



ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

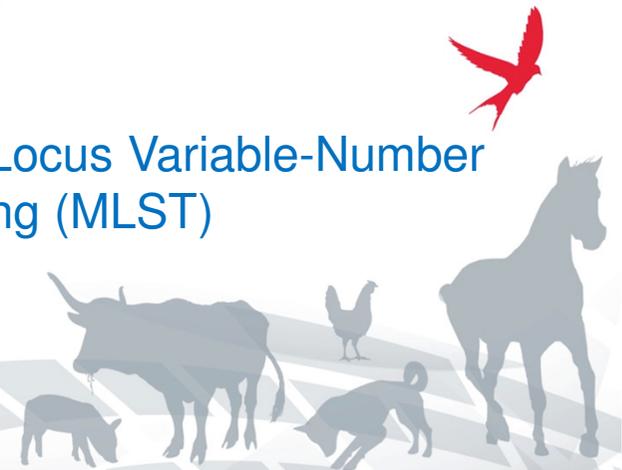


**CRN Brucellosi**

Centro di Referenza Nazionale

Caratterizzazione molecolare di *Brucella* mediante Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA)/Multi Locus sequence typing (MLST)

**Dr. Giuliano Garofolo**  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise - G. Caporale  
Sala Montecarlo Hotel Sporting TERAMO - ITALY 11/10/2012



# Brucellosi

- È la Zoonosi più importante a livello mondiale
- Ma rimane uno dei microrganismi meno caratterizzati
- Probabilmente perchè è raramente letale anche se non curata è una patologia cronica e debilitante

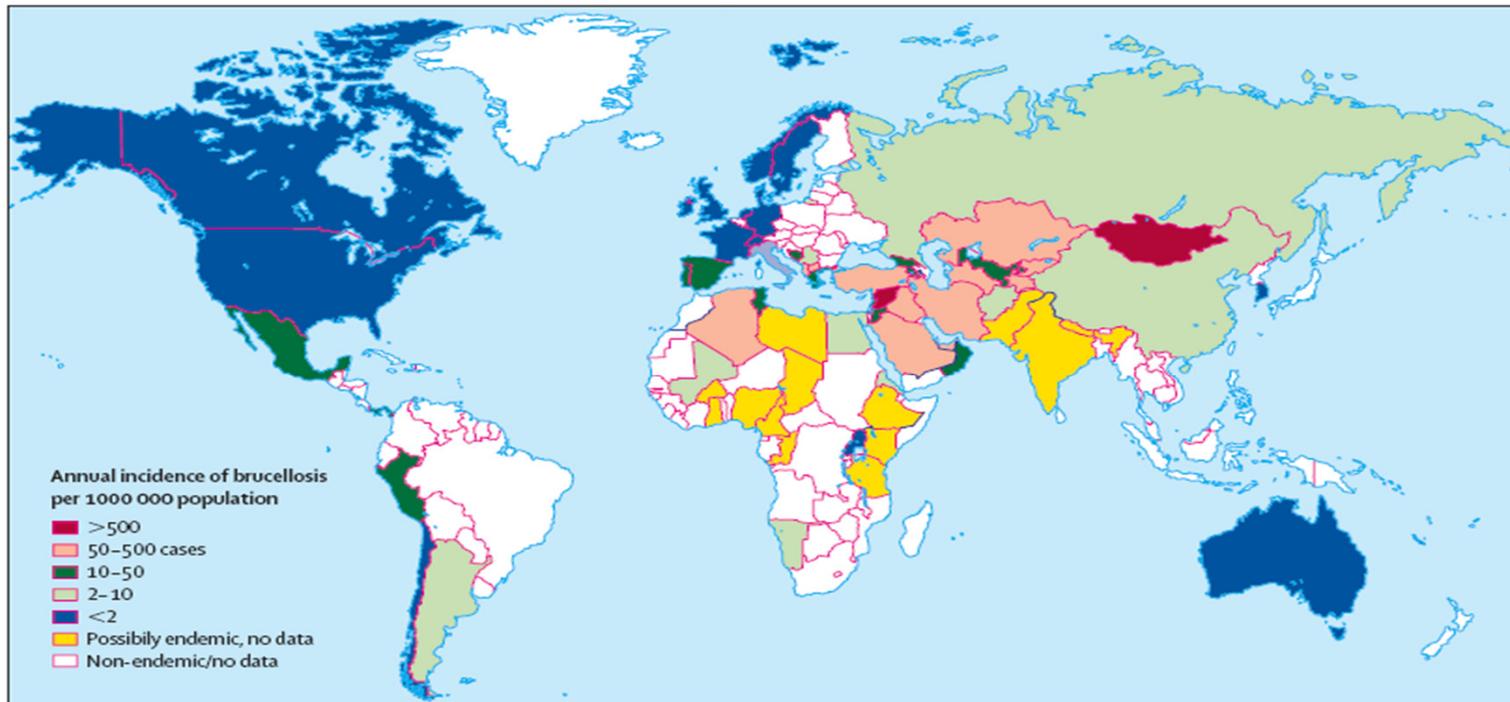


Figure 1: Worldwide incidence of human brucellosis



# Brucellosi

## Mediterraneo



Pappas et al. 2006

Viene definita una patologia negletta nei paesi in via di sviluppo.  
**EUROPA è negletta nelle le fasce di povertà**



ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

 **CRN Brucellosi**  
Centro di Referenza Nazionale



# Status Quo



La brucellosi è una patologia riemergente in  
EUROPA?

In ITALIA?

Le origini, la trasmissione e la dinamica di  
una malattia si possono interpretare con  
l'uso combinato della epidemiologia  
tradizionale e della epidemiologia molecolare





- **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



CRN Brucellosi  
Centro di Riferenza Nazionale



• **Ma non si possono intervistare solo le persone!**





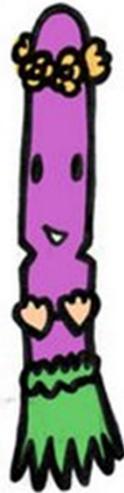
ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

 **CRN Brucellosi**  
Centro di Riferenza Nazionale

**si possono intervistare  
I PATOGENI!!!!!!**



**CAMPYLOBACTER  
JEJUNI**



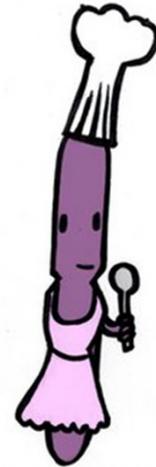
**BURKHOLDERIA  
PSEUDOMALLEI**



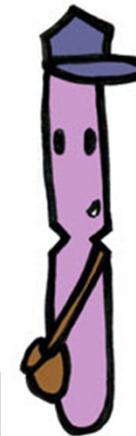
**STAPHYLOCOCCUS  
AUREUS**



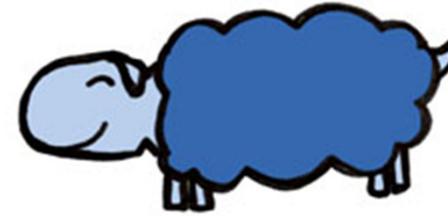
**CLOSTRIDIUM  
BOTULINUM**



**SALMONELLA  
ENTERITIDIS**



**BACILLUS  
ANTHRACIS**



**BRUCELLA MELITENSIS**





ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

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 molecolare

- La capacità di differenziare isolati batterici anche di una stessa specie è essenziale per una sorveglianza epidemiologica. Questa necessità è vecchia come la batteriologia stessa.





ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

CRN Brucellosi  
Centri di Riferenza Nazionale

# *Brucella spp.*



## Colture

placenta

Aborti

Latte

Liquido articolare

Escreto vaginale etc.

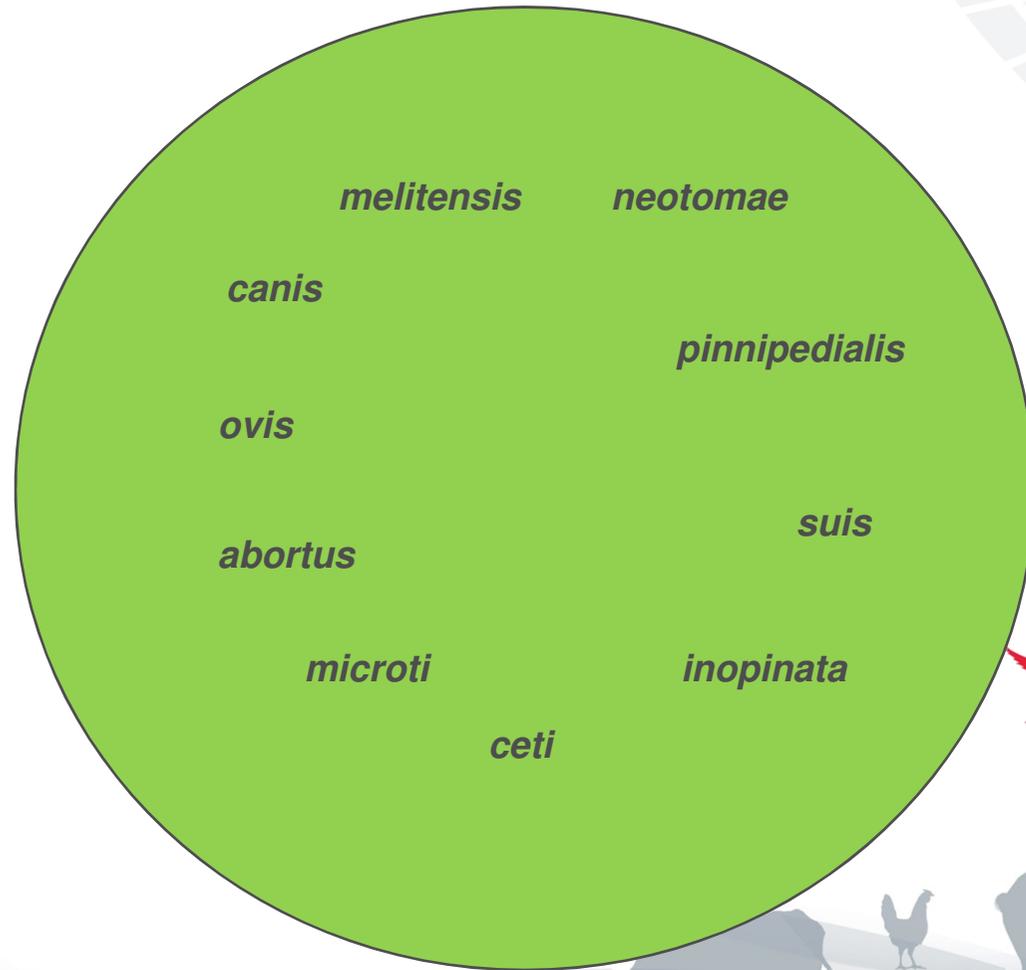
Tipizzazione

Fagica

fenotipica

Tipizzazione

molecolare





ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

CRN Brucello  
Centro di Riferimento



# Fagotipo

Species	Colony morphology <sup>b</sup>	Serum requirement	Lysis by phages <sup>a</sup>				Oxidase	Urease activity	Preferred host	
			Tb		Wb	Iz <sub>1</sub>				R/C
			RTD <sup>c</sup>	10 <sup>4</sup> RTD	RTD	RTD				RTD
<i>B. abortus</i>	S	- <sup>d</sup>	+	+	+	+	-	+ <sup>e</sup>	+ <sup>f</sup>	Cattle and other Bovidae Biovar 1: swine Biovar 2: swine, hare
<i>B. suis</i>	S	-	-	+	+ <sup>g</sup>	+ <sup>g</sup>	-	+	+ <sup>h</sup>	Biovar 3: swine Biovar 4: reindeer Biovar 5: wild rodents
<i>B. melitensis</i>	S	-	-	-	- <sup>i</sup>	+	-	+	+ <sup>j</sup>	Sheep and goats
<i>B. neotomae</i>	S	-	- <sup>k</sup>	+	+	+	-	-	+ <sup>h</sup>	Desert wood rat <sup>l</sup>
<i>B. ovis</i>	R	+	-	-	-	-	+	-	-	Rams
<i>B. canis</i>	R	-	-	-	-	-	+	+	+ <sup>h</sup>	Dogs

From refs 2, 42.

- a Phages: Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb), Izatnagar1(Iz<sub>1</sub>) and R/C
- b Normally occurring phase: S: smooth, R: rough
- c RTD: routine test dilution
- d *Brucella abortus* biovar 2 generally requires serum for growth on primary isolation
- e Some African isolates of *B. abortus* biovar 3 are negative
- f Intermediate rate, except strain 544 and some field strains that are negative
- g Some isolates of *B. suis* biovar 2 are not or partially lysed by phage Wb or Iz<sub>1</sub>
- h Rapid rate
- i Some isolates are lysed by phage Wb
- j Slow rate, except some strains that are rapid
- k Minute plaques
- l *Neotoma lepida*





ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

 **CRN Brucellosi**  
Centro di Referenza Nazionale

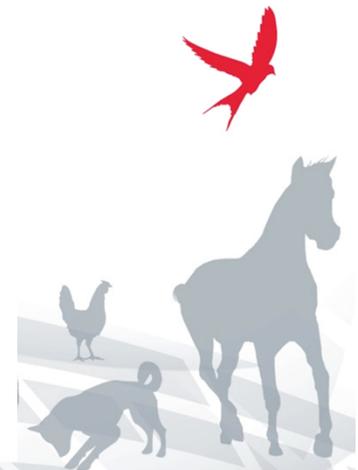


# Fenotipo

Species	Biovar	CO <sub>2</sub> requirement	H <sub>2</sub> S production	Growth on dyes <sup>a</sup>		Agglutination with monospecific sera		
				Thionin	Basic fuchsin	A	M	R
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	+	+	-	+	-
	2	-	-	+	+	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i>	1	+ <sup>b</sup>	+	-	+	+	-	-
	2	+ <sup>b</sup>	+	-	-	+	-	-
	3	+ <sup>b</sup>	+	+	+	+	-	-
	4	+ <sup>b</sup>	+	-	+ <sup>c</sup>	-	+	-
	5	-	-	+	+	-	+	-
	6	-	-	+	+	+	-	-
	9	+ or -	+	+	+	-	+	-
<i>B. suis</i>	1	-	+	+	- <sup>e</sup>	+	-	-
	2	-	-	+	-	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	-	-
	4	-	-	+	- <sup>f</sup>	+	+	-
	5	-	-	-	-	-	+	-
<i>B. neotomae</i>	-	-	+	- <sup>g</sup>	-	+	-	-
<i>B. ovis</i>	-	+	-	+	- <sup>f</sup>	-	-	+
<i>B. canis</i>	-	-	-	+	- <sup>f</sup>	-	-	+

From refs 2, 42.

- a Dye concentration in serum dextrose medium: 20 µg/ml
- b Usually positive on primary isolation
- c Some basic fuchsin-sensitive strains have been isolated
- d Some strains are inhibited by dyes
- e Some basic fuchsin-resistant strains have been isolated
- f Negative for most strains
- g Growth at a concentration of 10 µg/ml thionin





ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

 **CRN Brucellosi**  
Centro di Riferenza Nazionale



# Problemi della fenotipizzazione

- Alcuni ceppi che reagiscono in maniera non canonica
- Eventuale necessità di aumentare il pannello
- Reagenti non facilmente reperibili
- Difficoltà nella standardizzazione
- Espressione variabile





 CRN Brucellosi  
Centro di Referenza Nazionale



# Fenotipizzazione

- Anche se utile non è il metodo adatto per capire la struttura della popolazione e la sua dinamica
- il fenotipo non riflette il genotipo del microrganismo e di conseguenza può non essere un marker affidabile.





ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

 **CRN Brucellosi**  
Centro di Referenza Nazionale



# Metodi molecolari Brucella

- Le 6 specie classiche di Brucella presentano un'omologia nucleotidica  $\geq 90\%$
- PFGE (pochi studi e poca variabilità)
- Insertion sequence based typing (IS711)
- *PCR* typing (AMOS – Bruceladder)
- *PCR* RFLP Omp2 e Omp25



## Metodi molecolari Caratterizzazione Brucella

- Sono necessari per la sorveglianza e l'epidemiologia
- ma è importante
  - accurati
  - riproducibili





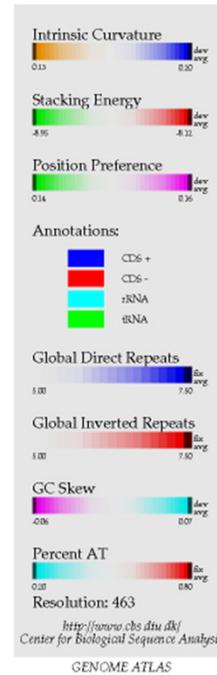
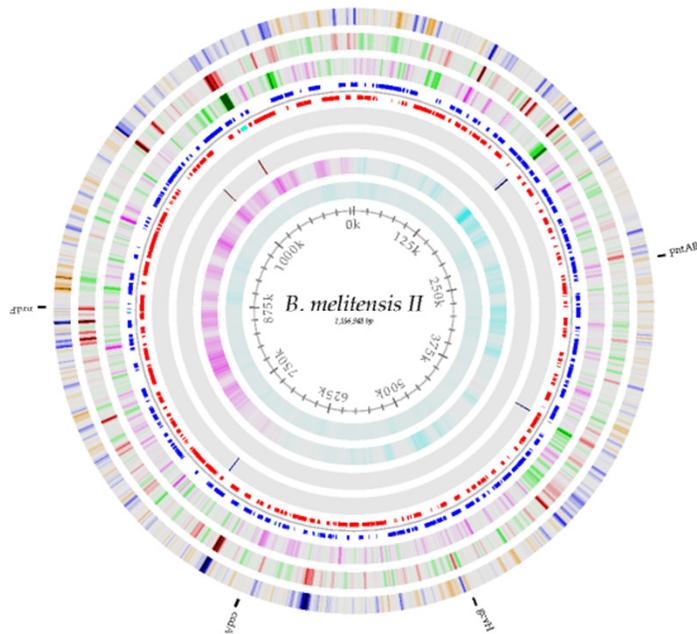
ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

 **CRN Brucellosi**  
Centro di Riferenza Nazionale



# • Approccio di tipizzazione su intero genoma

# MLVA/MLST





ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

# MultiLocus Sequence Typing MLST

 **CRN Brucellosi**  
Centro di Referenza Nazionale

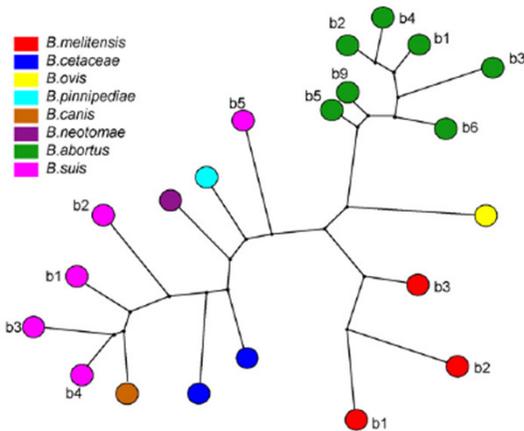


- Caratterizza la brucella
- Definisce la dinamica della popolazione

Table 2: Analysis of the nine loci examined in the *Brucella* strains sampled.

