

# **“RICERCA CORRENTE 2005”**

## **RELAZIONE FINALE**

### **ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DEL MEZZOGIORNO SEZIONE DIAGNOSTICA PROVINCIALE DI SALERNO**

*CENTRO DI REFERENZA NAZIONALE SULL'IGIENE E LE TECNOLOGIE  
DELL'ALLEVAMENTO E DELLE PRODUZIONI BUFALINE*

Sviluppo e validazione di tecniche molecolari per la rapida identificazione di specie e relativo biovar di *Brucella* spp. isolate da allevamenti bufalini infetti.

**Responsabile scientifico**

Cognome: GALIERO

Nome GIORGIO

## Introduzione

La brucellosi del bufalo è sostenuta da *B. abortus* e *B. melitensis*. Nei soggetti gravidi *Brucella* spp. colonizza l'utero a carico del quale causa placentite, anossia e setticemia fetale, aborto tardivo e ritenzione placentare. Nel toro, i siti comunemente colonizzati sono i testicoli, le vescicole seminali e l'epididimo, con comparsa di orchite ed epididimite associata a sterilità. La maggioranza degli animali infetti diffonde il microrganismo attraverso invogli fetali, colostro e latte. La diagnosi di certezza si basa sull'isolamento microbico. Nella specie *abortus* si riconoscono 7 biovarianti, mentre nella specie *melitensis*, sono note tre biovarianti. L'identificazione della specie e, dove possibile, del biotipo sono di importanza cruciale per i programmi di sorveglianza/eradicazione della brucellosi e per l'analisi epidemiologica della malattia umana ed animale. Ad oggi l'identificazione della specie e del biotipo di *Brucella* si basa sull'analisi di una serie di caratteristiche che vanno dalla sierologia al fenotipo biochimico (proprietà antigeniche del lipopolisaccaride di membrana, la tipizzazione fagica, la sensibilità alla tionina e fuxina basica, la richiesta di CO<sub>2</sub>, la produzione di H<sub>2</sub>S ed altre proprietà metaboliche). Molto spesso, però, le piccole variazioni biochimiche tra le specie ed i biotipi portano ad una difficile interpretazione dei risultati. E' stato riportato l'isolamento di ceppi di *Brucella melitensis* che mostravano un pattern atipico di sensibilità alla fucsina basica ed alla tionina. Inoltre i metodi tradizionali richiedono la manipolazione di ceppi vivi aumentando la probabilità di infezione per i tecnici di laboratorio. La necessità quindi di metodi più rapidi e sicuri ha spinto numerosi ricercatori a sviluppare metodiche basate sul DNA per l'identificazione della specie e del biotipo di *Brucella*. Ad oggi, però, nessuna metodica molecolare è riconosciuta ufficiale ed in grado di differenziare tutte le specie ed i biotipi. Recentemente è stato amplificato e sequenziato il gene *rpoB* di 4134 nucleotidi e codificante la subunità B della RNA polimerasi su 26 ceppi di referenza. Tale studio ha mostrato la presenza di specifiche variazioni nucleotidiche all'interno del gene in grado di differenziare la specie ed il biotipo di *Brucella*.

Il progetto si prefigge di sviluppare e di validare un metodo rapido biomolecolare in grado di differenziare specie e biotipo sfruttando il polimorfismo del gene *rpoB* e senza ricorrere al suo completo sequenziamento. Tale metodo sarà validato applicandolo ad un significativo numero di isolati di campo e confrontando i risultati ottenuti con quelli delle metodiche tradizionali e di altri metodi molecolari oggi disponibili. Inoltre, considerate le difficoltà che sinora accompagnano le tecniche di estrazione di *Brucella* spp. da latte di bufala, saranno posti a confronto varie tecniche di estrazione del DNA microbico, al fine di proporre una metodica di PCR, efficace e standardizzata, applicabile a questa particolare matrice biologica.

