

MALATTIE TRASMESSE DA VETTORI: RICKETTSIE ED ALTRI BATTERI INTRACELLULARI NEGLI ANIMALI E NELL'UOMO

***Coxiella burnetii*: diagnostica di laboratorio**

Roma, 3 Ottobre 2017

Giulia Barlozzari, DVM, PhD
Direzione Operativa Sierologia



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

DIAGNOSI

greco antico *διαγιγνώσκειν*

formato da *διά* (**attraverso**) + *γιγνώσκειν* (**conoscere**)



processo articolato attraverso il quale indaghiamo le **cause di una malattia**



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Conoscere attraverso cosa?

☐ Dati epidemiologici/anamnestici

☐ Aspetti clinici

☐ Esami di laboratorio

☐ Diagnostica per immagini

- Valido per l'uomo e per tutte le specie animali!



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

aspetti ugualmente importanti interconnessi tra di loro

**La mancanza di uno di essi può ritardare o pregiudicare il
processo diagnostico**

Particolarmente importante per malattie sostenute da batteri
intracellulari obbligati

-subdole e poco conosciute



❑ dati epidemiologici ed anamnestici

se non conosciamo la diffusione di agenti patogeni in un territorio o se mancano informazioni relative a spostamenti, storia clinica dei pazienti umani ed animali

Non possiamo sospettare una malattia



□ Aspetti clinici

Se non conosciamo sintomi e decorso (acuto, cronico, autolimitante, asintomatico)

Non possiamo indirizzarci verso alcune malattie
sintomi spesso aspecifici



❑ Esami di laboratorio

Se non evidenziamo alterazioni clinicopatologiche,
sieroconversione o l'agente patogeno

Non possiamo confermare la diagnosi clinica

Senza sintomi e lesioni compatibili le metodiche dirette non
sono diagnostiche di malattia infettiva ma solo di infezione



❑ Diagnostica per immagini

Se non evidenziamo lesioni d'organo o alterazioni compatibili con dati epidemiologici/anamnestici, sospetto clinico ed esami di laboratorio

non possiamo confermare la nostra diagnosi



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Diagnosi di Febbre Q nell'uomo



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Uomo forma acuta e cronica

❑ Dati epidemiologici/anamnestici

- Professioni che comportano contatto diretto o indiretto con gli animali: veterinari, macellai, operatori dei macelli, allevatori, personale di laboratorio
- Vivere in aree rurali o nel raggio di 16 km circa rispetto ad allevamenti ovicaprini o bovini
- Viaggi recenti in aree rurali o aree nelle quali si sono verificati focolai

(Recommendations from CDC and the Q Fever Working Group 2013)



- Contatto sessuale con pazienti con infezioni recenti da febbre Q o contatto con indumenti contaminati o fomiti
- Contatti ravvicinati con pazienti diagnosticati per febbre Q in persone con sintomi compatibili
- Precedente forma acuta in persone con sintomi compatibili con forma cronica soprattutto se presenti fattori predisponenti (valvulopatie, protesi vascolari o aneurismi, immunocompromissione o stato di gravidanza)

(Recommendations from CDC and the Q Fever Working Group 2013)



❑ Aspetti clinici

La diagnosi clinica è difficile nella maggior parte dei casi

Forma acuta

Adulti:

- febbre prolungata (>10 gg)
- normale conta leucocitaria
- trombocitopenia
- aumento degli enzimi epatici.

Bambini:

- forme acute più lievi degli adulti
- rash cutaneo nel 50% dei casi

Forma cronica

Adulti:

- endocardite
- epatite cronica
- infezioni vascolari croniche
- osteoartrite
- osteomielite
- infezioni polmonari croniche