Locus	Alleles	Polymorphic sites (%)	$d_N$	$d_S$	$d_N/d_S$	Mean % GC
<i>gap</i>	6	7 (1.19)	0.0023	0.0105	0.217	58.33
<i>aroA</i>	7	7 (1.24)	0.0032	0.0058	0.559	61.68
<i>glk</i>	10	11 (2.32)	0.0051	0.0031	1.671	62.67
<i>dnaK</i>	7	6 (1.28)	0.0016	0.0103	0.156	60.71
<i>gyrB</i>	6	5 (1.07)	0.0027	0.0102	0.263	59.18
<i>trpE</i>	6	5 (1.03)	0.0033	0.0056	0.584	58.46
<i>cobQ</i>	7	8 (1.90)	0.0055	0.0129	0.425	59.15
<i>omp25</i>	10	12 (2.45)	0.0032	0.0161	0.196	59.08
<i>int-hyp</i>	5	6 (1.40)	-	-	-	55.75

$d_N$  = mean non-synonymous substitutions per non-synonymous site  
 $d_S$  = mean synonymous substitutions per synonymous site



Whatmore et al. 2007



# MLST

- Sequenze nucleotidiche di geni(450-500 bp)
- Per ogni sequenza si definisce un numero allelico
- La combinazione di più alleli determina il ST

	111 11111111111 111111 22222 22223 33333333 333333333333 344444	
	12345 6677001 12223345556 667899 11344 67780 01333344 44677788888 900123	
	3962233 4948485 62294503572 451928 66679 99954 73268824 992134812467 836965	
	1739310 7621854 54774230789 548588 69716 36888 27834755 897555508545 224406	
	<i>gap aroA glk dnaK gyrB trpE cobQ omp25 int-hyp</i>	
	SSSSNNN NSNNSS NNNNSSNNNN NNSSS NSSNS NSNNS SNNSSNN SSSNSNNSN	
<i>B.abortus</i> ST1	CTCCGGG GCGACCG ATCGAGCGGGA AGGCCA CGGCG CGTGA GCAGCCGG GCTCTGTCCCGC GGGTA	11 Biovars 1, 2, and 4
<i>B.abortus</i> ST2	..... .G.....	5 Biovars 3, 5, 7, and 9
<i>B.abortus</i> ST3	.....T.....	1 Biovar 7
<i>B.abortus</i> ST4	..... .G..... A.....	1 Biovar 6 reference only
<i>B.abortus</i> ST5	..... A.....	2 Vaccine strains only
<i>B.abortus</i> ST6	T..T... .A... .G..G..A..G ..G...T... ..G..T... ..	1 Biovar 3 reference only
<i>B.melitensis</i> ST7	..T.T.. C...G.. .GT...G...G .....	4 Biovars 1 and 2
<i>B.melitensis</i> ST8	..T.T.. C... .GT...G...G .....	10 Biovars 1, 2, and 3
<i>B.melitensis</i> ST9	..T.T.. C... .GT...G...G .....	1 Biovar 3 reference
<i>B.melitensis</i> ST10	..T.T.. C... .GT...G...G G.....	1 Biovar 1
<i>B.melitensis</i> ST11	..T.T.. C... .GT...G...G .....	3 Biovars 1, 2, and 3
<i>B.melitensis</i> ST12	..T.T.. C... .GT...G...G .....	2 Biovar 1
<i>B.ovis</i> ST13	.C.... C...T. .G.....AAG .....	11 All <i>B. ovis</i>
<i>B.suis</i> ST14	.C.... C..G..A .G.....G ...T. .A.T. ....	11 Biovar 1 only
<i>B.suis</i> ST15	.C.... C... GG.....G ...T. ..T. ....	26 Biovar 2 only
<i>B.suis</i> ST16	.C...C C... GG.....G .....	4 Biovar 2 only
<i>B.suis</i> ST17	.C.... C..G..A .G.....G ...T. .AAT. ....	7 Biovars 3 and 4
<i>B.suis</i> ST18	.C.... C..G..A .G.....G ...T. .AAT. ....	1 Biovar 4 only
<i>B.suis</i> ST19	.C.... C... .G.....G ..A.....	1 Biovar 5 only
<i>B.canis</i> ST20	.C.... C..G..A .G.....G ...T. .AAT. ....	5
<i>B.canis</i> ST21	.C.... C..G..A .G.....G ...T. .AAT. ....	3
<i>B.neotomae</i> ST22	.C.... C... .G..G...G .....	3 All <i>B. neotomae</i>
Marine Brucella ST23	.C.... CT.... .G..A...G .A.....	20 Predominantly porpoises
Marine Brucella ST24	.C.... C... .G.A...G .....	3 Predominantly seals
Marine Brucella ST25	.C.... C... .G.....G .....	12 Predominantly seals
Marine Brucella ST26	.C.... C... .G.....G .....	9 Dolphins
Marine Brucella ST27	.C.... C... .G.....G .A.....	2 Human/dolphin





ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

CRN Brucellosi  
Centro di Referenza Nazionale



# MLST

Isolato

DNA

PCR

sequenza

Ricerca nel database

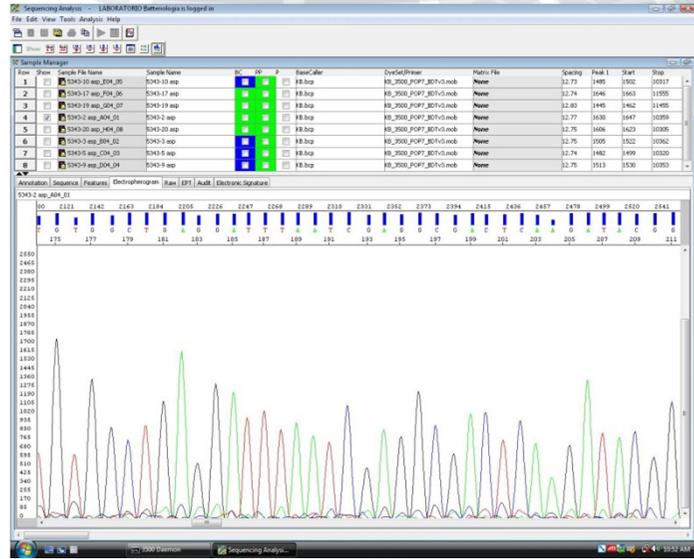
DATI

Dinamiche di popolazione

Analisi evolutive

Indagini epidemiologiche e singoli focolai

Andamento casuale

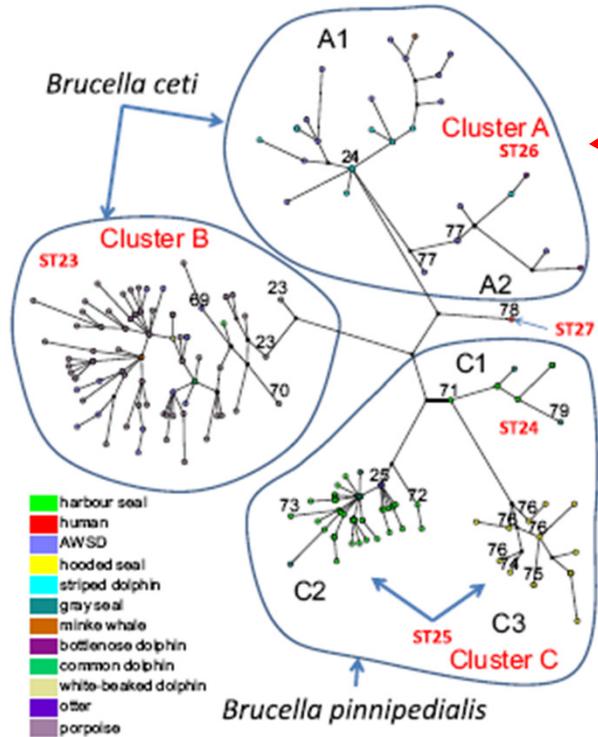


```
5343-2_A04_01.Seq - Notepad
File Edit Format View Help
5343-2_A04_01.ab1
TTTATTAGATGGTTCATCTTTACTTTATAAAGAACCTACCTGATGCTACGGCTCTTGAAGCGTTTCGTTATGAAATG
AAAAAAGCTCTTTATCCATGAAGGTATGACCGCTCTTTTGATCTTTCCTGATAACTGATCCTATGGCAGTTT
ACAAGSTGCTGTTTCATCGCTTAGTGCTTTTATCCGTGATTTAAACATGAATGATAAAGAGAAATATAGAAATGG
CAGCTAGAATAGTACCTAAAATCCCTACTATAGTGGCCACCGCTTATAGATATAAACACCGCTTCTCTATGGCTATCCA
AATTAGATCGTGGTTTACAGAAAAATTTCTTATATGTTAAGAACCCTATCCTTACGATCATGTAGAGCTTAAACCTAT
AGAAGTAAAGCACCTTGTACAGTTTATGCTTCAGTACGATATGACGAAATGCTTCAAGCTTCAACAGTTCTGCTG
TGGGTTCAACTCATGCTCATCTTATGCGCTGATAGCAGCAGGATTTGGTGGCTTGGGCTATGACATGGTGGAGCT
AATGAAGGTGTTATTAGAATGCTTGAACAATAGGTAGTGTGATAGGCTAGATGAATTCATCAAAAGAGCTAAGGATAA
AAAGCATCTTTCGCTTGATGGCTTTGGGATAGGTTTATAAAAATTTGATGCTAGAGCAAAAGTACTGAAAAGC
TTC
```

MLST  
analisi



# B. ceti isolato Italia



Cluster stenella delfino



Marquat et al. 2009

**Figure 3**  
Maximum parsimony analysis on 117 marine mammal *Brucella* genotypes. Each coloured circle corresponds to one MLVA-16 genotype from a marine mammal species. Numbers in black (23, 24, 25, 69 to 79) indicate the MLVA-16 genotype for the colour circle below. The panel 1 genotype along daughter branches is indicated only when it is different from the proposed parent node (i.e. in cluster A, all strains are panel 1 genotype 24 in subcluster A1 or 77 in subcluster A2). The tentative MLST sequence type (ST23 to ST27) as predicted from strains shared between this study and [25] is indicated, together with species assignment. The host species colour code indicated is the same as in Figures 1 and 2 (AWSD: Atlantic White Sided Dolphin).





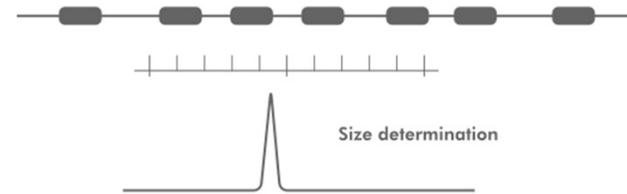
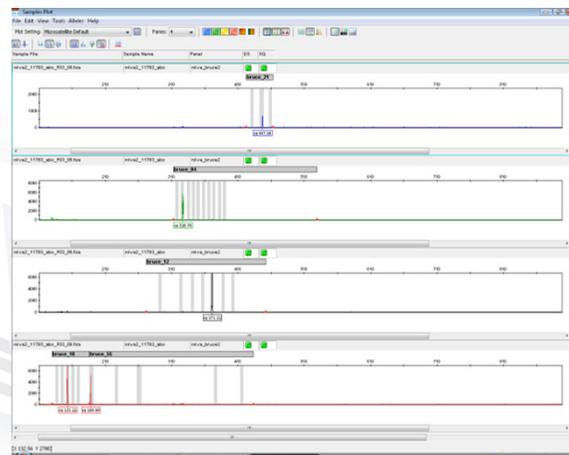
ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

# MLVA

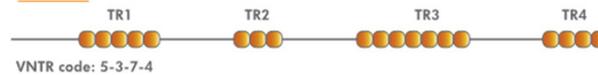
**Variable Number Tandem Repeats**  
sono sequenze di DNA che possono  
variare da 2 fino a 100 nucleotidi  
organizzate in domini ripetuti

ATTCGATTCTGATTCTG

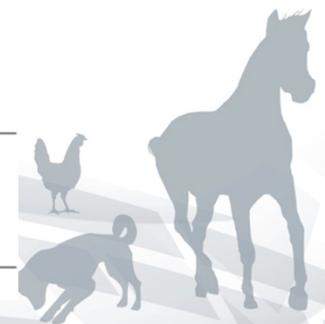
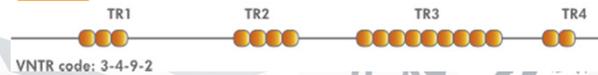
ATTCG è ripetuta 3 volte



Strain A



Strain B





ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

CRN Brucellosi  
Centro di Riferenza Nazionale



**Non per tutte le specie batteriche è sviluppabile un sistema di tipizzazione MLVA, perchè la presenza di VNTRs è variabile all'interno del genoma.**

*B. anthracis, Y. pestis, M. tuberculosis, **Brucella**, E. coli O157:H7, Legionella pneumophila, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Borrelia burgdorferi, Francisella tularensis tularensis, Coxiella burnetii, Neisseria meningitidis, Burkholderia mallei, Burkholderia pseudomallei*

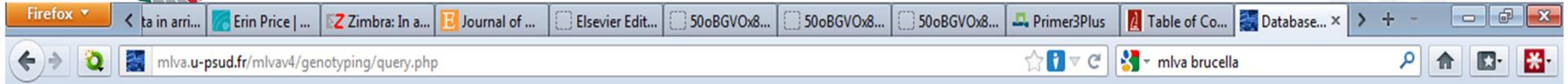
- - semplice per i laboratori che usano metodi di pcr
  - il costo delle analisi è molto contenuto
  - I dati possono essere riprodotti e analizzati da diversi laboratori permettendo di creare facilmente una banca dati condivisa





ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

# Brucella MLVA 16 loci



## Aggregated Databases

- Acinetobacter
  - Brucella**
  - Mycobacterium\_tuberculosis
  - Staphylococcus\_aureus
- Query View

