

**GENOTIPIZZAZIONE DI CEPPI DI BRACHYSPIRA  
HYODYSENTERIAE ISOLATI IN ITALIA ATTRAVERSO IL  
SEQUENZIAMENTO MULTILOCUS (MULTILOCUS SEQUENCE  
TYPING)**

**MULTILOCUS SEQUENCE TYPING ANALYSIS OF BRACHYSPIRA  
HYODYSENTERIAE ISOLATES FROM ITALIAN FARMS**

P. BONILAURI<sup>1</sup>, E. CARRA<sup>1</sup>, G. BIASI<sup>1</sup>, F. BERGAMINI<sup>1</sup>, F. CORPUS<sup>1</sup>,  
C.MAGISTRALI<sup>2</sup>, A. LUPPI<sup>1</sup>, Y. GHERPELLI<sup>1</sup>, G. RUGNA<sup>1</sup>, L. CUCCO<sup>2</sup>,  
M. DOTTORI M<sup>1</sup>, G. MERIALDI<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna IZSLER)

<sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Umbria e delle Marche (IZSUM)

**Parole chiave:** *Brachyspira hyodysenteriae*, MLST, Italia, Dissenteria emorragica, epidemiologia molecolare, sensibilità agli antimicrobici

**Key words:** *Brachyspira hyodysenteriae*, MLST, Italy, Swine dysentery Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibility

**Riassunto**

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di applicare la tipizzazione tramite Multilocus sequence typing (MLST) a 52 ceppi *Brachyspira hyodysenteriae* provenienti da 43 differenti aziende italiane localizzate in 14 province del Nord e del Centro Italia, isolati nel periodo di tempo compreso tra il 2003 ed il 2011. Per 47 di questi ceppi era noto il valore di Minima Concentrazione Inibente (MIC) nei confronti delle pleuromutiline tiamulina e valnemulina. MLST applicata a 7 loci (*adh*, *alp*, *est*, *gdh*, *glpK*, *pgm*, *thi*) di *B. hyodysenteriae* ha permesso di confrontare la realtà italiana con i 111 ceppi tipizzati utilizzando lo stesso metodo a livello mondiale. Dodici profili allelici (ST) sono stati individuati tra i ceppi italiani, di cui 11 nuovi e uno precedentemente descritto in ceppi isolati in Germania e Belgio. Un significativo allontanamento dell'equilibrio genetico è stato rilevato tramite il calcolo dell'indice di associazione  $I_A$ , confermando la struttura prevalentemente clonale delle popolazioni di ceppi di *B. hyodysenteriae*. I 12 ST individuati in Italia possono essere raggruppati in 4 gruppi clonali (Cc) e 2 ST restano come singolarità non raggruppabili. L'analisi di questi gruppi clonali nei confronti dei ceppi sequenziati a livello mondiale è dettagliata nel testo. Relativamente al profilo di suscettibilità alle pleuromutiline, nessun Cc permette di separare ceppi sensibili e ceppi a ridotta sensibilità in modo statisticamente significativo. Il protocollo di tipizzazione utilizzato è risultato particolarmente robusto e sufficientemente discriminatorio da poter essere utilizzato per lo studio della epidemiologia molecolare e della diversità dei ceppi di *B. hyodysenteriae* presenti sul territorio italiano.

**Summary**

The aim of this study was to apply the multilocus sequence typing (MSLT) scheme to 52 *Brachyspira hyodysenteriae* italian strains isolated between 2003 and 2011. The MIC value for pleuromulitins (tiamulin and valnemulin) was previously determined in

47 strains out of 52. Seven loci were sequenced (*adh*, *alp*, *est*, *gdh*, *glpK*, *pgm*, *thi*) and all the locus were kept in data analysis allowing the comparisons of the italian isolates with the 111 isolates in the PubMLST data base (<http://pubmlst.org>). Based on MLST results, the isolates were allocated in 12 sequence types (STs) of which 11 had not been reported before and one (ST52) was previously reported in PubMLST. Significant linkage disequilibrium was found ( $p < 0.000$ ) both considering number of isolates ( $I_a = 1.547$ ) and number of STs ( $I_a = 0.258$ ). Four Clonal complex (Cc) were individuated by BURST analysis, the possible association of these complexes with strain sequenced worldwide is reported in the text. No statistically significant association was observed with single STs or Cc and reduced sensitivity to pleromutins, although the majority (17 out of 26) of the strains with reduced susceptibility were classified in Cc2. This study confirms MLST as reliable tool for investigation of diversity of *B. hyodysenteriae* strains. The application of this method at farm level could lead to better understanding of the epidemiology of the infection, including sources and patterns of introduction, potentially providing support to more effective control and eradication strategies.