Obiettivo finale del progetto è quello di offrire un valido strumento per la rapida identificazione e differenziazione degli isolati di *Brucella*: riduzione dei tempi di risposta, aumento dell'affidabilità e riproducibilità delle prove rispetto ai metodi tradizionali. Tali informazioni potranno supportare i piani di controllo/eradicazione della brucellosi su base aziendale e territoriale e le indagini epidemiologiche sulla diffusione della malattia sia nell'uomo che negli animali al fine di individuare i principali fattori di rischio per l'uomo.

## Materiali e metodi

Campioni di organi bufalini, feti, lochiazioni e latte per un totale di 300 matrici, sono stati sottoposti ad esame microbiologico per l'isolamento di *Brucella* spp.

Tutti i cloni isolati sono stati sottoposti a caratterizzazione, secondo le tecniche attualmente in uso, presso il Centro di Referenza Nazionale dell'IZS di Teramo.

Gli stessi ceppi sono stati parallelamente sottoposti ad analisi molecolare. Il DNA batterico è stato estratto ed il gene *rpoB* è stato amplificato tramite PCR. I prodotti di amplificazione sono stati successivamente sequenziati e confrontati con il gene *rpoB* della *B. melitensis* 16M, considerata come sequenza di riferimento, al fine di trovare marker molecolari di specie e biotipo.

Tutti gli isolati caratterizzati microbiologicamente come *B. abortus* presentavano i seguenti marker molecolari di specie: in posizione amminoacidica 243-GAC, 268-ACT, 737-GTC e 969-CGT. Tutti i ceppi di *B. melitensis* biotipo 3 presentavano il marker molecolare in posizione 1249-ATA. Questi siti polimorfici del gene *rpoB* sono stati utilizzati per sviluppare un rapido test molecolare che per rapida identificazione della specie di *Brucella*. A tale scopo, specifiche porzioni del gene *rpoB* sono state amplificate e successivamente digerite gli enzimi di restrizione BsrI e BstUI (Tabella 1).

Tabella 1. Profili di digestione enzimatica

Specie	PCR ( <i>rpoB</i> amplificato dai 600 al 1020 nt circa) e digest. enz. BsrI	PCR ( <i>rpoB</i> amplificato dai 2700 al 3000 nt circa) e digest. enz. BstUI	Profili
<i>B. melitensis</i> (biotipi 1-3)	P1	P1	P1P1
<i>B. abortus</i> (biotipi 1-7 e 9)	P2	P2	P2P2
<i>B. suis</i> (biotipi 1-5)	P1	P2	P1P2

Ioltre, al fine di saggiare le 5 differenti tecniche di estrazione di DNA microbico, sono state predisposte 5 serie di 12 campioni composti ciascuno da 500  $\mu$ l di latte bufalino batteriologicamente negativo alla ricerca di *Brucella* spp. e proveniente da un allevamento ufficialmente indenne. Ciascun campione è stato contaminato con diluizioni scalari del vaccino *Brucella abortus* RB51 a concentrazione nota ( $2 \times 10^{10}$  UCF/ml), inoculando da  $2 \times 10^9$  batteri fino a 0.02 batteri.

**Estrazione DNA. Metodo A.** A ciascun campione così preparato sono stati aggiunti 100  $\mu$ l di tampone NET (NaCl 50 mM, EDTA 125 mM, Tris-HCl (pH 7.6) 50 mM) e 100  $\mu$ l di SDS 24%. I campioni sono stati riscaldati ad 80 °C per 10 min e raffreddati poi in ghiaccio. Dopo aver aggiunto 1.5  $\mu$ l di RNase (4 mg/mL) ed 1.5  $\mu$ l di PK (20 mg/mL), i campioni sono stati incubati a 50 °C per 2 ore (7). Sono stati successivamente estratti con un ugual volume di fenolo/cloroformio/alcool isoamilico 25:24:1 utilizzando tubi Phase Lock Gel™ Heavy (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) e centrifugando per 15 min alla massima velocità. Il DNA è stato precipitato con 1/10 di volume di NaOAc 3.5 M, 1  $\mu$ l di glicogeno (10  $\mu$ g/mL) ed 1 volume di isopropanolo ed incubando a -20°C per almeno 3 ore. Il pellet è stato lavato con 600  $\mu$ l di etanolo 70%, asciugato e ripreso con 100  $\mu$ l di acqua sterile.

