

## Tipizzazione molecolare dei ceppi di campo di *Brucella* isolati in Italia

M. Ancora<sup>(1)</sup>, P. De Santis<sup>(1,2)</sup>, E. Di Giannatale<sup>(1)</sup> & A. Alessiani<sup>(1)</sup>

### Riassunto

In questo studio sono state applicate tecniche molecolari per l'identificazione dei ceppi di campo di *Brucella*. Per identificare gli isolati di campo a livello di specie è stato utilizzato un metodo PCR basato sulla sequenza di inserzione IS711. Successivamente è stata effettuata l'analisi dei polimorfismi dei pattern di restrizione (RFLP) dei geni amplificati *omp2a* e *omp2b* per assegnare alle specie *Brucella* le corrispondenti biovarianti. Sono stati processati un totale di 248 ceppi di campo ed è stato ottenuto un completo accordo con le identificazioni di specie/biovarianti effettuate con i metodi batteriologici convenzionali. I metodi molecolari si sono dimostrati validi nel superare alcuni svantaggi inerenti i metodi tradizionali rivelandosi nel contempo più veloci.

### Parole chiave

Analisi dei polimorfismi dei pattern di restrizione, Biovarianti, Brucellosi, Italia, Reazioni a catena della polimerasi, Tecniche molecolari.

### Introduzione

Il genere *Brucella*, classicamente, include sei specie: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. suis* e *B. neotomae* (4). Ciascuna specie è stata ulteriormente suddivisa in biovarianti. Alternativamente, sulla base dell'omologia mostrata in studi d'ibridazione DNA-DNA, è stato suggerito che la *Brucella* è un genere monospecifico, rappresentato dalla specie *Brucella melitensis* comprendente diverse biovarianti (7, 8). Per interpretare accuratamente le informazioni epidemiologiche all'interno del programma di eradicazione di questa patologia in Italia è essenziale identificare i diversi ceppi di *Brucella*, che colpiscono gli animali domestici e selvatici durante i focolai della malattia. Attualmente, il metodo diagnostico ufficiale è rappresentato dall'isolamento di colonie batteriche derivanti dal tessuto ospite, latte o essudati vaginali, seguiti dalla loro caratterizzazione (1, 5). Tuttavia, il metodo batteriologico classico, utilizzato per identificare i ceppi di *Brucella*, non solo prevede tempi tecnici molto lunghi, ma aumenta anche il pericolo, per il personale di laboratorio, di contrarre l'infezione a causa della continua manipolazione dell'agente infettante. Sono stati sviluppati nuovi metodi molecolari, come l'amplificazione della sequenza di inserzione IS711 (2) e l'analisi dei polimorfismi dei pattern di restrizione (RFLP) dei geni amplificati *omp2a* e *omp2b* (3), in grado di identificare a livello genetico i diversi ceppi di *Brucella*. L'esame AMOS (*abortus melitensis ovis suis*) PCR consiste in una PCR multiplex disegnata per mettere in evidenza gli elementi della sequenza di inserzione IS711 nelle quattro specie di *Brucella*: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* e *B. suis*.

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo & del Molise «G. Caporale» (IZSA&M), Campo Boario, Teramo - Italia

<sup>2</sup> Indirizzo attuale: Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana, via Appia Nuova 1411, Roma - Italia

Il numero delle copie dell'elemento di inserzione IS711 e la loro distribuzione nel cromosoma della *Brucella* sono specie-specifiche. L'esame PCR sfrutta le variabilità delle sequenze che fiancheggiano gli elementi IS711 mediante l'utilizzo di specifici primers che ibridizzano le corrispondenti regioni variabili (2).

Le sequenze dei geni *omp2a* e *omp2b* codificano per le principali proteine esterne di membrana (OMPs) della *Brucella*. Poiché esiste una differenza intra-specifica nelle sequenze di questi geni, la loro digestione con un set di enzimi di restrizione produce pattern diversi a seconda delle biovarianti (3). La corretta combinazione enzima di restrizione/gene *omp* ci permette di identificare e differenziare la maggior parte delle specie *Brucella* e alcune biovarianti. Per caratterizzare i ceppi di campo italiani di *Brucella*, gli autori hanno valutato le performance dei metodi molecolari sopra menzionati, comparandoli con i metodi batteriologici standard.

## Materiali e metodi

### Ceppi di riferimento

I DNA estratti da tutti i ceppi di riferimento della *Brucella* sono stati forniti dal Central Veterinary Laboratory, Weybridge (United Kingdom).