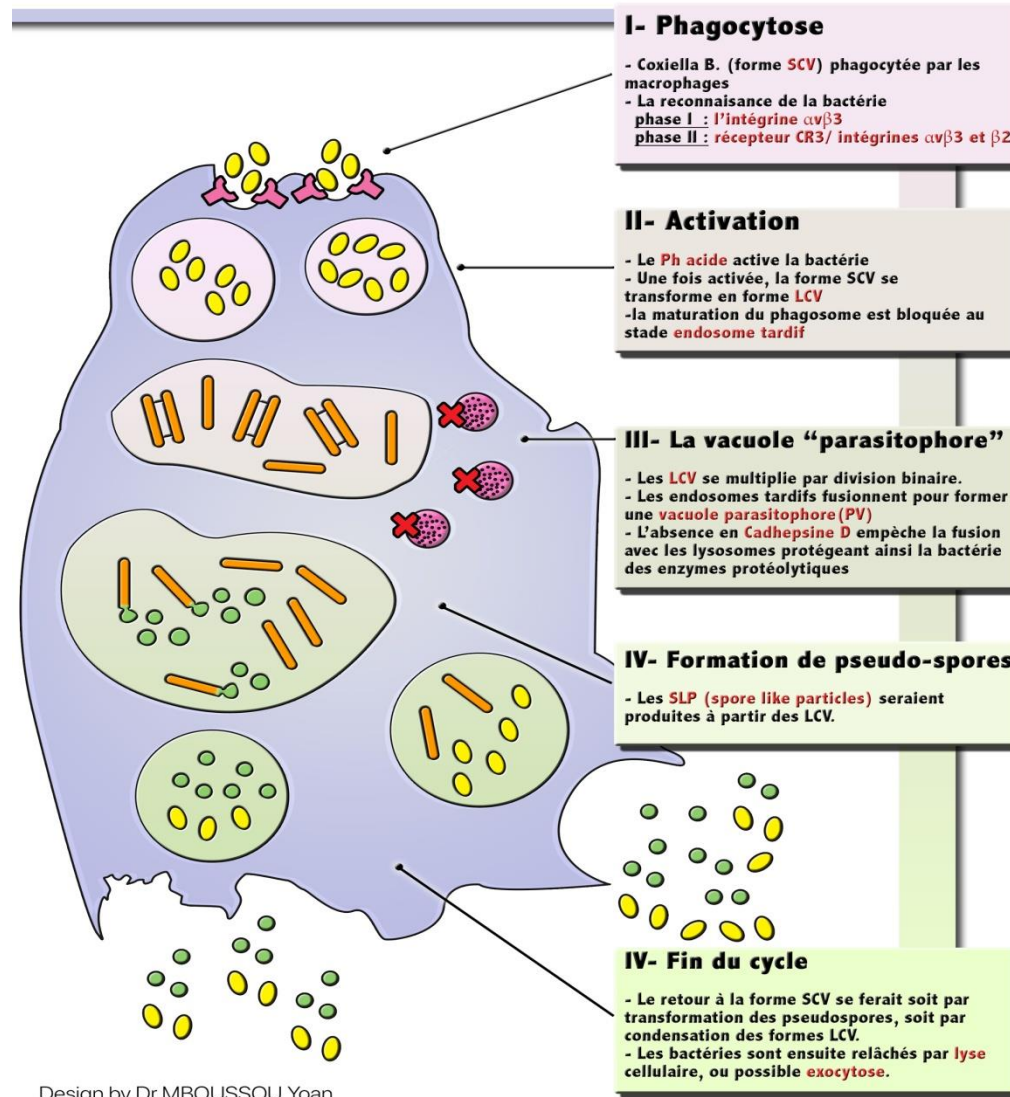
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

□ Esami di laboratorio

- **diagnosi di laboratorio nell'uomo basata su sierologia**
- **IFA** test di riferimento
- **IFA** utilizzata per differenziare **forme acute e croniche**



CYCLE DE DEVELOPPEMENT



Design by Dr MBOUSSOU Yoan



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Forma acuta

Alti titoli IgG verso gli antigeni di fase II e bassi titoli verso gli antigeni di fase I



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

IgM anti antigeni di fase II prime a comparire, raggiungono titoli massimi in 14 gg dall'inizio dei sintomi e persistono per 10-12 settimane (Maurin and Raoult, 1999)

IgM anti antigeni di fase I sono generalmente a titoli più bassi titoli durante la fase acuta

IgG anti antigeni di fase II compaiono dopo 14-21gg (quasi simultaneamente alle IgM) e raggiungono titoli massimi dopo 8 settimane dall'inizio dei sintomi

IgM da sole hanno un **valore diagnostico limitatato** in quanto persistono per più di 1 anno e sono poco specifiche (cross reattività con *Legionella*)



Elementi indicativi di forma acuta

- **Sieroconversione o aumento di 4 volte nel titolo** tra siero di fase acuta e siero convalescente
- Analisi simultanea in IFAT del siero della fase acuta (conservato a -20°C) e del siero convalescente presso lo stesso laboratorio aumenta affidabilità risultati (variabilità inter-test ed inter-laboratorio)
- **Elevati livelli IgG ($>1/200$) e IgM ($>1/25$) verso la fase II** in un solo campione di siero convalescente indicano infezione recente in un paziente malato da più di una settimana indica probabile infezione



Da ricordare

- **titoli IgG e IgM verso antigeni di fase I** possono continuare a **salire** (senza superare titoli anti fase II) in campioni successivi in caso di **trattamento o malattia autolimitante**
- La **sierologia** può essere utilizzata nel **follow up** di pazienti con forma acuta per determinare **l'efficacia del trattamento** (Angelakis et al 2010)



IMPORTANTE

Per la diagnosi di certezza di febbre Q in forma acuta raccomandata

IFAT + PCR

PCR su sangue intero o siero può essere **positiva in fasi precoci** ma **si negativizza** con **aumento del titolo anticorpale** e con la somministrazione di **antibiotici**



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Forma cronica

(persistenza degli organismi)

Titoli IgG verso antigeni di fase I e fase II sono entrambi alti
(i titoli IgG verso gli antigeni di fase I sono generalmente piu'alti di quelli verso gli antigeni di fase II)



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Da ricordare

presenza di **titoli IgA verso antigeni di fase I** è associata anche se non esclusivamente alle **infezioni croniche**

Alti titoli IgG (1/800) e/o IgA (>1/50) verso antigeni di fase I nelle forme croniche



il materiale infetto deve essere maneggiato in laboratori di classe III!