## INTRODUZIONE

*Brachyspira hyodysenteriae* (specie fortemente b emolitica) è agente eziologico della Dissenteria emorragica del suino (SD) (Taylor et al. 1971). Questa malattia enterica infettiva e trasmissibile, si manifesta prevalentemente nelle fasi di magronaggio ed ingrasso. Clinicamente è caratterizzata da una diarrea muco-emorragica che conduce i soggetti colpiti a perdita di peso, disidratazione e cachessia e, nei casi più gravi, può avere esito letale (Wannemueller, 1993). La comparsa di ceppi a ridotta sensibilità nei confronti di vari antimicrobici, fra cui le pleuromutiline tiamulina e valnemulina (Karlsson et al. 2004, Duinhof et al. 2008) considerate farmaci di elezione per la terapia della SD, è stata segnalata ovunque nel mondo. Anche in Italia questo fenomeno è stato descritto da tempo (Bonilauri et al. 2004, Merialdi et al. 2006, Magistrali et al. 2010). La tipizzazione molecolare di *Brachyspira hyodysenteriae*, finalizzata allo studio della sua epidemiologia, può aggiungere informazioni utili per determinare le vie di trasmissione di questi microrganismi e individuare possibili fonti di ceppi particolarmente pericolosi, data la loro ridotta sensibilità ai trattamenti antibatterici. Vari approcci sono stati utilizzati per tipizzare i ceppi di *B. hyodysenteriae*: dalla tipizzazione sierologica (Baum e Joens 1979), che risente della riconosciuta difficoltà di ottenere l'espressione degli antigeni lipopolisaccaridici in modo riproducibile, alla tipizzazione con differenti tecniche molecolari quali REA (DNA restriction endonuclease analysis), RAPDs (DNA Random amplification of polymorphism analysis), RFLP (DNA restriction fragment polymorphism analysis), PFGE (Pulsed field gel elettroforesis), MLEE (multilocus enzyme elettroforesis), MLVA (multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis) e, infine, MLST (multilocus sequence typing analysis) che più delle precedenti possiede elevato potere discriminatorio ed alta riproducibilità tra laboratori. Quest'ultima metodica permette di tipizzare i differenti ceppi batterici attraverso il sequenziamento di alcuni, di solito 5 o 7, loci genici e la loro classificazione in differenti alleli (Maiden et al. 1998; Chan et al. 2001). La composizione di ogni ceppo, rispetto alla presenza di un determinato allele in ognuno dei loci sequenziati, determina il suo profilo in modo univoco. Relativamente alla tipizzazione di *B. hyodysenteriae*, questa tecnica è stata descritta per la prima volta da Råsbäck et al. (2007) ed applicata su un numero notevole di ceppi di da La et al. (2009). Nessun ceppo italiano è stato tipizzato con questa

tecnica prima del presente studio.

Scopo del presente lavoro è quindi riportare i risultati dell'applicazione della MLST su ceppi italiani di cui era stato precedentemente determinata la sensibilità *in vitro* nei confronti delle pleuromutiline.

## MATERIALI E METODI

### *Ceppi*

Cinquantadue ceppi di *B. hyodysenteriae* sono stati raccolti da 43 differenti aziende italiane localizzate in 14 province del Nord e del Centro Italia, nel periodo di tempo compreso tra il 2003 ed il 2011. Per 47 di questi ceppi era stato precedentemente determinato il valore di Minima Concentrazione Inibente delle pleuromutiline (tiamulina e valnemulina). Sono stati classificati come ceppi a ridotta sensibilità quelli che presentavano MIC > 1 µg/ml nei confronti di almeno uno dei due farmaci. Tutti i ceppi, sono conservati congelati nella collezione batterica dell'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna. I ceppi italiani sono stati confrontati con i 111 ceppi attualmente presenti nella banca dati MLST pubblicata sul sito web PubMLST (<http://pubmlst.org/>) e precedentemente analizzati da La et al. (2009).

### *Estrazione DNA*

L'estrazione del cromosoma batterico è avvenuta tramite l'utilizzo del kit DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN GmbH, Germany) applicando il protocollo per batteri gram negativi. Un ml di sospensione batterica concentrata 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> Mcfarland è stato centrifugato a 5000 x g e dal pellet di cellule ottenuto è stata eseguita l'estrazione del cromosoma batterico.

### *Multilocus sequence typing*

Per ciascun ceppo sono stati sequenziati 7 degli 8 *locus* genici descritti da Råsbäck et al. (2007), codificanti rispettivamente per l'enzima alcool deidrogenasi (*adh*), fosfatasi alcalina (*alp*), esterasi (*est*), glutammato deidrogenasi (*gdh*), glucosio chinasi (*glpk*), fosfoglucomutasi (*pgm*), acetil-CoA acetiltransferasi (*thi*). Nelle reazioni di PCR sono stati impiegati i primers descritti da Råsbäck et al. (2007), tra di essi la sola coppia ADH-F206 e ADH-R757 per il locus *adh* e la coppia ALP- F354 e ALP-R1262 per il locus *alp*. Le reazioni di PCR sono state condotte in un volume finale di 30 µl impiegando la master mix GoTaq® Hot Start Colorless (Promega). In ogni set di campioni sottoposti ad amplificazione sono stati inclusi un controllo positivo rappresentato dal ceppo di campo di *Brachyspira hyodysenteriae* MO371/2011 e da acqua bidistillata come controllo negativo. Le condizioni di PCR impiegate erano quelle descritte da Råsbäck et al. (2007): 95°C per 2', seguito da 33 cicli a 95°C per 30", 50°C per 30", 72°C per 1', estensione finale di 2' a 72°C prima del raffreddamento a 4°C. I prodotti di PCR sono stati purificati mediante kit AgenCourt® Ampure® XP secondo le istruzioni previste dal produttore. Gli amplificati purificati sono stati sequenziati in accordo con le istruzioni del kit CEQ DTCS with Quick Start Kit Beckman Coulter (USA) mediante sequenziatore automatico CEQ 8000 Beckman Coulter (USA) impiegando gli stessi primers di PCR, ad eccezione del locus *pgm* per il quale la sequenza consensus è stata ottenuta dall'allineamento tra la sequenza ottenuta con il primer PGM-F172 e un primer di nuovo disegno PGM-F390 (5'-TATACTCCTATTTCATGGTTCCG-3'). I risultati grezzi sono stati analizzati mediante i moduli "Sequencing" e "Investigator" del software CEQ 8000 (versione 8.0) in dotazione con lo strumento.