### Isolati batterici

È stata utilizzata una collezione di 248 ceppi di campo di *Brucella* isolati in Italia da uomo ed animali tra il 2001 e il 2003, conservati mediante il sistema Microbank™ e coltivati sul Trypticase Soy Broth arricchito con lo 0,6% (w/v) di estratto di lievito e siero equino sterile ad una concentrazione finale del 5% (v/v). I ceppi isolati sono stati saggianti per la purezza e tipizzati per specie e biovarianti secondo le procedure batteriologiche classiche (1, 5).

### Estrazione del DNA

Le cellule di *Brucella* sono state recuperate per centrifugazione di 1 ml di brodocoltura, i DNA sono stati quindi estratti secondo metodi standard

fenolo-cloroformio (6) e mantenuti a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'uso.

### Identificazione di specie

L'analisi AMOS-PCR descritta da Bricker and Halling (2), con una lieve modifica alla procedura originale, è stata usata per amplificare l'inserzione di sequenza IS711. In breve, il DNA dei campioni è stato amplificato in un volume finale di 50  $\mu\text{l}$  di PCR master mix contenente:

- 5  $\mu\text{l}$  del tampone PCR 10x (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl: Applied Biosystems)
- 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$  (buffer II: Applied Biosystems)
- 200  $\mu\text{M}$  di ciascun dNTP
- 1  $\mu\text{M}$  IS711 di primer specifico
- 0.2  $\mu\text{M}$  di ciascun primer specifico per *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* e *B. suis*
- 2.5 U AmpliTaq polymerase (Applied Biosystems)
- 5-10 ng di DNA templato.

L'amplificazione è stata eseguita per 40 cicli in un thermal cycler (Applied Biosystems Gene Amp PCR system 9700) con una denaturazione a  $95^{\circ}\text{C}$ , annealing a  $60^{\circ}\text{C}$  ed un'estensione a  $72^{\circ}\text{C}$  (ciascuno per 30 sec). I cicli sono preceduti da 10 min di denaturazione a  $95^{\circ}\text{C}$  e seguiti da un'estensione finale di 7 min a  $72^{\circ}\text{C}$ . Gli ampliconi sono stati controllati mediante fluorescenza dopo la corsa elettroforetica in gel di agarosio 1,5% in presenza di bromuro di etidio (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

### Identificazione biovariante

Le amplificazioni dei geni *omp2a* e *omp2b* sono state eseguite come descritte da Cloeckert *et al.* (3) con una lieve modifica alle condizioni di reazione. La PCR master mix è stata eseguita in un volume totale di 50  $\mu\text{l}$  contenente:

- 5  $\mu\text{l}$  di tampone PCR 10x
- 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$
- 200  $\mu\text{M}$  di ciascun dNTP
- 1  $\mu\text{M}$  di ciascun primer specifico
- 2.5 U AmpliTaq polymerase (Applied Biosystems)
- 5-10 ng di DNA templato.

## Risultati

### Identificazione di specie

L'amplificazione del segmento di inserzione IS711 ottenuto mediante AMOS-PCR produce, nelle differenti specie *Brucella*, ampliconi di differenti dimensioni (Fig. 1). Comunque, come descritto da Bricker *et al.* (2), singole biovarianti all'interno delle diverse specie non possono essere differenziate. In particolare, la differenziazione delle specie è determinata includendo la *B. abortus* biovariante 1, 2 e 4, la *B. melitensis* biovariante 1, 2 e 3, la *B. ovis* e la *B. suis* biovariante 1. Come atteso, nessun prodotto PCR è stato ottenuto per la *B. abortus* biovariante 3, 5, 6 e 9 o per la *B. suis* biovariante 2, 3, 4 e 5 (2).

### Identificazione biovariante

I pattern RFLP, risultanti dall'appropriata combinazione enzima di restrizione/gene *omp*