❑ Esami di laboratorio

Isolamento:

- micro-colture cellulari (shell-vial cell culture) adatto a tutti i patogeni strettamente intracellulari, inclusa *C. burnetii*
- uova embrionate
- cavie e topi abbandonate (elevato livello di rischio per operatore, motivi etici)

Animali da laboratorio utili per isolare ***Coxiella*** da **campioni contaminati da più specie batteriche**



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

The shell vial technique

Metodo sviluppato per diagnostica umana, ma ha dato buoni risultati anche nell'applicazione veterinaria



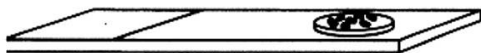
Inoculazione di 1ml di campione

Centrifugazione a 700 g per 1h a 20°C per aumentare infezione del monostrato

coprioggetto con monostrato cellulare

Incubare a 37°C, 5% CO₂ per 5 -7gg

Colorare con Gimenez o anticorpi fluorescenti



Montare coprioggetto su vetrino osservare

Linee cellulari più utilizzate:

HEL (human erythroleukemia cell line)

DH82 (dog malignant histiocytosis)

Vero (cellule epiteliali renali di scimmia)

Possibilità di isolamento di *C. burnetii* da diverse matrici anche da campioni conservati a - 80°C



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Coltura axenica

ACCM2 2 (cell-free medium acidified citrate cysteine medium 2)

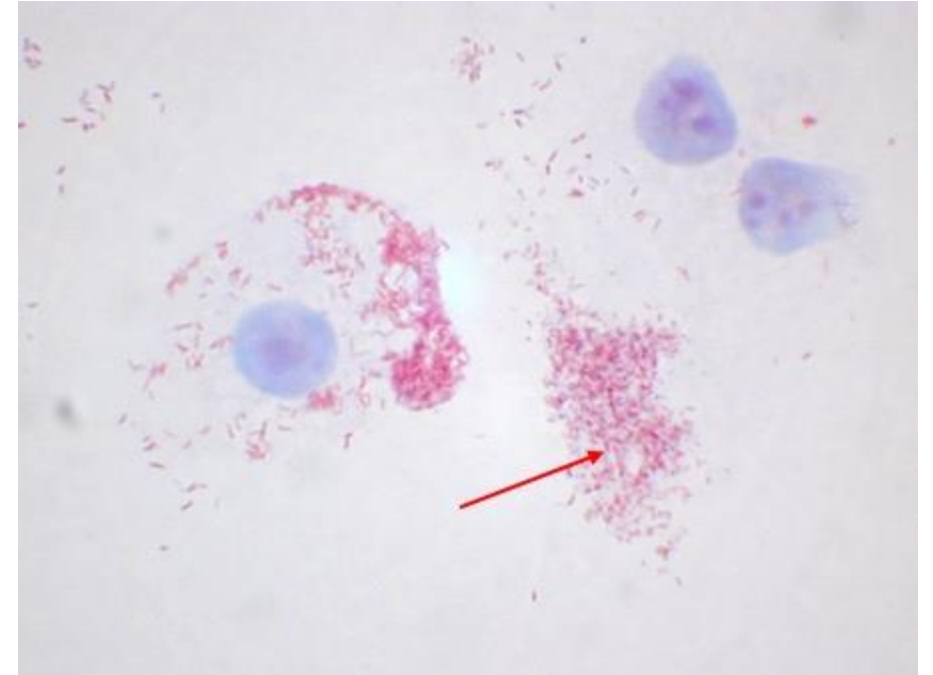
C. burnetii recentemente isolata in coltura axenica da un campione clinico di valvola cardiaca (Boden et al., 2015)

C. burnetii è stata incubata in 20 ml of ACCM2 per 6-8 gg. La coltura liquida è stata poi inoculata in piastra di ACCM2 agar. Diverse colonie di *C. burnetii* sono state isolate al 5° giorno

Questo potrà facilitare **l'isolamento dei ceppi *C. burnetii* da campioni clinici e l'ottenimento di DNA di alta qualità per il sequenziamento (coltura axenica)**

Colorazioni

- Gimenez, Stamp, Macchiavello e Koster modificata
- bassa specificità possibile errore con *Chlamydophila abortus* o *Brucella* spp.