**Metodo B.** Sono stati aggiunti 400  $\mu$ l di tampone di lisi (Triton-X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl (pH 8) 10 mM) e 5  $\mu$ l di PK (20 mg/mL). I campioni sono stati incubati a 50 °C per 30 min (5). Il DNA è stato estratto come sopra.

**Metodo C.** Sono stati aggiunti 300 µl di tampone di lisi (guanidina tiocianato 3 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl (pH7) 10 mM, Triton-X-100 40 mg/mL, ditiotreitolo 10 mg/mL) (3), miscelati e lasciati agire a temperatura ambiente per 10 min. Sono stati poi aggiunti 100 µl di SDS 10% e 3 µl di PK ed incubati a 50 °C per 1 ora. Sono stati aggiunti 3 µl di RNase (4 mg/mL) ed incubato ancora per 1 ora a 37 °C. Il DNA è stato estratto come sopra.

**Metodo D.** I campioni di latte sono stati centrifugati alla massima velocità per 15 min. Lo strato di grasso superficiale è stato rimosso con un tampone ed il sovrantante è stato scartato. Il pellet è stato disciolto in 500 µl di soluzione fisiologica e sottoposto ad estrazione seguendo il metodo A.

**Metodo E.** I campioni di latte sono stati processati utilizzando il DNA Mini Kit Qiagen e seguendo il protocollo indicato dal produttore.

**PCR.** 2 µl di DNA estratto sono stati sottoposti ad amplificazione utilizzando il kit GoTaq Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI) in 50 µl di volume finale. Due diversi test PCR sono stati eseguiti utilizzando due differenti coppie di primer. a) **coppia di oligonucleotidi B4/B5** (2) con i seguenti cicli di amplificazione: 95 °C per 2 min, seguito da 40 cicli a 95 °C per 30 sec, 60 °C per 30 sec, 72 °C per 30 sec, seguito poi da 10 min a 72 °C; b) **coppia di oligonucleotidi F4/R2** (6) con i seguenti cicli di amplificazione 95 °C per 2 min, seguito da 30 cicli a 95 °C per 30 sec, 54 °C per 90 sec, 72 °C per 30 sec, seguito poi da 10 min a 72 °C. 25 µl di ciascun amplificato sono stati visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2%.

### **Prova di confronto**

Allo scopo di confrontare la metodica di PCR prescelta, con l'esame batteriologico e la PCR Real-Time, sono stati raccolti 58 campioni di latte di bufala prelevati da bufale sierologicamente positive.

**Esame microbiologico.** I campioni di latte, sono stati saggiati, previa centrifugazione per 20' a 2000 rpm, per la ricerca di *Brucella* spp. mediante semina della panna e del sedimento, su terreno solido Agar Brucella (Oxoid Ltd., Hampshire, England) addizionato con Brucella Supplement (Oxoid Ltd., Hampshire, England) e siero equino al 5%. Le piastre sono state incubate a 37 °C in presenza di CO<sup>2</sup> per 10 giorni. La crescita di *Brucella* spp. è stata dimostrata mediante esame microscopico, sierologico e biochimico delle colonie (1).

**PCR e Real-Time PCR.** 2 µl di DNA estratto secondo il metodo A, sono stati sottoposti ad amplificazione utilizzando la coppia di oligonucleotidi B4/B5 ed utilizzando il kit GoTaq Green Master Mix (Promega) per la PCR tradizionale. Per la Real-Time PCR è stata utilizzata la stessa quantità di DNA estratto e la stessa coppia di oligonucleotidi. Sono stati utilizzati il kit Sensy Mix Biotline, in presenza del fluoroforo SYBR Green e lo strumento 7000 Real-Time PCR System della Applied Biosystems. Ciascun campione è stato testato in triplicato e parallelamente sono stati allestiti campioni non contenenti il DNA bersaglio. Per l'analisi dei dati è stato utilizzato il metodo della curva standard.