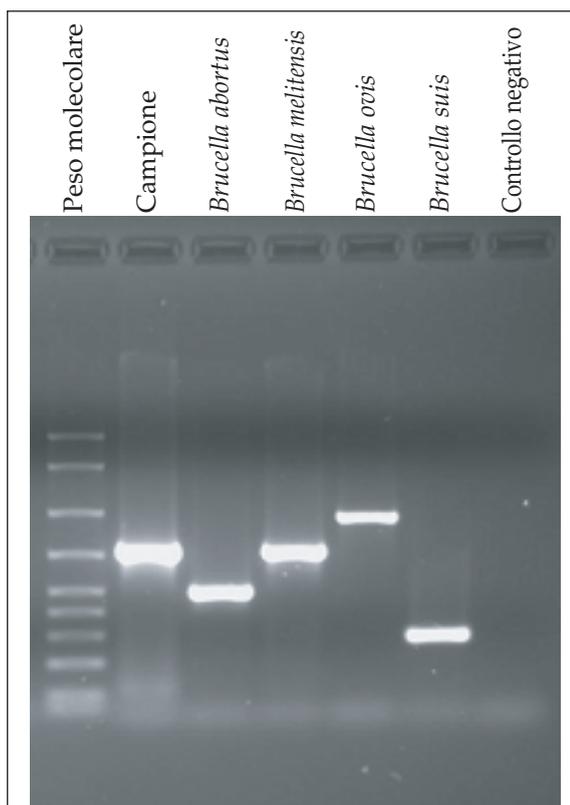


Figura 1  
Prodotti amplificati mediante AMOS-PCR da ceppi isolati di *Brucella* sp.

(Tabelle I e II), hanno differenziato la maggior parte delle biovarianti all'interno delle specie *Brucella* identificate con il metodo AMOS. Per esempio, la *B. melitensis* biovariante 3 può essere distinta eseguendo prima la digestione del gene *omp2a* con l'enzima *PstI*, che esclude la biovariante 1 se si ottiene il pattern specifico P3 (Fig. 2), poi effettuando la digestione del gene *omp2b* con l'enzima *HinfI*, che esclude la biovariante 2 se si ottiene lo specifico pattern P1.

Le biovarianti della specie *B. abortus* sono geneticamente molto vicine (7, 8). Come ci si aspettava, alcune di loro (le biovarianti 3, 5, 6 e 9) mostravano pattern di restrizione identici. Di conseguenza, non tutte le biovarianti possono essere differenziate individualmente.

Sono stati processati un totale di 248 isolati di campo di *Brucella* mediante esami basati sulla

Tabella I  
Pattern di restrizione del gene *omp2a*

Brucella species	Biovar.	Enzima	Enzima di restrizione		
			HinfI	PstI	StyI
<i>B. abortus</i>	1,2,4	A		P1	
<i>B. abortus</i>	3,5,6,9	B		P2	
<i>B. melitensis</i>	1	C		P3	
<i>B. melitensis</i>	1,2,3	B		P2	
<i>B. suis</i>	1,3,4	D	P3		P2
<i>B. suis</i>	2	E	P3		NC
<i>B. suis</i>	5	F	P4		NC

NC= non tagliato.

Tabella II  
Pattern di restrizione del gene *omp2b*

Brucella species	Biovar.	Enzima	Enzima di restrizione			
			EcoRI	HinfI	KpnI	TaqI
<i>B. abortus</i>	1,2	A				P1
<i>B. abortus</i>	3,4,5,6,9	B				P2
<i>B. melitensis</i>	1,3	B		P1		
<i>B. melitensis</i>	1,2,3	E		P3		
<i>B. suis</i>	1,5	B	P1		P1	
<i>B. suis</i>	2	F	P3		NC	
<i>B. suis</i>	3,4	G	P1		NC	

NC= non tagliato.

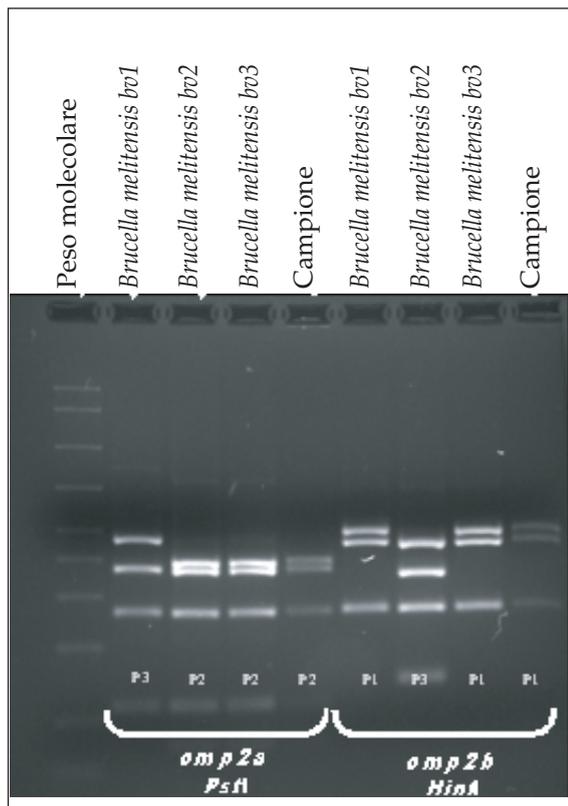


Figura 2  
Un esempio di pattern di restrizione in biovarianti di ceppi di campo di *Brucella melitensis*: ampliconi di *omp2a* ed *omp2b* digeriti rispettivamente con PstI e HinfI (P1, P2 e P3 come nelle Tabelle I e II).