Gimenez staining on L929 cell lines culture. Note the high number of small bacteria in the cytoplasm of L929 cells.



PCR o Real-time PCR

Forme acute

- sangue intero, buffy-coat o siero
- sangue intero > concentrazione di DNA di *C. burnetii*
- siero meno sostanze inibenti PCR
- per risultati PCR affidabili :
prelievo **campione in fase acuta**
(15gg da inizio sintomi) e **prima**
dell'inizio della **terapia antibiotica**
(max entro 24-48 ore)

Forme croniche

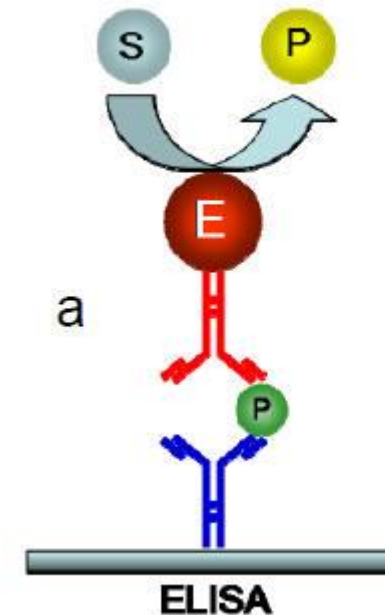
- campioni tissutali
(materiale valvolare,
biopsie ossee)



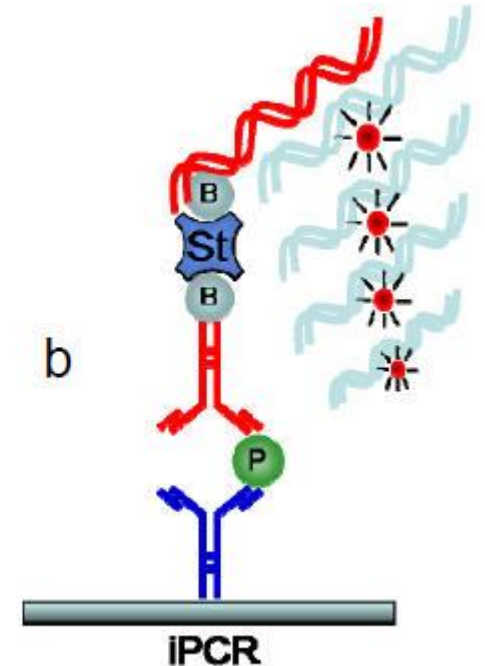
“Nuova” tecnica Immuno PCR (iPCR)

combina specificità ELISA (Ag-Ig) con amplificazione e quantificazione PCR

- elevata specificità
- 10-1000 volte più sensibile di ELISA
- possibilità di quantificare
- ridotti volumi e quantità



Legame
streptavidina-
biotina



□ Diagnostica per immagini

- Radiografie
- Ecografie
- TAC
- PET





Diagnosi di Febbre Q negli animali da reddito



IMPORTANTE:

Diagnosi di febbre Q negli animali da reddito è sempre una diagnosi di allevamento



❑ Dati epidemiologici/anamnestici

- compravendite
- contatti diretti o indiretti con allevamenti infetti
- presenza in allevamento di altre specie animali serbatoio (capre)
- incidenza aborti, problemi riproduttivi



Animali da reddito (bovini, ovini, caprini)

Definizione di caso

allevamento/gregge clinicamente affetto da febbre Q se presenti:

- ☐ **aborti o nascite premature**
- ☐ **presenza di *C. burnetii* in campioni provenienti da animali affetti (PCR, meglio Real-time PCR)**
- ☐ **presenza di animali sieropositivi**

(Linee guida EFSA 2010)



Bovini

□ Aspetti clinici

- metriti croniche-infertilità
- mastite cronica subclinica
- aborto (raro)

Sperimentalmente il batterio non può essere ancora associato all'aborto nella bovina (Agerholm et al., 2013)



Eliminazione o “shedding” di *C. burnetii* ha implicazioni di Sanità Pubblica ed Animale

importante caratterizzare lo shedding relativamente a

- via di eliminazione
- durata eliminazione
- andamento eliminazione
- intensità eliminazione

Le differenze nei patterns di eliminazione possono dipendere dalla **specie ospite** o dai **ceppi di *C. burnetii*** (Rodolakis et al., 2009)



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Caratterizzazione dello shedding per:

scegliere

- matrici più idonee
- momento del prelievo
- categorie di animali da campionare

diagnostica
diretta

impedirne trasmissione

- conspecifici
- altre specie animali
- vettori (zecche)
- uomo (zoonosi)

misure
preventive !



