

EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DELLA BRUCELLOSI IN SICILIA

Marianelli C.¹, Graziani C.¹, Santangelo C.², Xibilia M. T.², Imbriani A.², Amato R.³, Neri D.³, Cuccia M.⁴, Rinnone S.⁴, Di Marco V.⁵, Ciuchini F.¹¹ Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Roma; ² Azienda Ospedaliera Vittorio Emanuele, Dipartimento di Microbiologia, Catania; ³ Azienda Ospedaliera Gravina, Dipartimento di Microbiologia, Caltagirone; ⁴ Azienda Unità Sanitaria Locale N. 3, Dipartimento di Prevenzione, Catania; ⁵ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Area di Barcellona Pozzo di GottoKey words: *Brucella melitensis*, MLVA-16

SUMMARY

Brucellosis is a serious problem in Sicily. *Brucella melitensis* was identified as the species most frequently isolated in humans and animals in Italy. No epidemiological data from molecular typing of *Brucella* strains circulating in Italy, however, are available. We have conducted this study to characterize twenty clinical isolates of *B. melitensis* biovar 3 through the multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of 16 loci (MLVA-16). The MLVA-16 typing assay recognized 17 distinct genotypes.

INTRODUZIONE

La brucellosi è un importante problema di sanità pubblica in molti paesi del Mediterraneo. Si trasmette all'uomo attraverso il consumo di cibo contaminato o il contatto diretto/indiretto con animali infetti. Il principale agente zoonotico è rappresentato dalla *Brucella melitensis*, seguito dalla *B. abortus* e dalla *B. suis*.

In Italia, le misure di profilassi previste dalla normativa hanno portato all'eradicazione della malattia dalle regioni settentrionali e ad un sostanziale declino della brucellosi nelle regioni meridionali (da 923 casi notificati nel 2001 a 316 casi notificati nel 2005) (<http://www.ministerosalute.it/promozione/malattie/bollettino.jsp>). In Sicilia, con il 92.4% dei casi nazionali nel 2005, la brucellosi è endemica. In questa regione la persistenza della malattia è legata alla presenza di animali infetti, soprattutto piccoli ruminanti. L'allevamento ovicaprino costituisce la principale attività zootecnica ed è rappresentato da piccole e medie aziende a conduzione familiare. La produzione lattiero-casearia è ottenuta da latte crudo e spesso in assenza di procedure standard ed in condizioni igienico-sanitarie carenti. Inoltre, comuni pratiche di allevamento come la transumanza, la promiscuità tra pecore, capre e bovini, lo scambio dei riproduttori fra gli allevatori, aumentano la possibilità di contaminazione, trasmissione e diffusione della malattia sul territorio. La *B. melitensis* è ritenuto l'agente eziologico principale della brucellosi in Italia, considerata una *food-borne disease* piuttosto che una malattia occupazionale (3, 4, 5). Lo scopo del nostro lavoro è quello di tipizzare gli isolati umani di *Brucella* poiché le strategie per il controllo e l'eradicazione della malattia derivano, prima di tutto, dalla caratterizzazione epidemiologica della malattia stessa.

MATERIALI E METODI

Venti ceppi di *Brucella* sono stati isolati da pazienti ricoverati con la diagnosi di brucellosi acuta a Catania, da Aprile 2005 a Maggio 2006. Nessuno dei pazienti apparteneva alla categoria a rischio professionale. Tutti gli isolati, ottenuti da colture di sangue dei pazienti con il sistema BACTEC 9120 (Becton Dickinson, Rutherford, NJ), sono stati sottoposti ad analisi microbiologica e molecolare. L'analisi microbiologica (richiesta di CO₂, produzione di H₂S, sensibilità alla tiorina e fuxina basica, agglutinazione con sieri specifici (2)), ha permesso l'identificazione degli isolati come *B. melitensis*