PCR e RFLP come descritto precedentemente. Una combinazione di AMOS-PCR e RFLP dei geni *omp* ci ha permesso di identificare gli isolati come segue (Tabella III):

- 152 come *B. melitensis* biovariante 3
- 23 come *B. abortus* biovariante 1

Tabella III  
Distribuzione delle biovarianti di *Brucella* in isolati di campo ottenuti da alcune specie domestiche e selvatiche, e uomo.

Specie di <i>Brucella</i> e biovarianti	Pecore/Capre	Bovini	Bufali	Suini	Selvatici	Uomo	Totale
<i>B. melitensis</i> biovar 3	113	28	5	-	-	6	152
<i>B. abortus</i> biovar 1	-	20	3	-	-	-	23
<i>B. abortus</i> biovar 3,5,6,9	-	39	-	-	-	-	39
<i>B. ovis</i>	3	-	-	-	-	-	3
<i>B. suis</i> biovar 1	-	-	-	1	29	-	30
<i>B. suis</i> biovar 2	-	-	-	-	1	-	1

- 39 come *B. abortus* gruppo, biovariante 3, 5, 6 e 9
- 3 come *B. ovis*
- 30 come *B. suis* biovariante 1
- 1 come *B. suis* biovariante 2.

Tra i metodi molecolari e le procedure batteriologiche convenzionali è stato trovato un completo accordo nella caratterizzazione dei ceppi di campo esaminati a livello di specie e biovarianti.

## Discussione e conclusioni

L'approccio molecolare adottato in questo studio presenta diversi vantaggi se confrontato con le tecniche batteriologiche classiche. Uno degli svantaggi dei metodi classici è la lunga durata del processo lavorativo durante il quale passano almeno due settimane tra la raccolta del campione clinico e la definitiva identificazione della specie/biovariante. Inoltre, a causa della complessità dei test (la soggettività di alcune caratteristiche, come la morfologia della colonia), queste procedure dovrebbero essere effettuate da personale altamente specializzato in un laboratorio autorizzato. Infine, l'ampio numero delle caratteristiche esaminate e le piccole differenze tra alcune specie e biovarianti potrebbero produrre dati conflittuali e complicarne l'interpretazione. Quindi, i risultati potrebbero non essere definitivi. Al contrario, le tecniche molecolari permettono l'identificazione dei ceppi di *Brucella* in un solo giorno lavorativo. Inoltre, l'analisi RFLP è relativamente facile da eseguire

e fornisce risultati oggettivi e facili da interpretare. In più, l'analisi dei risultati ottenuti per mezzo dei metodi molecolari non è influenzata dalla presenza di contaminanti e, poiché non c'è bisogno di organismi vivi, è considerata molto più sicura per il personale di laboratorio rispetto ai metodi batteriologici.

## Ringraziamenti

Gli autori ringraziano Tiziana Roganti e Tiziana Persiani per l'esperto contributo e Rita Lorenzini per i preziosi commenti e suggerimenti.

## Bibliografia

1. Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D. & Verger J.M. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut national de la recherche agronomique (INRA), Paris, 190 pp.
2. Bricker B.J. & Halling S.M. 1994. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2 and 4 *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol*, **32**, 2660-2666.
3. Cloeckaert A., Verger J.M., Grayon M. & Grepinet O. 1995. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology*, **141**, 2111-2121.
4. Corbel M.J. & Brintley-Morgan W.J. 1984. Genus *Brucella* Meyer and Shaw 1920. In Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1 (N.R. Kreig & J.G. Holt, eds). Williams & Wilkins Co., Baltimore, 377-388.
5. Office International des Épizooties (OIE) 2004. Bovine brucellosis, Chapter 2.3.1. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 5th Ed. OIE, Paris ([oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00052.htm](http://oie.int/eng/normes/mmanual/A_00052.htm) accessed on 16 March 2005).
6. Sambrook J. & Russel D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, Third Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Chapter 6.4-6.11.
7. Verger J.M., Grimont F., Grimont P.A.D. & Grayon M. 1985. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridisation. *Int J Syst Bacteriol*, **35**, 292-295.
8. Verger J.M., Grimont F., Grimont, P.A.D. & Grayon M. 1987. Taxonomy of the genus *Brucella*. *Ann Inst Pasteur Microbiol*, **138**, 235-238.