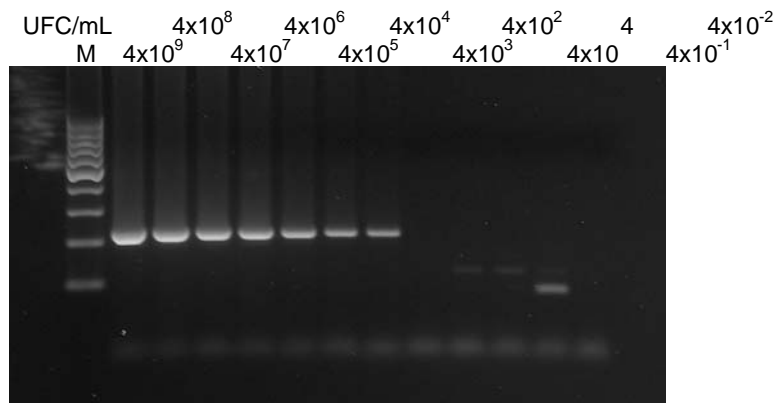
## Risultati e discussione

Tali ceppi sono stati caratterizzati microbiologicamente come *B. abortus* RB51 (3 isolati), *B. abortus* biotipo 1 (17 isolati), biotipo 3 (17 isolati) e biotipo 6 (4 isolati), e *B. melitensis* biotipo 3 (24 isolati). I diversi profili di digestione enzimatica così ottenuti hanno permesso di identificare e differenziare rapidamente le specie *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*. Non è stato invece, possibile, identificare con certezza dei marker specifici per il biotipo.

Non sono disponibili ad oggi dati per la diagnosi molecolare di *Brucella* tramite saggio PCR sul latte di bufala, che si caratterizza per il suo alto contenuto in grasso. In questo studio abbiamo valutato cinque diversi metodi di estrazione del DNA e due test PCR su campioni di latte artificialmente contaminati con diluizioni scalari di *B. abortus* RB51. La coppia di oligonucleotidi B4/B5 è risultata 10 volte più sensibile rispetto alla coppia F4/R2, indipendentemente dal metodo di estrazione utilizzato. Il test PCR B4/B5 applicato ai campioni estratti con il metodo A ha permesso di evidenziare la presenza di *Brucella* fino alla concentrazione di batteri pari a 4x10<sup>3</sup> UFC/mL;

applicato a quelli estratti con il metodo E, ha consentito di visualizzare la presenza del batterio fino alla concentrazione di  $4 \times 10^5$  UFC/mL. Il test PCR B4/B5 applicato ai campioni estratti con i metodi B, C e D ha mostrato, invece, sensibilità intermedia, permettendo di evidenziare un segnale positivo fino a  $4 \times 10^4$  UFC/mL. Il saggio molecolare più sensibile è risultato, perciò, dalla combinazione del metodo di estrazione A con la coppia B4/B5 (Figura 1).

Figura 1. Sensibilità del saggio PCR con il metodo di estrazione A e la coppia B4/B5.



Dei 58 campioni di latte inizialmente sottoposti all'esame colturale, 36 sono risultati positivi per *Brucella* spp. Tutti i campioni sono stati parallelamente sottoposti all'analisi molecolare utilizzando il saggio risultato più sensibile ed i risultati riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Confronto fra esame batteriologico e molecolare (metodo A + PCR B4/B5) per la ricerca di *Brucella* spp.

PCR	Real-Time PCR					
		pos	neg	pos	neg	
Colture	pos	36	25	11	26	10
	neg	22	7	15	8	14

I campioni estratti con il metodo A, sono stati esaminati anche con la Real-Time PCR. Tale tecnica ha evidenziato un maggior numero di campioni positivi come riportato in Tabella 1.