Bovino

- *C. burnetii* prevalentemente eliminata nel latte
- 5% nel muco vaginale



Rodolakis et al., 2009



Ovi-caprini

□ Aspetti clinici

- aborto tardivo (4°-5° mese di gestazione)
- ritenzione placentare e metrite
- parto prematuro
- nascita di animali disvitali
- natimortalità

infezione è frequentemente asintomatica
principale serbatoio di infezione per l'uomo



Shedding

Ovini

- eliminazione del batterio nelle **feci, muco vaginale e latte**
- pecore eliminano il batterio fino a 2 mesi di follow-up
- animali più infetti



Caprini

- capre eliminano il batterio principalmente nel **latte**
- minoranza nel muco vaginale o nelle feci



Raoult, 2017



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

❑ Esami di laboratorio

metodi indiretti

- utili per screening di un numero elevato di campioni
- scarsa correlazione tra risultati e shedding
- animali sieropositivi per parecchi anni dopo infezione acuta ma non eliminatori
- **animali eliminatori prima della sieroconversione (rischio di infezione !!!!)**
- animali che non sieroconvertono

I metodi sierologici disponibili non forniscono informazioni sullo stadio di infezione (recente o latente) o sul ruolo di eliminatore dell'animale



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Nessun test sierologico distingue tra animali vaccinati ed infetti

I metodi sierologici disponibili non forniscono informazioni sullo stadio di infezione (recente o latente) o sul ruolo di eliminatore dell'animale



FDC

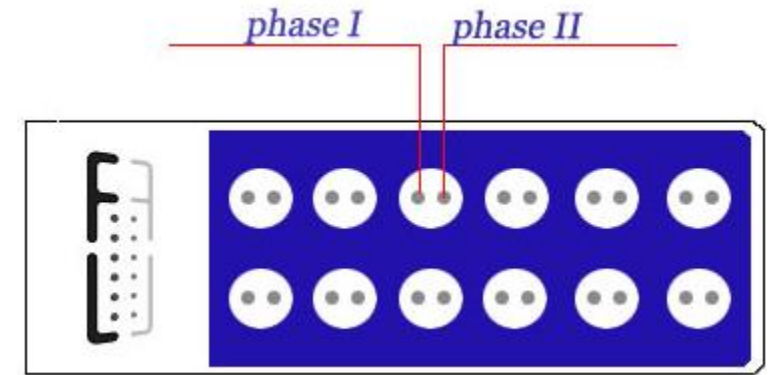
- scarsa sensibilità
- laborioso

risultati spesso negativi o deb. positivi in caso di aborto per febbre Q o in animali eliminatori

Notoriamente nei ruminanti solo le IgG1 fissano il complemento!!!
FDC non rileva alcune sottoclassi di IgG (IgG2) meno abili a fissare il complemento.
Titoli FDC ridotti per presenza di IgG2 e IgM che riducono la fissazione del complemento da parte delle IgG1.
FDC non rileva alcuni casi in presenza di potere anticomplementare dei sieri testati.



IFAT



- non idoneo per screening su ampia scala (necessarie più diluzioni, tecnica manuale)
- operatore dipendente

- possibilità di differenziare animali eliminatori attraverso rilevazione di differenti profili anticorpali (fase I e II)??



ELISA



- sufficiente una singola diluizione del siero/latte
- automatizzato
- diversa sensibilità a seconda degli antigeni utilizzati
- nei kit commerciali presente mix di antigeni di fase I e II: impossibile differenziare diversi profili anticorpali

ELISA con **antigeni da isolati di ruminanti** sono **più sensibili** di quelli con il ceppo di riferimento Nine Mile (isolato da zecca)



IFAT and ELISA phase I/phase II as tools for the identification of Q fever chronic milk shedders in cattle



Laura Lucchese^{a,*}, Katia Capello^a, Antonio Barberio^b, Federica Zuliani^a,
Arjan Stegeman^c, Letizia Ceglie^a, Eulalia Guerrini^a, Stefano Marangon^a,
Alda Natale^a

Verificare se test sierologici fase-specifici sono in grado di individuare le bovine che eliminano *C. burnetii* nel latte

Eliminatori cronici (CS): PCR+; ELISA+

Eliminatori occasionali sieropositivi (OS+): PCR+/-; ELISA+

Eliminatori occasionali sieronegativi (OS-): PCR+/-; ELISA-

Non infetti sieropositivi (NI+): PCR-; ELISA+

Non infetti sieronegativi (NI-): PCR-; ELISA-



ELISA IgG e IFAT IgG: bassa reattività sierologica nei non shedder sieropositivi (NI+) rispetto agli eliminatori cronici (CS)

ELISA IgG :

CS: alti titoli verso antigeni di fase I e di fase II

OS+: più alti titoli verso antigeni di fase I rispetto agli antigeni di fase II

stadi tardivi di infezione ??