Per ciascun locus genico è stato creato l'allineamento tra le sequenze ottenute e le rispettive sequenze del ceppo originale WA1 di *B. hyodysenteriae*, disponibile in PubMLST,

mediante l'applicazione di Clustal W del software BioEdit versione 7.08 ( Tom Hall, Ibis Biosciences). Impiegando lo stesso software, le sequenze allineate sono state accorciate alle dimensioni richieste dalla successiva analisi MLST a rispettivamente 345bp per il locus *adh* (nucleotide 303-647), 648bp per il locus *alp* (nucleotide 460-1107), 503 bp per il locus *est* (nucleotide 288-790), 415 bp per il locus *gdh* (nucleotide 634-1049), 687bp per il locus *glpk* (nucleotide 320-1006), 744bp per il locus *pgm* (nucleotide 297-1040) e 745bp per il gene *thi* (nucleotide 224-968).

### *Analisi dei dati genetici*

Le sequenze ottenute sono state confrontate con quanto disponibile in banca dati MLST (<http://pubmlst.org/analysis/>) per determinare la conformazione allelica di ciascun ceppo nei confronti dei 7 geni sequenziati. Ad ogni sequenza è stato attribuito un unico allele, identificato con un numero. Qualora siano stati sequenziati alleli con piccole differenze rispetto a quanto presente in banca dati a questi è stato *presuntivamente* assegnato il numero allelico più vicino a quello precedentemente depositato.

Il profilo allelico di ciascun ceppo è quindi rappresentato da una serie di 7 numeri corrispondenti al singolo allele ottenuto dall'analisi della sequenza dei 7 loci. Ad ogni ceppo è stato assegnato un numero (ST) dall'inglese *sequence type*. A differenti ceppi con il medesimo profilo allelico è stato assegnato il medesimo ST; in questo caso i due ceppi sono stati considerati identici. Le sequenze ottenute sono state inviate per l'inserimento in banca dati PubMLST sul sito ospitato dai server della Oxford University (<http://pubmlst.org/>); al termine delle procedure di controllo previste, alle sequenze mostranti piccole differenze rispetto a quanto precedentemente sequenziato a livello mondiale, potranno essere assegnati numeri allelici differenti.

Sulla base dei risultati ottenuti, ed in attesa della conferma dei ST da parte della banca dati PubMLST, i ceppi italiani sono stati rappresentati da un dendrogramma tramite il metodo UPGMA (unweighted-pair group method with allelic arithmetic means) utilizzando il sistema *bootstrap* con 1000 repliche attraverso il programma START2 (Jolley et al 2001). Gli isolati italiani sono stati raggruppati in complessi clonali (Cc) in modo che ogni ST combaci con almeno un altro ST nel gruppo in 5 o più loci tramite analisi BURST. Lo stesso criterio è stato utilizzato per ripetere l'analisi coinvolgendo tutti i ceppi disponibili in banca dati, usando la versione elettronica eBURST (Feil et al. 2004) disponibile all'interno del sopraccitato programma START2. Il tasso di disequilibrio della popolazione dei 52 ceppi italiani è stato stimato attraverso il calcolo dell'indice di Associazione ( $I_A$ ) utilizzando il metodo classico (Smith et al. 1993), sempre attraverso l'utilizzo del software START2.

## **RISULTATI**

I 52 ceppi di *B. hyodysenteriae* risultano distribuiti in 12 ST, di cui 11 nuovi e uno precedentemente descritto (ST52). La frequenza allelica per i 7 loci sequenziati, varia tra 6 per il gene THI e 2 per i geni ADH e EST. Il ST più rappresentato è il 76 che racchiude 16 ceppi al suo interno (30.8%), seguito dal ST 72 con 9 ceppi (17.3%), dal ST 52 con 8 ceppi (15.4%), dagli ST 69 e 74 con 5 ceppi (9.6%) ciascuno, dal ST 68 con 3 ceppi (5.8%) e da 6 ulteriori ST in cui cade un solo ceppo. Considerando il numero di ceppi l'indice di associazione ( $I_A$ ) risulta uguale a 1.547 mentre, considerando il numero di ST individuati, questo indice assume il valore di 0.258, con una distanza dall'equilibrio genetico statisticamente significativa ( $p < 0.000$ ) in entrambe le analisi.

Nella figura 1 è rappresentato il dendrogramma che mostra le relazioni ottenute tra i 52 ceppi italiani genotipizzati. Tramite analisi BURST, i 12 differenti ST individuati sono suddivisi in tutto in 4 gruppi clonali da cui rimangono esclusi 4 ceppi riportanti i profili ST68 (3 ceppi) e ST75 (1 ceppo), che appaiono come singolarità..