## Public Databases

- Bacillus anthracis 2006
  - Coxiella2007
  - Coxiella2009\_Netherlands
  - Legionella2007
  - Mycobacterium leprae2012
  - Mycobacterium tuberculosis
  - Pseudomonas\_MLVA9\_Utr
- Query View

## Private Databases

[See list of private databases](#)

Orsay lab  
home page



## Brucella

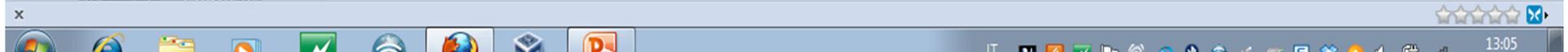
Display MLVA

Select loci constituting your MLVA typing panel  
(you can select a panel and then add other VNTR loci)

Panel :    
or make your own selection:

- bruce06-BRU1322
- bruce08-BRU1134
- bruce11-BRU211
- bruce12-BRU73
- bruce42-BRU424
- bruce43-BRU379
- bruce45-BRU233
- bruce55-BRU2066
- bruce18-BRU339
- bruce19-BRU324
- bruce21-BRU329
- bruce04-BRU1543
- bruce07-BRU1250
- bruce09-BRU588
- bruce16-BRU548
- bruce30-BRU1505

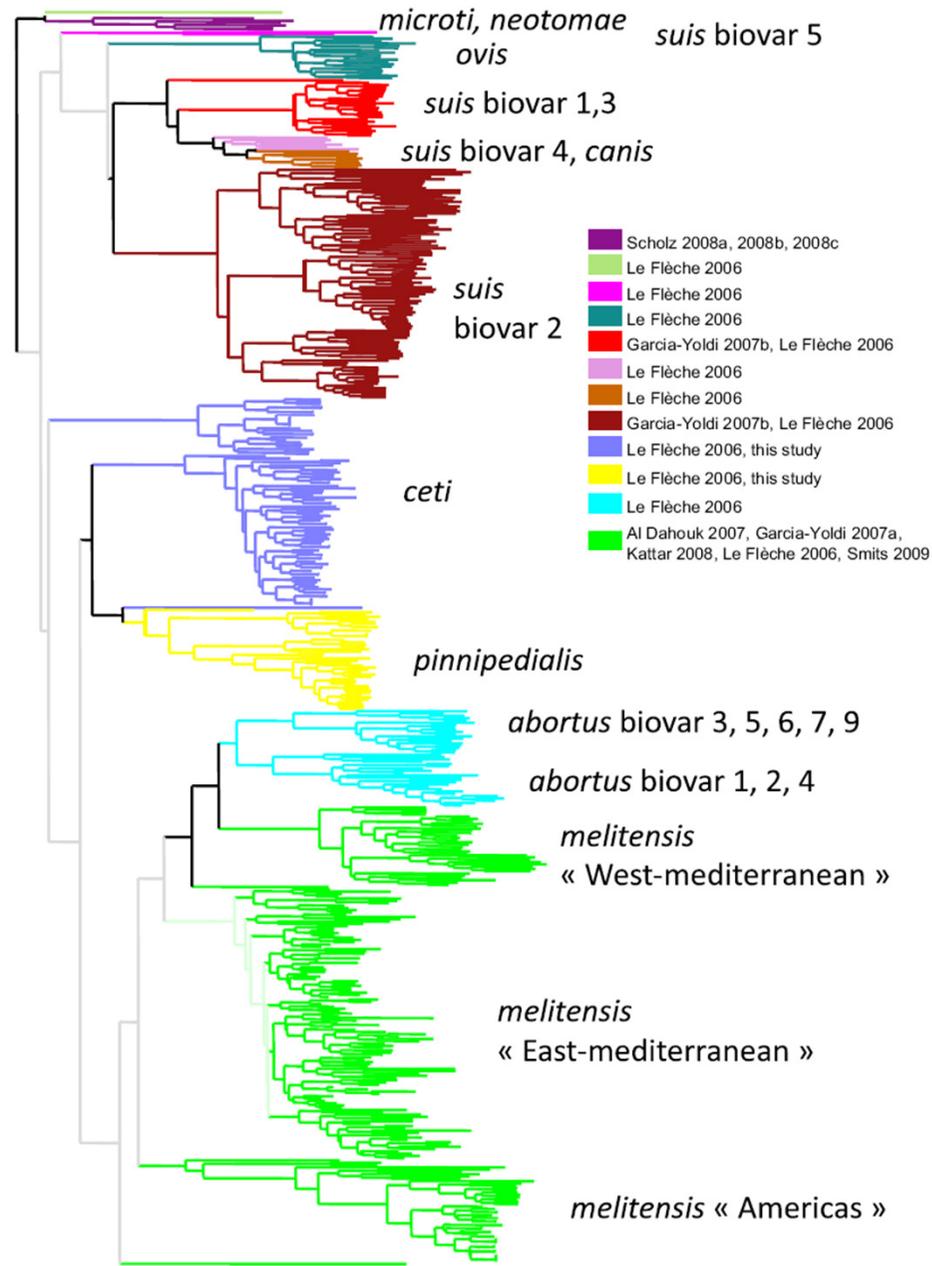
submit erase the form





ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

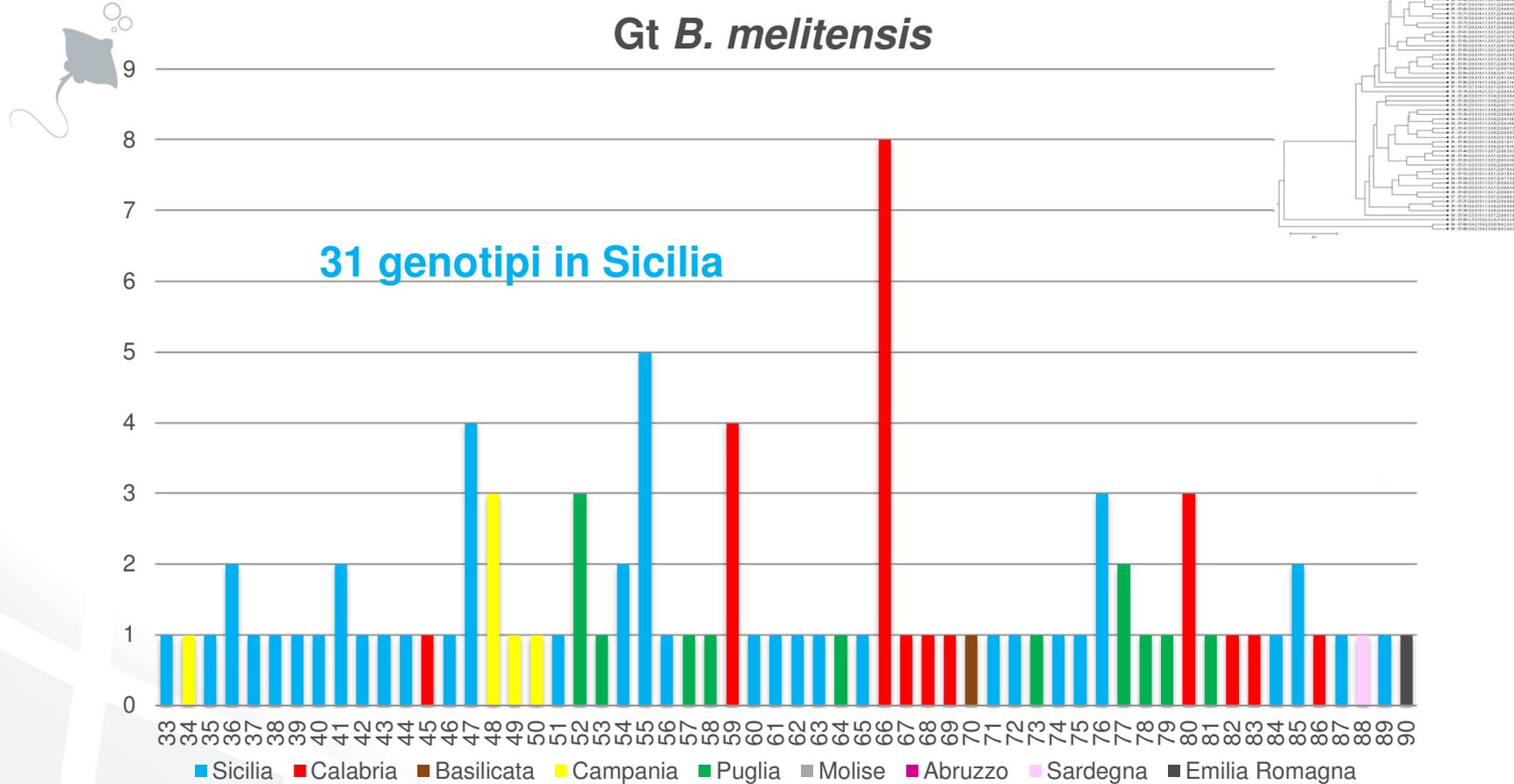
CRN Brucellosi  
Centro di Riferenza Nazionale



# MLVA 16 *B. melitensis*

 **CRN Brucellosi**  
Centro di Riferenza Nazionale

## Gt *B. melitensis*



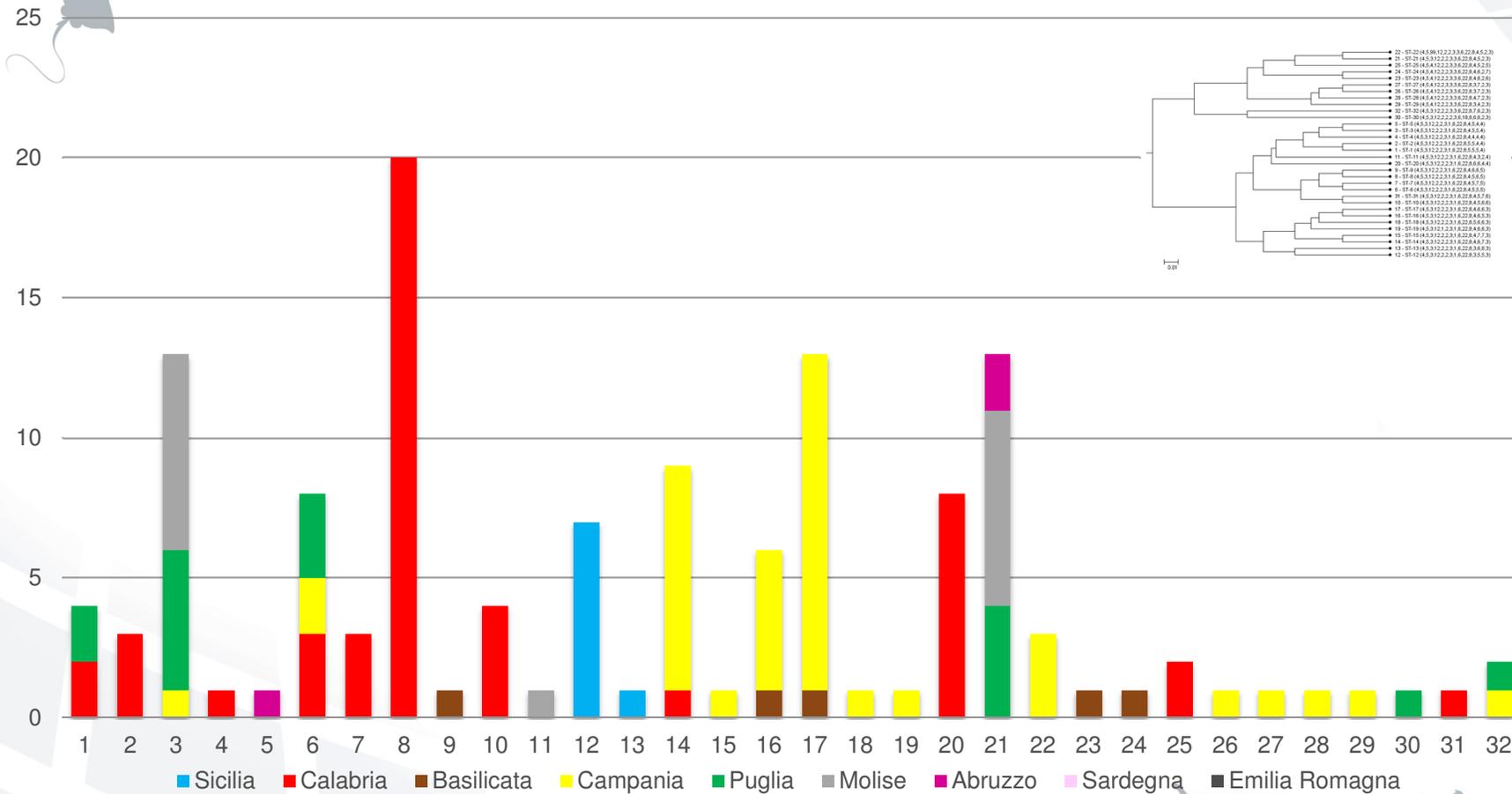
58 genotipi, con 45 che identificano un solo ceppo  
Indice di clusterizzazione 50% con 43 ceppi identificati da 13 genotipi



