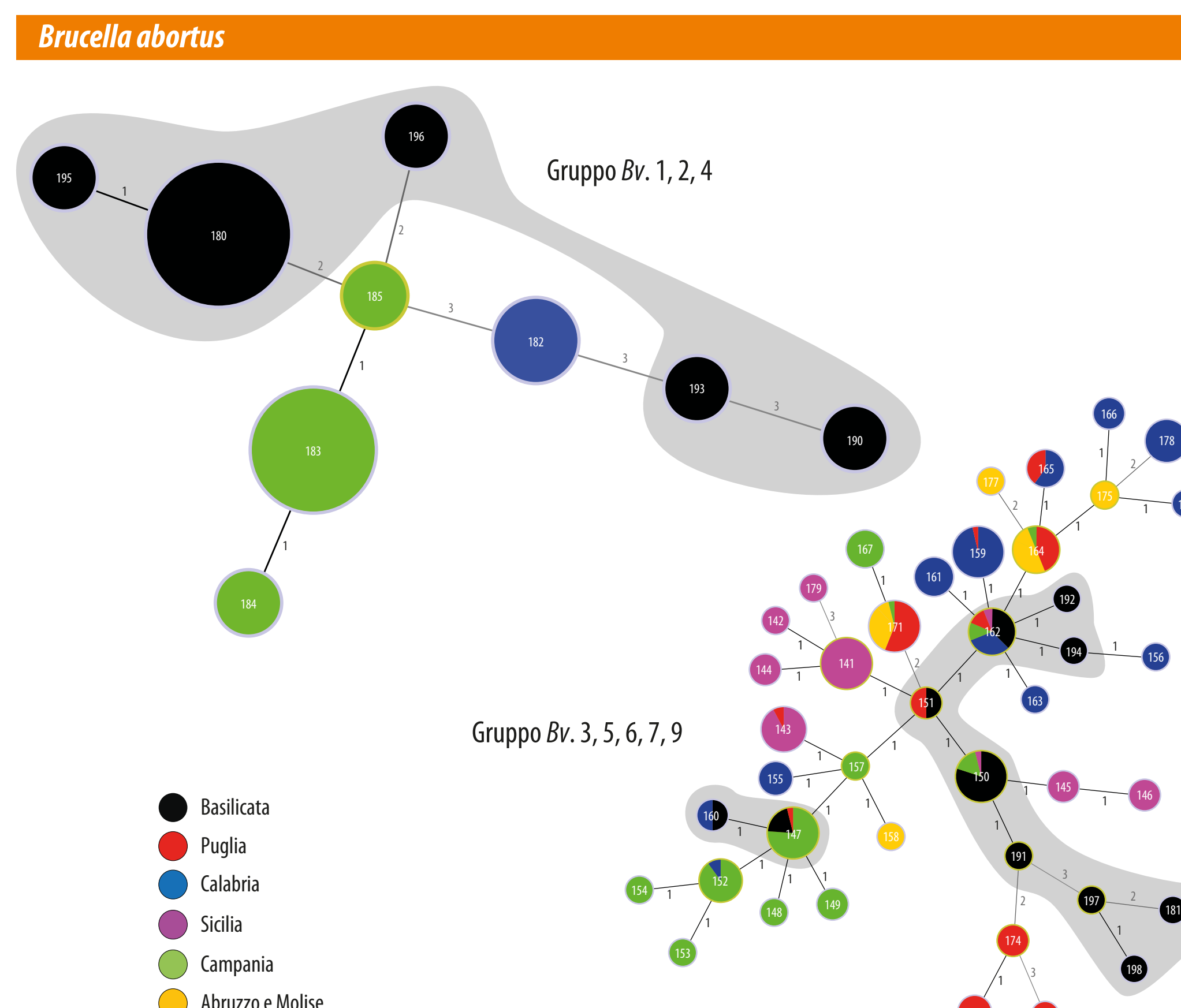


Figura 3. Linee di introduzione della malattia sul territorio.

Figura 2. Albero filogenetico tipo *Minimum Spanning Tree* di *Brucella abortus* separati per i gruppi genetici *B. abortus* bv 1, 2 4 e *B. abortus* bv 3, 5, 6, 7, 9. Le provenienze geografiche sono evidenziate con colori diversi, in nero con relativa ombreggiatura gli isolati lucani.



Bibliografia

1. Le Fleche P, Jacques I, Grayon M, Al Dahouk S, Bouchon P, Denoed F, Nockler K, et al. 2006. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol*, 6, 9.
2. Garofolo G, Ancora M, Di Giannatale E. 2013. MLVA-16 loci panel on *Brucella* spp. using multiplex PCR and multicolor capillary electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, 92, 103-107.
3. Garofolo G, Di Giannatale E, De Massis F, Zilli K, Ancora M, Cammà C, ... & Foster J.T. 2013. Investigating genetic diversity of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in Italy with MLVA-16. *Infection, Genetics and Evolution*, 19, 59-70.