Per 6 aziende erano disponibili ceppi isolati in differenti campionamenti successivi, in particolar modo in una azienda erano presenti 4 ceppi raccolti tra il 2006 ed il 2011 e tutti questi ceppi sono stati tipizzati come ST76. Analogamente, 3 ceppi provenienti da un'altra azienda, di cui 2 isolati 2010 e 1 nel 2011, sono risultati tutti ST 52. In altre 2 aziende erano disponibili 2 ceppi isolati entrambi nel 2006, nel primo caso, ed entrambi nel 2009 nel secondo caso, a distanza di pochi mesi l'uno dall'altro. Anche per queste 2 aziende, lo stesso ST è stato rilevato in queste analisi ripetute. In 1 caso, 2 ceppi isolati nel medesimo anno, 2006, dalla stessa azienda, hanno mostrato profili allelici differenti, ST77 e ST74. Questi due ceppi, vengono comunque raggruppati all'interno dello stesso gruppo clonale, per cui è presumibile che siano strettamente imparentati tra loro. Infine, in una azienda dove sono stati tipizzati 2 ceppi a distanza di un anno l'uno dall'altro, i due ceppi pur avendo lo stesso profilo allelico (ST76), hanno mostrato differente sensibilità alle pleuromutiline.

Relativamente ai profili di sensibilità alle pleuromutiline, nessun gruppo clonale individuato permette di separare ceppi sensibili da ceppi a ridotta sensibilità in maniera statisticamente significativa, anche se all'interno del Cc2, ricadono la maggior parte (17/26) dei ceppi con MIC>1 mcg/ml per almeno una tra tiamulina e valnemulina. Nel Cc2 ricadono comunque anche 5 ceppi sensibili ad entrambi i farmaci. Singolarmente, tutti e 5 questi ceppi sensibili ad entrambe le molecole, ricadono nel ST76 (ST più rappresentato del gruppo), mentre gli altri 3 ST presenti nel gruppo, ST77 (un ceppo), ST74(5 ceppi) sono risultati tutti a ridotta sensibilità per almeno una delle due molecole. Relativamente alla distribuzione geografica dei ceppi tipizzati, non è possibile rilevare nessuna relazione spaziale associabile ai differenti ST od ai differenti Cc.

Nella tabella 2 è riportata la distribuzione dei ceppi italiani tipizzati sulla base di quanto descritto.

Ripetendo l'analisi di BURST considerando oltre ai 52 ceppi italiani sequenziati i 111 ceppi attualmente presenti nella banca dati MLST (<http://pubmlst.org/>) e precedentemente analizzati da La et al. (2009), si ottengono 11 Cc cui si aggiungono 13 singolarità non raggruppabili (figura 2). Il gruppo clonale più grande è il Cc 9 che racchiude al suo interno 22 ST (32 ceppi) ed in questo gruppo ricadono esclusivamente ceppi australiani. A questo segue per numerosità il Cc 1 con 17 ST (43 ceppi) in cui ricadono sia ceppi isolati in Europa (Germania, Belgio e Italia) e che tra di loro formano un sotto-raggruppamento (ST51,52,70 e 71), sia ceppi di origine Australiana e Nord Americana, che a loro volta formano un sotto- raggruppamento. Il Cc2 racchiude al suo interno ceppi italiani (ST74, 76 e 77) strettamente imparentati con un ceppo di provenienza del Regno Unito (ST10) isolato nel 1970. I 6 ceppi raggruppati nel Cc4 dall'analisi dei soli ceppi italiani vengono accomunati ad un ceppo di origine Canadese isolato nel 1989 dall'analisi comprensiva di tutti i ceppi attualmente sequenziati. I 3 ceppi ST68, classificati come singolarità nell'analisi di BURST ottenuta confrontando i soli ceppi italiani, vengono raggruppati con un isolato in Svezia nel 2003, mentre il ceppo ST75 resta una singolarità anche confrontato con tutti i ceppi attualmente disponibili in banca dati.

**Tabella 1:** Ceppi di *Brachyspira hyodysenteriae* tipizzati tramite MSLT, con il numero identificativo (ID), l'origine aziendale (Origin), l'anno di isolamento (year), il gruppo clonale di appartenenza (Cc), il profilo allelico, sequence type (ST) e la sensibilità alle pleuromutiline.

**Table 1:** *Brachyspira hyodysenteriae* strain number (ID), origin, province of farm location, year of strain isolation, Clonal complex, sequence type and pleuromutilins susceptibility.