L'ELISA fase specifico permette di differenziare a livello di gruppo animali non eliminatori sieropositivi (NI+) eliminatori cronici (CS) ed eliminatori occasionali sieropositivi (OS+). Ulteriori studi devono essere condotti per valutarne l'utilizzo a livello di singolo animale



latte di massa

- matrice molto economica
- può essere utilizzato per ricercare gli **anticorpi** nei confronti di *C. burnetii* mediante ELISA o per ricercare il **DNA di *C. burnetii*** mediante PCR

Il latte di massa **NON** può essere utilizzato per la diagnosi di aborto



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

ORIGINAL ARTICLE

Evaluation of *Coxiella burnetii* Status in Dairy Cattle Herds with Bulk-tank Milk Positive by ELISA and PCR

A. Piñero, J. F. Barandika, A. Hurtado and A. L. García-Pérez

Valutazione dell'ELISA su BTM come indicatore della prevalenza intra-aziendale e della percentuale di eliminatori in allevamenti bovini



ELISA su latte di massa

- utile a livello di popolazione per discriminare tra aziende sieropositive e sieronegative
- non è un buon indicatore della sieroprevalenza intra-aziendale (influenzato da presenza di pochi animali con alti titoli anticorpali)

PCR su latte di massa

- non è un buon indicatore della percentuale di eliminatori (influenzato da pochi animali con elevata escrezione batterica nel latte)
- può essere utilizzato per discriminare tra aziende infette e non infette



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Analisi sierologica individuale di tutto l'allevamento è costosa pertanto lo schema potrebbe essere:

1) Valutazione dell'esposizione a *C. burnetii* di un allevamento bovino:

- ELISA su latte di massa
- ELISA su ristretto numero di sieri di manze allevate con le bovine adulte. Se manze positive: infezione recente

2) Conferma di infezione attiva:

- PCR per *C. burnetii* su muco vaginale o placenta di manze e bovine adulte con problemi riproduttivi



❑ Esami di laboratorio metodi diretti

ricerca di *C. burnetii* si effettua oggi principalmente mediante **PCR/real-time PCR**

- altamente specifica e sensibile
- non necessità isolamento
- sicura (consente di inattivare il microrganismo 90°C per 30-60 min)
- diverse tipologie di campioni (placente, latte, zecche, campioni ambientali)
- metodo efficace per l'individuazione eliminatori
- possibilità di quantificazione di nei feti permette di attribuire a *C. burnetii* la causa di aborto



PCR/real-time PCR

Matrici: placenta, muco vaginale, latte, colostro, feci e tessuti dei feti abortiti (fegato, polmone e contenuto dello stomaco) raccolti subito dopo l'aborto

Numerose sequenze target utilizzate nei protocolli PCR/real-time PCR

Target più utilizzato IS1111

IS1111 **sequenza ampiamente ripetuta** nel genoma di *Coxiella* che proprio per questo motivo rende la **tecnica ancora più sensibile**



Le strategie di screening raccomandate negli allevamenti

- PCR su tamponi vaginali (carica più alta in placenta e muco vaginale più bassa nel latte poco conosciuta in feci, urine e sperma)
- test ELISA (no in allevamenti vaccinati)

Eliminazione diminuisce di intensità **dopo il parto o l'aborto** quindi il **campionamento** dovrebbe essere fatto il **prima possibile** e comunque in una settimana dopo l'aborto o il parto. Campionare **animali con parti normali** che **animali che hanno abortito**.

Gli **animali infetti con parti normali** eliminano **elevatissime** cariche di *C. burnetii* nei prodotti del parto e lo shedding può persistere **per diversi mesi**

EFSA , 2010



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana



Le **tecniche** per diagnosticare febbre Q negli allevamenti di animali da reddito devono essere **multiple** e possono essere **interpretate correttamente solo a livello di gregge/mandria**

EFSA , 2010



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Animali da compagnia



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Cane e gatto

□ Aspetti clinici

Infezione spesso subclinica

- aborto o parto anticipato (gatto)
- natimortalità (cane)
- eliminazione di *Coxiella* durante parti normali





Il cane ed il gatto sono sensibili all'infezione da *C. burnetii* e possono trasmetterla all'uomo

(Marrie et al 1988, Pinsky et al., 1991;, Buhariwalla et al., 1996)



In uno studio condotto in Inghilterra da Meredith et al., 2015 sulla sieroprevalenza di *C. burnetii* nelle prede e nei predatori è stata rilevata una **sieroprevalenza del 61.5% nel gatto domestico** suggerendo il **potenziale rischio zoonotico di questa specie**





Zecche



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Ruolo delle zecche nella trasmissione di *C. burnetii*

- non essenziali nella diffusione di *Coxiella* tra i ruminanti domestici
- ruolo importante nella trasmissione alla fauna selvatica (vertebrati, lagomorfi e uccelli)
- possono diffondere notevoli quantità del microrganismo attraverso le feci (inalazione uomo ed altri animali)
- *C. burnetii* viene trasmessa per via transovarica e trans-stadiale con amplificazione della popolazione infetta

(Borriello et al., 2010)



La capacità delle zecche come vettori di *C. burnetii* dipende da vari fattori:

- Densità di popolazione delle zecche
- Preferenza di ospite
- Tasso di puntura/morso



Quindi anche se una zecca è vettore di malattia in condizioni di laboratorio questa può essere inefficiente in vivo.