In conclusione, i nostri risultati mostrano che il metodo batteriologico rappresenta il test più sensibile, seguito dalla Real-Time PCR che a sua volta consente un maggior recupero di campioni positivi rispetto alla PCR tradizionale. I saggi molecolari, probabilmente a causa della presenza di molecole inibitrici dell'enzima utilizzato nell'amplificazione ciclica, non sono in grado di rilevare come positivi tutti i campioni dai quali è stato possibile isolare *Brucella* spp. Viceversa taluni campioni risultati negativi al test microbiologico, appaiono come positivi ai saggi molecolari forse in virtù del fatto che questi ultimi sono in grado di evidenziare materiale genetico appartenente a corpi microbici non più vitali. I nostri dati dimostrano che solo attraverso l'utilizzo combinato di saggi tradizionali e molecolari, diviene possibile evidenziare o escludere, la presenza di *Brucella* spp. nel latte di bufala ottenendo un netto miglioramento delle performance diagnostiche.

Di contro l'impossibilità di mettere a punto una tecnica che non si limiti al genere e specie, ma che poi riconosca e caratterizzi il biotipo in causa, dimostra che occorre lavorare ancora per affinare le tecniche biomolecolari al fine di poter disporre di un metodo più rapido di quelli tradizionali attualmente disponibili, utile per comprendere ed approfondire in tempo reale le dinamiche epidemiologiche attraverso le quali *Brucella* spp. si diffonde tra gli allevamenti e nel territorio.

## BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. Baily, G. C., J. B. Kraahn, B. S. Drasar, and N. G. Stoeker. 1992. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. J. Trop. Med. Hyg. 95:271-275.
3. Banai, M.I. Mayer, A. Cohen, Isolation, identification, and characterization in Israel of *Brucella melitensis* biovar 1 atypical strains susceptible to dyes and penicillin, indicating the evolution of a new variant, J. Clin. Microbiol. 28 (1990) 1057-1059
4. Bricker, B.J. S. M. Halling, Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR, J. Clin. Microbiol. 32 (1994) 2660-2666.
5. Corbel, M. J. Identification of dye-sensitive strains of *Brucella melitensis*, J. Clin. Microbiol. 29 (1991) 1066-1068
6. Cloeckaert, A., J. M. Verger, M. Grayon, O. Grepinet, Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer membrane proteins of *Brucella*, Microbiol. 141 (1995) 2111-2121.
7. Cremonesi, P., B. Castiglioni, G. Malferrari, I. Biunno, C. Vimercati, P. Moroni, S. Moranti, and M. Luzzana. 2006. Technical note: improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. J. Dairy Sci. 89:163-169.
8. Guarino, A., L. Serpe, G. Fusco, A. Scaramuzzo, and P. Gallo. 2000. Detection of *Brucella* species in buffalo whole blood by gene-specific PCR. Veterinary Record. 147:634-636.
9. Leal-Klevezas, D. S., I. O. Martinez-Vazquez, A. Lopez-Merino, and J. P. Martinez-Soriano. 1995. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. J. Clin. Microbiol. 33:3087-3090.
10. Marianelli, C. F. Ciuchini, M. Tarantino, P. Pasquali, R. Adone. Molecular characterization of the *rpoB* gene in *Brucella* species: new potential molecular markers for genotyping. Microbes and Infection. In Press
11. Romero, C., C. Gamazo, M. Pardo, and I. Lopez-Goni. 1995. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. J. Clin. Microbiol. 33:615-617.
12. Romero, C., and I. Lopez-Goni. 1999. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 65:3735-3737.
13. Vizcaino, J. M. Verger, M. Grayon, M. S. Zygmunt, A. Cloeckaert, DNA polymorphism at the *omp-31* locus of *Brucella* spp.: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers, Microbiol. 143 (1997) 2913-2921.