ID	Origin	Province	year	Cc	ST	pleuromutilins susceptibility <sup>a</sup>
155	Farm17	lo	2006	1	70	s
30i	Farm28	pg	2005	1	52	s
293	Farm29	pg	2009	1	52	r
157	Farm30	pz	2006	1	71	s
158	Farm34	re	2006	1	52	s
145	Farm39	si	2006	1	52	nd
247	Farm7	cn	2011	1	52	r
248	Farm8	cn	2011	1	52	r
310	Farm8	cn	2010	1	52	s
318	Farm8	cn	2010	1	52	s
295	Farm1	//	2009	2	76	r
297	Farm1	//	2009	2	76	r
110i	Farm10	cr	2008	2	76	s
245	Farm14	cr	2011	2	76	r
271	Farm15	cr	2009	2	76	s
338	Farm15	cr	2010	2	76	r
150	Farm20	mn	2006	2	77	r
153	Farm20	mn	2006	2	74	r
156	Farm21	mn	2008	2	76	r
156m	Farm26	mo	2006	2	76	s
254	Farm26	mo	2011	2	76	r
257	Farm26	mo	2011	2	76	r
259	Farm26	mo	2011	2	76	r
302	Farm27	no	2010	2	76	r
136	Farm3	bs	2008	2	76	s
151	Farm33	re	2006	2	74	r
152	Farm33	re	2006	2	74	r
244	Farm37	re	2011	2	76	r
nc1	Farm38	re	2011	2	76	r
159	Farm41	mn	2006	2	74	r
166	Farm43	re	2006	2	74	r
96i	Farm9	cr	2008	2	76	s
108i	Farm19	mn	2008	3	72	s
128	Farm11	cr	2008	3	72	s
137	Farm12	cr	2005	3	73	nd
143	Farm31	re	2006	3	72	s
148	Farm4	bs	2006	3	72	s
169	Farm35	re	2003	3	72	nd
170	Farm23	mn	2003	3	72	r
172	Farm36	re	2003	3	72	s
232	Farm2	bg	2009	3	72	nd
246	Farm16	fe	2011	3	72	r
135	Farm40	vr	2005	4	69	nd
154	Farm25	mo	2006	4	69	r
160	Farm18	lo	2006	4	69	r
161	Farm42	mo	2006	4	69	r
167	Farm22	mn	2003	4	69	s
240	Farm13	cr	2009	4	78	s
146	Farm32	re	2006	s1	68	s
190	Farm24	mn	2009	s1	68	s
203	Farm5	bs	2009	s1	68	s
243	Farm6	bs	2011	s2	75	r

Lo stesso gruppo clonale è stato evidenziato con la stessa tonalità di grigio.

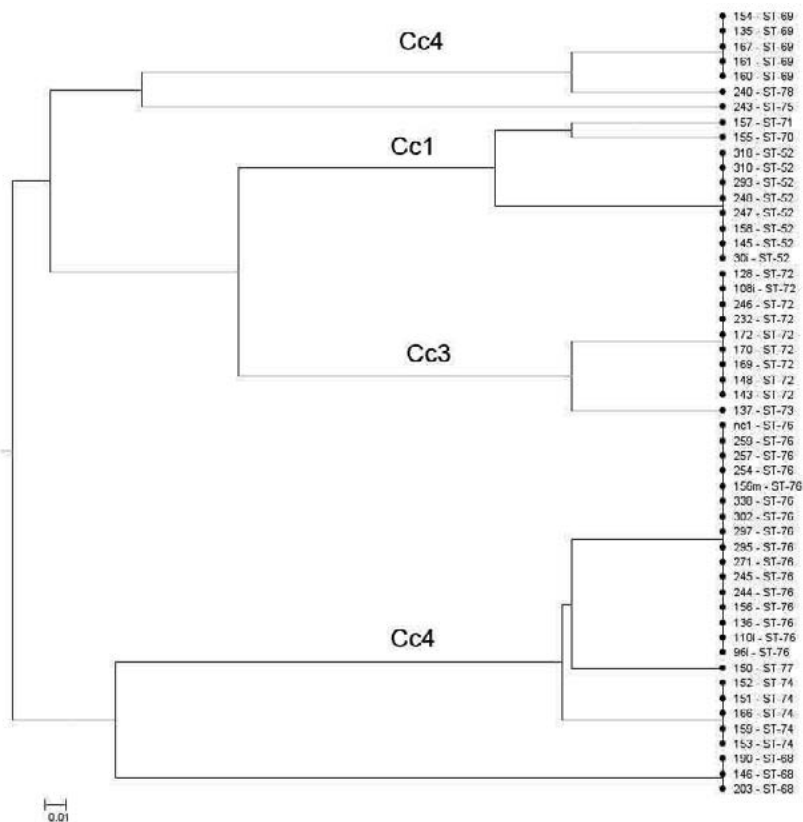
<sup>a</sup>Suscettibilità alle pleuromutiline: la sigla r indica i ceppi a ridotta sensibilità (MIC >1 mg/ml) per almeno una tra tiamulina e valnemulina, la sigla s i ceppi con MIC <1mg/ml ad entrambi i farmaci, la sigla nd sta per “non determinato”.

All strain in the same clonal complex are highlighted with the same background shade in grey scale.

<sup>a</sup> Pleuromutilins susceptibility: r stands for strains with reduced sensitivity (MIC >1 mg/ml for at least one between tiamulin and valnemulin), s stands for susceptible strains (MIC <1mg/ml for both drugs), nd stands for “not determined”