Dati limitati e report occasionali supportano la trasmissione naturale di *C. burnetii* all'uomo attraverso le zecche



(Duron et al., 2015)

Nett, R.J. et al. (2012) Q Fever with unusual exposure history: a classic presentation of a commonly misdiagnosed disease. Case Rep. Infect. Dis. 2012, 916142





Comunque le zecche parassitano un'ampia gamma di ospiti e disperdono potenzialmente su lunghe distanze agendo come fattore principale della diffusione eterospecifica e spaziale della febbre Q nei vertebrati



Problema

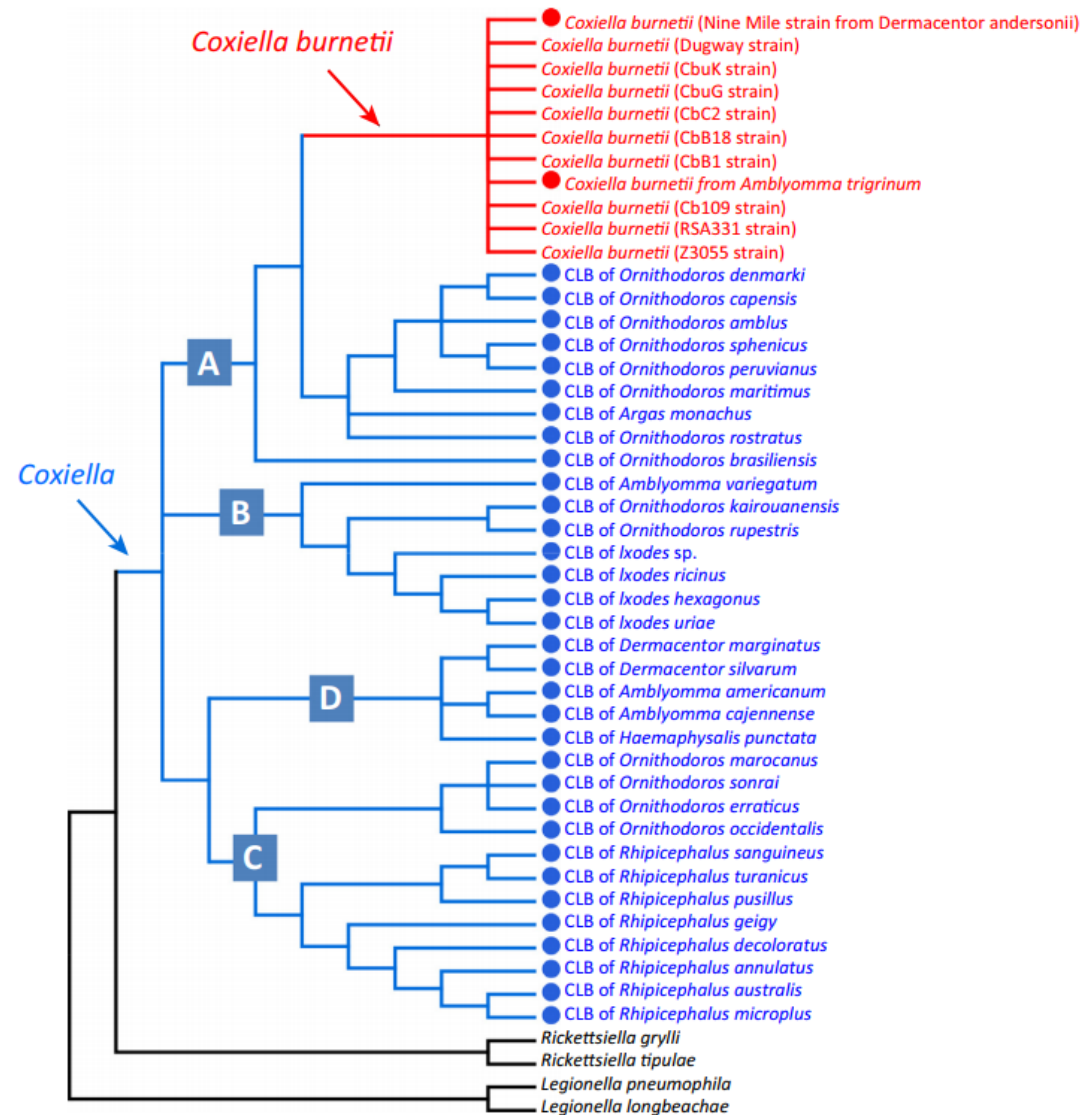
- Nel 2015 sono stati riconosciuti batteri *Coxiella*-like in zecche delle specie *Ornithodoros*, *Amblyomma* e *Rhipicephalus* (Duron et al., 2015)
- Questi organismi parassitano massivamente le ovaie e sono trasmessi di madre in figlia

Si pensa che siano endosimbionti che producono vitamine utili per la zecca

Molti batteri *Coxiella*-like possiedono l'IS1111 (target PCR): specificità risultati???