biotipo 3. L'analisi molecolare è stata eseguita mediante il saggio MLVA-16 (1, 6). Il ceppo di *B. melitensis* 16M, il cui profilo MLVA-16 è noto, è stato utilizzato come riferimento. Sono state utilizzate per ciascun isolato sedici coppie di oligonucleotidi corrispondenti ad otto minisatelliti (loci Bruce06, Bruce08, Bruce11, Bruce12, Bruce42, Bruce43, Bruce45 e Bruce55) ed otto microsattelliti (loci Bruce04, Bruce07, Bruce09, Bruce16, Bruce18, Bruce19, Bruce21 e Bruce30). Le amplificazioni sono state eseguite denaturando inizialmente a 94°C per 3 min seguite da 30 cicli a 94°C per 30 sec, 60°C per 30 sec e 72°C per 50 sec. Cinque microlitri di ciascun prodotto sono stati caricati su gel di agarosio al 2% per l'analisi dei minisatelliti, e al 3% per l'analisi dei microsattelliti. Per stimare l'esatta grandezza degli amplificati, i prodotti sono stati purificati e sequenziati direttamente tramite il sequenziatore a capillare ABI PRISM 310 ed usando il kit BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Gli elettroferogrammi sono stati assemblati mediante il software Navigator Sequence (Applied Biosystems, Foster City, CA).

RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo studio abbiamo caratterizzato venti ceppi umani di *Brucella* isolati a Catania nell'arco di un anno. Il consumo di ricotta è stato identificato come la via d'infezione più probabile.

Lo studio delle caratteristiche fenotipiche ha permesso di identificare tutti gli isolati come *B. melitensis* biotipo 3. Allo scopo di comprendere meglio lo scenario epidemiologico, abbiamo utilizzato l'approccio molecolare del saggio MLVA-16, che consiste nell'amplificazione di 16 loci differenti per ciascun isolato e nel generare un profilo di bande multiple o *fingerprint* specifico. I 16 marcatori selezionati, sono una combinazione di 8 loci moderatamente variabili (minisatelliti) e 8 loci altamente variabili (microsattelliti). Il saggio MLVA-16 è stato recentemente utilizzato per analizzare ceppi di *Brucella* umani ed animali, provenienti da diversi Paesi, ed ha consentito l'individuazione di un numero elevato di differenti genotipi (1, 6). Non esistono, invece, dati circa la distribuzione dei genotipi di *Brucella* in aree endemiche ristrette. Tale informazione potrebbe aiutare a capire se esiste una correlazione tra genotipo e patogenicità della *Brucella*.

Sebbene i nostri isolati umani abbiano una identica origine geografica, differenze sono state osservate in sette loci (Bruce08, Bruce12, Bruce04, Bruce07, Bruce09, Bruce16 e Bruce18), consentendo di raggruppare gli isolati in 17 distinti genotipi come mostrato in Tabella 1. I nostri risultati mostrano chiaramente che la *Brucella*, nonostante l'alto grado di omogeneità osservato tra le diverse specie, è altamente polimorfa a livello di minisatelliti e microsattelliti. Sono stati infatti identificati in un'area endemica ristretta 17 MLVA-*fingerprint* diversi appartenenti però alla stessa specie e stesso biotipo.

Sebbene il saggio MLVA-16 non possa essere utilizzato per l'identificazione del biotipo a causa dell'eterogeneità osservata nelle diverse specie di *Brucella* tale da impedire un

raggruppamento omogeneo dei diversi biotipi, tale metodica si presta particolarmente allo studio delle epidemie. Il saggio MLVA-16 potrebbe essere usato per verificare la relazione genetica fra ceppi al fine di individuare la possibile sorgente di infezione. Ceppi, infatti, che presentano lo stesso MLVA-genotipo indicano una comune sorgente di infezione. I nostri risultati dimostrano l'alto potere discriminante della metodica MLVA-16 supportando il suo utilizzo a scopi epidemiologici.

Tabella 1. Genotipi identificati analizzando 20 isolati umani di *B. melitensis* biotipo 3 tramite il saggio MLVA-16.