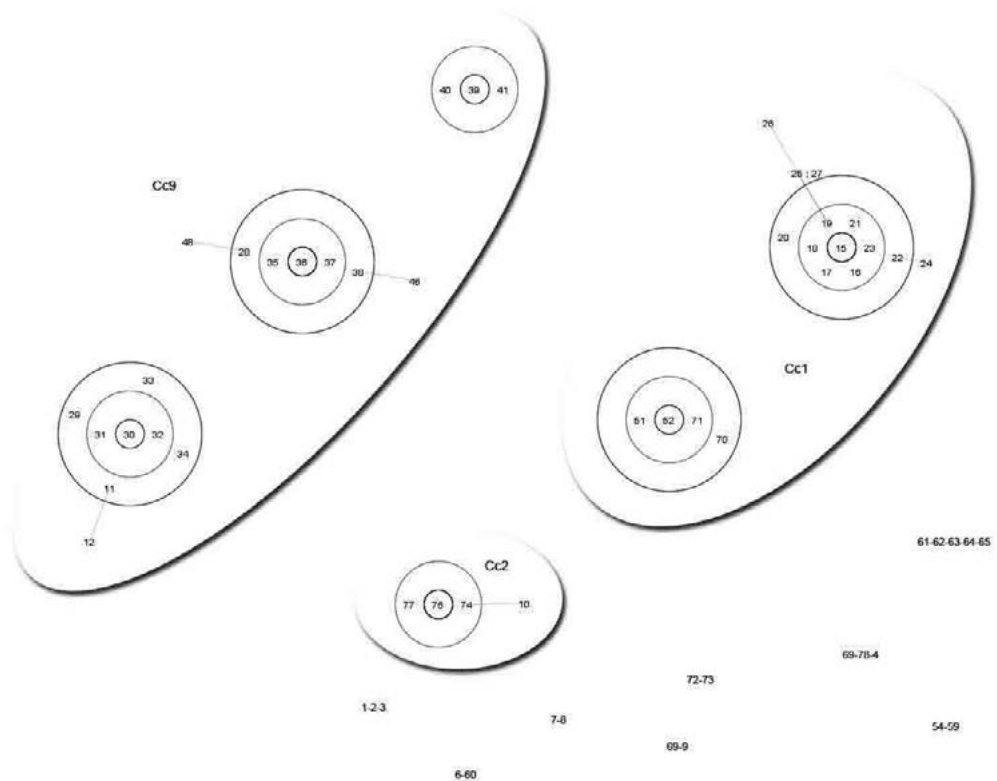
**Figura 1:** dendrogramma basato sul profilo allelico dei 52 ceppi italiani sequenziati. Il metodo utilizzando per la costruzione dell’albero è UPGMA (unweighted-pair group method with allelic arithmetic means) la cui robustezza è stata testata tramite *bootstrap* con 1000 repliche attraverso il programma START2 (Jolley et al 2001). Cc1, 2,3,4 rappresentano i gruppi clonali individuati dall’analisi BURST (ogni ST deve combaciare con almeno un altro ST nel gruppo in 5 o più loci) che classifica come singolarità i 4 ceppi riportanti profilo allelico ST 68 e ST 78.

**Figure 1:** Dendrogram generated using UPGMA (unweighted-pair group method with allelic arithmetic means) methods, from combined individual distance matrices of sequence from seven loci *adh*, *est*, *gdh*, *glpK*, *pgm* e *thi* in 52 Italian strains of *Brachyspira hyodysenteriae* divided in 12 Sequence type (ST). The clonal complex (Cc) individuated in the present study is reported on the top of the branch line of the STs.



**Figura 2:** 11 Gruppi clonali rappresentanti 65 ST ottenuti da 163 ceppi di *B. hyodysenteriae* di cui 52 italiani (questo studio) e 111 ceppi presenti in banca dati PubMLST (<http://pubmlst.org/>), tramite analisi BURST (ogni ST deve combaciare con almeno un altro ST nel gruppo in 5 o più loci) usando la versione elettronica eBURST (Feil et al. 2004) disponibile all'interno del programma START2. A questi raggruppamenti, vanno aggiunti 13 ST (1 ST italiano) classificati come singolarità dall'analisi.

**Figure 2:** Population snapshot obtained with eBURST (Feil et al. 2004) using nucleotide sequence at seven loci, with 163 *B. hyodysenteriae* strain divided in 65STs (11 STs belong to Italian strain, only). Clonal complexes are grouped if ST matches at least one other ST in group at 5 or more loci. 13 STs (1 ST belong to Italian strain) are classified as singletons by the analysis and not represented in this picture.



## DISCUSSIONE

In questo lavoro, vengono per la prima volta genotipizzati isolati di *B. hyodysenteriae* di provenienza italiana tramite *multilocus sequence typing* (MLST). Il numero di ceppi sequenziati è rilevante e permette di arricchire la banca dati attualmente disponibile, costituita in tutto da 111 ceppi, cui si aggiungeranno i 52 ceppi italiani sequenziati in questo studio. Di fatto dopo i ceppi Australiani, che rappresentano la maggior parte dei ceppi caratterizzati fino ad ora (82 su 111), i ceppi italiani risultano essere i più genotipizzati.