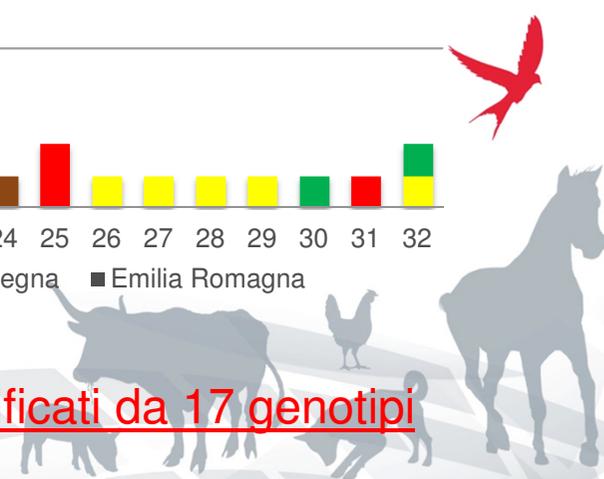
# MLVA 16 *B. abortus*

 **CRN Brucellosi**  
Centro di Riferenza Nazionale

## Gt *B. abortus*



**32 genotipi, con 16 che identificano un solo ceppo**  
**Indice di clusterizzazione 89,3% con 120 ceppi identificati da 17 genotipi**





ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

 **CRN Brucellosi**  
Centro di Referenza Nazionale

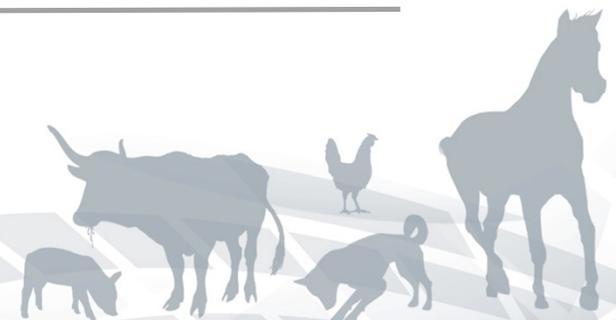
# Epidemiologia molecolare

- 7 *B. abortus* biovar 1
- 128 *B. abortus* biovar 3
- 1 *B. abortus* RB 51

32 Gt MLVA-16

- 87 *B. melitensis* biovar 3
- 1 *B. melitensis* biovar 1

58 Gt MLVA-16 



# Epidemiologia molecolare

- 1 isolato Ospedale Reggio Emilia

## *B. melitensis biovar. 3*

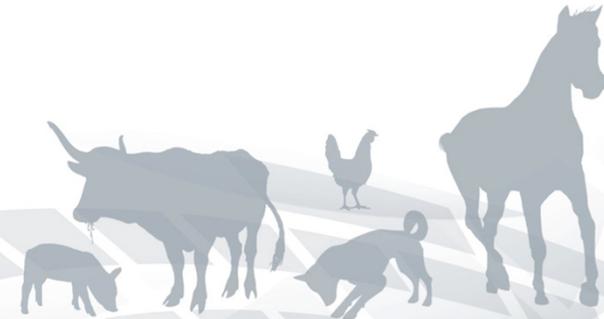
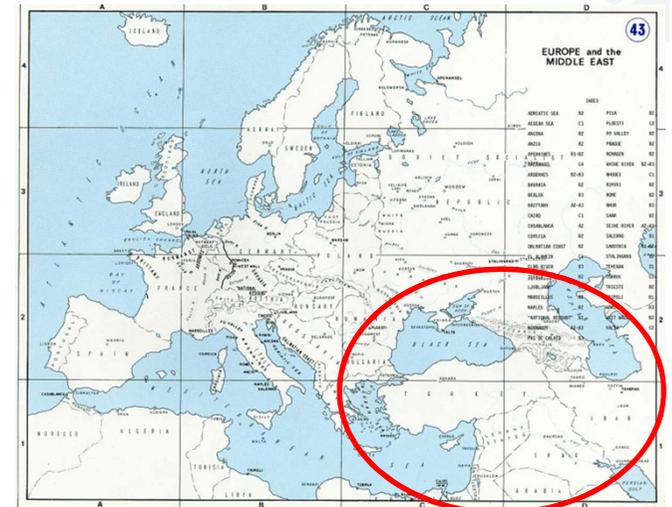
Risultato MLVA:

MLVA 11 – Gruppo East Mediterranean

MLVA 16 – omologia inferiore al 50% con i ceppi Italiani.

Anamnesi carente!!!

(isolato da cittadino extracomunitario)





ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

 **CRN Brucellosi**  
Centro di Riferenza Nazionale



- 1 isolato Ospedale di Salerno

*B. melitensis biovar 3*

Risultato MLVA

MLVA 11 – Gruppo West Mediterranean

MLVA 16 – Omologia 100% con 2 isolati da  
allevamento provincia di Salerno



Forte sospetto di collegamento tra il caso umano e il focolaio di brucellosi ovi-caprina.





ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

 **CRN Brucellosi**  
Centro di Referenza Nazionale



- 1 isolato Sardegna (regione indenne)

## *B. melitensis biovar 1*

Focolaio di introduzione con capre infette importate dalla Spagna.

Risultato MLVA -11 = Gruppo America

Gruppo America è circolante in Spagna,  
Portogallo e America Latina.  
Concordanza con la caratterizzazione  
fenotipica





ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

 **CRN Brucellosi**  
Centro di Referenza Nazionale



# Prospettive future!!

- Creare una banca dati OPEN SOURCE
- Analisi MLVA da affiancare a tipizzazione fenotipica
- Studio retrospettivo

Andamento del piano di eradicazione

Prima e dopo Ordinanza Ministeriale

Studi focalizzati su provincie e o comuni

Studi su singoli allevamenti

Indagine sul ruolo dei selvatici





CRN Brucellosi  
Centro di Referenza Nazionale



# • Ricerca SNPs attraverso whole genome sequencing

Identificazione SNPs dei cluster genetici circolanti in Italia

Studio della struttura della popolazione di Brucelle in Italia  
eventuali relazione con i territori circostanti

Ricerca dei polimorfismi che indichino l'adattamento alle singole specie

Ricerca meccanismi di attenuazione dei ceppi vaccinali

Acquisizione di un nuovo strumento di epidemiologia molecolare  
Utilizzabile anche su altre specie batteriche





ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO



**CRN Brucellosi**

Centro di Referenza Nazionale



**Si ringrazia**

**Dr.ssa Elisa Di Giannatale**

**Dr.ssa Katuscia Zilli**

**Dr.ssa Tiziana Persiani**

**Dr. ssa Lorena Sacchini**

**Dr.ssa Alessandra Alessiani**

**Dr.ssa Francesca Marotta**

**Dr.ssa Ilenia Platone**

**Dr.ssa Gabriella Di Serafinio**

**Dr. Fernando Di Emidio**

# Grazie