Genotype	Species and biovar	Strain	No. of isolates ^a	Bruce6	Bruce8	Bruce11	Bruce12	Bruce42	Bruce43	Bruce45	Bruce55	Bruce64	Bruce67	Bruce69	Bruce16	Bruce18	Bruce19	Bruce21	Bruce30
1	<i>B. m. bv.1</i>	16M ^b		3	4	2	13	4	2	3	3	2	5	7	3	5	18	6	6
2	<i>B. m. bv.3</i>	DG1	3	3	6	3	14	1	1	3	3	4	10	8	6	8	21	8	3
3	<i>B. m. bv.3</i>	GV2	2	3	5	3	13	1	1	3	3	5	6	12	9	7	21	8	1
4	<i>B. m. bv.3</i>	CM10	1	3	6	3	14	1	1	3	3	6	7	7	5	7	21	8	3
5	<i>B. m. bv.3</i>	CS13	1	3	5	3	13	1	1	3	3	5	5	6	8	7	21	8	1
6	<i>B. m. bv.3</i>	BL9	1	3	6	3	14	1	1	3	3	6	4	6	7	7	21	8	3
7	<i>B. m. bv.3</i>	MM14	1	3	5	3	13	1	1	3	3	6	7	4	6	7	21	8	3
8	<i>B. m. bv.3</i>	AM12	1	3	5	3	13	1	1	3	3	4	7	11	9	8	21	8	1
9	<i>B. m. bv.3</i>	HC6	1	3	6	3	14	1	1	3	3	7	6	9	7	7	21	8	3
10	<i>B. m. bv.3</i>	PD11	1	3	5	3	13	1	1	3	3	5	4	7	8	7	21	8	3
11	<i>B. m. bv.3</i>	CV5	1	3	6	3	14	1	1	3	3	8	4	7	9	7	21	8	3
12	<i>B. m. bv.3</i>	MA5	1	3	5	3	13	1	1	3	3	5	5	12	9	7	21	8	3
13	<i>B. m. bv.3</i>	SP4	1	3	5	3	13	1	1	3	3	4	8	10	5	8	21	8	3
14	<i>B. m. bv.3</i>	DZ7	1	3	5	3	13	1	1	3	3	3	5	6	6	7	21	8	3
15	<i>B. m. bv.3</i>	GA8	1	3	6	3	13	1	1	3	3	6	4	11	6	7	21	8	3
16	<i>B. m. bv.3</i>	GR6	1	3	6	3	13	1	1	3	3	7	4	6	10	8	21	8	3
17	<i>B. m. bv.3</i>	DN5	1	3	5	3	13	1	1	3	3	8	6	6	8	7	21	8	3
18	<i>B. m. bv.3</i>	ST4	1	3	5	3	13	1	1	3	3	5	5	13	9	7	21	8	3

E' riportato il numero di copie delle ripetizioni per ciascun locus analizzato.

^a Numero di isolati con lo stesso genotipo.

^b *B. melitensis* 16M utilizzato come ceppo di riferimento.

BIBLIOGRAFIA

1. Al Dahouk, S., P. Le Fleche, K. Nockler, I. Jacques, M. Grayon, H. C. Scholz, H. Tomaso, G. Vergnaud, and H. Neubauer. 2007. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. J. Microbiol. Methods 69:137-145.
2. Alton, G. G., L. M. Jones, R. D. Angus, and J. M. Verger. 1988. Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique Publications. Paris, France.
3. Caporale, V., D. Nannini, A. Giovannini, D. Morelli, and M. Ramasco. 1992. Prophylaxis and control of brucellosis due to *Brucella melitensis* in Italy: acquired and expected results, p. 127-145. Preventing of brucellosis in the Mediterranean Countries. Proceedings of the International Seminar C.I.H.E.A.M., C.E.C., MINAG (Malta), FIS (Malta).
4. De Massis, F., A. Di Girolamo, A. Petrini, E. Pizzigallo, and A. Giovannini. 2005. Correlation between animal and human brucellosis in Italy during the period 1997-2002. Clin. Microbiol. Infect. 11:632-636.
5. Iaria, C., F. Ricciardi, F. Marano, G. Puglisi, G. Pappas, and A. Cascio. 2006. Live nativity and brucellosis, Sicily. Emerg. Infect. Dis. 12: 2001-2.
6. Le Fleche, P., I. Jacques, M. Grayon, S. Al Dahouk, P. Bouchon, F. Denoed, K. Nockler, H. Neubauer, L. A. Guilloteau, and G. Vergnaud. 2006. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. BMC Microbiol 6:9.