Tra i ceppi italiani sono stati individuati 12 profili allelici (ST) di cui 11 nuovi e uno già



precedentemente rilevato e presente in banca dati PubMLST (<http://pubmlst.org/>). I 12 profili allelici (ST) sono raggruppati in 4 gruppi clonali oltre a due profili ST classificati come singolarità dall'analisi di BURST. Confrontando i ceppi italiani con tutti i ceppi presenti in banca dati, quelli che erano raggruppati all'interno del Cc1, vengono accomunati a ceppi isolati in Germania e Belgio fin dagli anni '90 e potrebbero costituire ceppi di antica introduzione ancora circolanti sul territorio italiano. Il Cc2, numericamente più rappresentato tra i ceppi italiani, trova come unico ceppo a loro accumulabile un ceppo isolato negli anni '70 nel Regno Unito. Questo ceppo potrebbe essere arrivato nel nostro Paese con l'importazione di genetiche inglesi e da esso potrebbero essersi evoluti i ceppi attualmente raggruppabili nel Cc2 italiano. Il Cc3, individuato in questo studio, non trova nessuna connessione con il resto dei ceppi presenti in banca dati e potrebbe rappresentare un complesso clonale di ceppi soltanto italiani. Il Cc4, trova una singolare connessione con un ceppo isolato in Canada nel 1989.

Il primo dei profili identificati come singolarità (ST68) dall'analisi di BURST tra i ceppi italiani, viene accomunato a due ceppi svedesi isolati nel 2003, mentre il secondo profilo classificato come singolarità (ST75) resta tale anche se confrontato con tutti i ceppi mondiali presenti in banca dati. Questo ceppo proviene da una azienda del Nord Italia, localizzata in una provincia ad alta densità suinicola ed è resistente alle pleuromutiline. Seguire la diffusione di questo particolare ST, potrebbe rivelarsi utile al fine di individuarne la possibile origine e suggerirne eventuale opzioni di gestione e controllo.

Queste osservazioni devono tenere conto del fatto che la numerosità dei ceppi europei contenuti in banca dati è ancora molto ridotta. Questa stessa tecnica è stata di recente applicata anche in Spagna (Osorio et al. 2010) ma i ceppi Spagnoli non risultano purtroppo depositati in banca dati. Un numero maggiore di ceppi genotizzati tramite MLST sarà necessario per meglio chiarire le relazioni geografiche tra i ceppi di *B. hyodysenteriae* europei

I 52 ceppi italiani presentano un indice di associazione significativamente differente da zero, il che impone un significativo allontanamento di questi ceppi dall'equilibrio genetico (Equilibrio di Hardy-Weinberg). Popolazioni di questo genere sono popolazioni definite clonali (Smith et al. 1993). Questo risultato conferma quanto ottenuto da La et al. (2009) applicando la metodica MSLT e contrasta invece con quanto precedentemente ottenuto con l'elettroforesi delle proteine enzimatiche, MLEE, (Trott et al. 1997), sulla base della quale le popolazioni di *B. hyodysenteriae* erano state descritte come popolazioni ricombinanti con una struttura di popolazione epidemica. Quanto osservato da Trott et al. (1997), si osserva quando si hanno elevati scambi genetici tra i ceppi che comunque permettono l'affermarsi di gruppi clonali, sotto l'azione di una qualche pressione selettiva. Anche ripetendo l'analisi del calcolo dell'indice di associazione su tutti i ceppi tipizzati tramite MLST a livello mondiale (111 ceppi della banca dati cui si sommano i 52 ceppi italiani), il risultato da noi ottenutosi conferma con un  $I_A$  significativamente differente da 0 (dati non mostrati). Considerando anche i ceppi italiani di questo studio, il numero totale di ceppi tipizzati con MLST è attualmente 163, un numero minore di quanti analizzati tramite MLEE (231), anche se con una tecnica in possesso di un potere discriminante maggiore (La et al. 2009). Il differente numero di ceppi può spiegare la differente classificazione delle popolazioni ottenute a seconda del metodo di genotipizzazione utilizzato, per cui la tipizzazione di un maggior numero di ceppi sarà necessaria per meglio classificare le popolazioni batteriche di *B. hyodysenteriae*. Va però considerato, che la differente tecnica utilizzata potrebbe comunque comportare differenti risultati considerato che, mentre la MLEE confronta l'espressione fenotipica delle informazioni contenute nel cromosoma batterico, la MLST caratterizza i ceppi in base alle sequenze di DNA. E' noto infatti che il codice genetico del DNA risulta essere degenerato

per cui non tutte le mutazioni nella sequenza genetica si traducono in un cambiamento nella proteina tradotta (fenotipo). Per tale motivo la MLST risulta essere una tecnica che risente meno della MLEE della selezione naturale tendente ad operare in modo selettivo sui fenotipi ed in modo più neutro sui genotipi. L'utilizzo di un indicatore neutro alla selezione è condizione indispensabile per una corretta misurazione dell'equilibrio genetico di una popolazione (Li et al. 1988).

Studi effettuati su ceppi appartenenti alla medesima azienda ed isolati in anni differenti, testimoniano l'esistenza di una pressione selettiva che può portare all'affermarsi di un ceppo aziendale che nel tempo può essere soppiantato da un altro ceppo derivante dal primo per fenomeni "micro-evolutivi" (Atyeo et al 1999, La et al. 2009). Quindi l'apparente stabilità genetica individuata nella popolazione di ceppi di *B. hyodysenteriae* può essere spiegata con l'affermarsi di un numero non elevato di cloni che risultano selettivamente avvantaggiati e che si mantengono tali all'interno degli allevamenti Italiani. In cinque su 6 casi in cui erano disponibili sequenze ripetute sulla medesima azienda in lo stesso ST è stato rilevato negli anni, in un caso anche in un arco di 5 anni tra il primo e l'ultimo isolato tipizzato. Soltanto in una azienda, i ceppi isolati hanno mostrato ST differenti, che però risultano associati tra loro nel medesimo gruppo clonale, per cui potrebbero rappresentare un esempio di micro-evoluzione all'interno dello stesso allevamento (Atyeo et al 1999).

E' ragionevole ipotizzare che i trattamenti antibiotici possano fungere da pressione selettiva nei confronti dei ceppi presenti in allevamento, anche se il profilo di suscettibilità agli antibiotici non permette di differenziare i gruppi clonali individuati in questo studio. Infatti in ognuno dei gruppi clonali ottenuti, ricadono sia ceppi pienamente sensibili sia ceppi a ridotta sensibilità per le pleuromutiline, anche se nel Cc2 ricadono numericamente la maggior parte dei ceppi con MIC > 1 µg/ml (17 su 26) ad almeno un farmaco tra tiamulina e valnemulina. Un numero maggiore di ceppi tipizzati tramite MSLT e parallelamente testati per la sensibilità *in vitro* permetterà forse di individuare con maggior dettaglio il ruolo esercitato da questo importante fattore che, comunque, non può essere ritenuto l'unico agente selettivo nei confronti delle popolazioni batteriche. Altri fattori, quali ad esempio la genetica, la provenienze degli animali, la gestione dei flussi e della biosicurezza, devono essere considerati in un più ampio studio volto ad individuare eventuali fattori favorevoli all'istaurarsi di un determinato gruppo clonale all'interno di una tipologia di allevamento.

La metodica MLST si conferma come un importante strumento per la tipizzazione molecolare dei ceppi di *B. hyodysenteriae* circolanti sul territorio nazionale. Una sua applicazione su vasta scala potrebbe consentire di individuare vie epidemiologiche di diffusione di determinati ST tra gli allevamenti, offrendo opzioni di gestione nei confronti di questa importante problematica ancora molto presente sul territorio nazionale.

## **BIBLIOGRAFIA**

Atyeo, R.F., Oxberry, S.L., Hampson, D.J., 1999. Analysis of *Serpulina hyodysenteriae* strain variation and its molecular epidemiology using pulsed-field gel electrophoresis. *Epidemiol. Infect.* 123, 133–138.

bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 4384–4388.

Baum, D.H., Joens, L.A., 1979. Serotypes of beta-haemolytic *Treponema hyodysenteriae*. *Infect. Immun.* 25, 792–796

Bonilauri P., Merialdi G., Calzolari M., Luppi A., Dottori M. Incremento del riscontro di ceppi multiresistenti di *Brachyspira hyodysenteriae* in allevamenti suini del nord Italia. 2004. Atti del XXX convegno della Società di Patologia ed Allevamento dei Suini. Salsomaggiore Terme (PR) 25-26 Marzo 2004, 181-186.

Chan M-S, Maiden, MCJ, Spratt D.(2001). Database-driven multi locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens. *Bioinformatics* 17:1077-1083.

Feil, E.J., Li, B.C., Aanensen, D.M., Hanage, W.P., Spratt, B.G., 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J. Bacteriol.* 186, 1518–1530

Jolley, K.A., Feil, E.J., Chan, M.S., Maiden, M.C., 2001. Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics* 17, 1230–1231.

La T, Phillips ND, Harland BL, Wanchanthuek P, Bellgard MI, Hampson DJ. (2009). Multilocus sequence typing as a tool for studying the molecular epidemiology and population structure of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Veterinary Microbiology* 138: 330-338

Li CC (1988) Pseudo-random mating populations. In celebration of the 80th anniversary of the Hardy-Weinberg law. *Genetics* 119:731-737.

Magistrali C.F., Cucco L., D’Avino N., D’Angelo G., GherPELLI Y., Bonilauri P., Merialdi G. - Valutazione della sensibilità ad antimicrobici di *B.hyodysenteriae*: confronto tra due metodi. Atti XXXVI Meeting Annuale Società Italiana di Patologia ed allevamento dei suini, 25-26 Marzo 2010, Montichiari (BS), pp337-340

Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russel JE, Urwin R. Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Faeviers IM, Achtman M, Stratt BG (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3140-3145.

Merialdi G., P Bonilauri, M Dottori. Presence of tiamulin and valnemulin resistant *B. hyodysenteriae* strains in Italian pig herds. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, 2006-Volume 2: p 455

Osorio J., Carvajal A., Hidalgo A., Argüello H., Naharro G., Rubio R., Hampson DJ. 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada 2010-Volume 2: p 418

Råsbäck, T., Johansson, K.-E., Jansson, D.S., Fellström, C., Alikhani, Y., La, T., Dunn, D.S., Hampson, D.J., 2007. Development of a multilocus sequence typing scheme for intestinal spirochaetes of the genus *Brachyspira*. *Microbiology* 153, 4074–4087.

Smith, N.H., O’Rourke, M., Spratt, B.G., 1993. How clonal are bacteria? *PNAS* May 15, 1993 vol. 90 no. 10 4384-4388.

Taylor D.J., Alexander T.J.L. (1971) “The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete”. *Br. Vet. J.*, 127, 58-61.

Wannemueler M.J. (1993) “Entèrite hèmorragique du porc: depistage et ètude clinique”. *Rec. Med. Vet.*, 169 (8/9), 703-707