Necessario sequenziare o testare altri target !!!





Trends in Parasitology

Duron et al., 2015

Figure 1. Cladogram of the *Coxiella* Genus Based on Representative DNA Sequences Available in the GenBank Database (adapted from [49] and [117]). Members of the two sister-genera of *Coxiella* (*Rickettsiella* and *Legionella*) have been added to delineate the *Coxiella* genus. The four *Coxiella* clades are labeled A–D. CLB, *Coxiella*-like bacteria; circles, *Coxiella* strains primarily characterized in ticks; blue, *Coxiella*-like bacteria; red, *C. burnetii*; Black, bacteria belonging to bacterial genera other than *Coxiella*.



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

- La presenza di batteri *Coxiella*-like nelle ghiandole salivari delle zecche suggerisce che diversi antigeni di *Coxiella* possono essere inoculati nei vertebrati durante il pasto di sangue.
- Questi antigeni possono indurre cross-reattività nei test sierologici e portare ad una sovrastima della prevalenza nei vertebrati
- Studi futuri di cross-reattività tra *C. burnetii* e batteri *Coxiella*-like sono necessari per stimare la specificità dei metodi di screening sierologici utilizzati nei vertebrati



Questioni aperte:

- Specificità delle PCR per *C. burnetii*
- Specificità metodi sierologici per *C. burnetii*
- Interazione tra *C. burnetii* e batteri *Coxiella*-like
- Virulenza ed infettività dei batteri *Coxiella*-like per gli animali e l'uomo.....



Guimard T, Amrane S, Prudent E, El Karkouri K, Raoult D, Angelakis E. Case Report: **Scalp Eschar and Neck Lymphadenopathy Associated with Bacteremia due to Coxiella-Like Bacteria**. Am J Trop Med Hyg. 2017 [Epub ahead of print]



Caratterizzazione molecolare di *C. burnetii*



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Caratterizzazione molecolare

- MLVA (Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis)
- Single-nucleotide-polymorphism (SNP) genotyping
- Multispacer sequence typing (MST)



MLVA

tecnica basata sulla **caratterizzazione dei polimorfismi legati alla presenza nel genoma batterico di sequenze ripetute in tandem denominate VNTR** (*variable number tandem repeat*)

Questo approccio fornisce marker utilizzabili negli studi epidemiologici finalizzati alla sorveglianza e alla caratterizzazione dei focolai di infezione epidemici.

Tali regioni sono difficilmente conservabili durante la replicazione del DNA e pertanto fenomeni di delezione o inserzione di nucleotidi sono abbastanza comuni



MLVA

- tecnica di riferimento per la caratterizzazione genetica di importanti patogeni quali *M. tuberculosis*, *B. anthracis* e *Y. Pestis* utile in studi epidemiologici
- disponibilità online di intere sequenze

Studi recenti hanno mostrato che l'applicazione di questa tecnica ad isolati di *C. burnetii* sia di origine animale che umana ha consentito di individuare **36 diversi profili genetici** su un totale di 42 ceppi elevato potere discriminante





Klaasen et al., 2009



IZS Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Single-nucleotide-polymorphism (SNP) genotyping

Tecnica che si basa sulla **variabilità genetica del polimorfismo di un singolo nucleotide** tra i membri di una stessa specie.

Uno **SNP** è la **mutazione di un singolo paio di basi** in un locus specifico.



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

TABLE 2. Panel of reference strains, SNP-based genotyping results, SNP genotypes, and reference MLVA genotypes^a

Sample	Source	Country	Yr	769	2287	4439	4557	4844	5423	6025	7087	7726	7974	SNP genotype	Reference genotype ^b
				G	A	A	C	A	G	T	C	A	G		
CbC2	Caprine	France												1	MLVA 7
CbC4	Caprine	France												1	MLVA 22
CbC5	Caprine	France												1	MLVA 7
CbO4	Ovine	Morocco												1	MLVA 8
CbB1	Bovine	France												2	MLVA 2
CbB2	Bovine	France												2	MLVA 2
CbB3	Bovine	France												2	MLVA 1
CbB4	Bovine	France												2	MLVA 2
CbB5	Bovine	France												2	MLVA 2
CbB7	Bovine	France												2	MLVA 2
CbC1	Caprine	France												2	MLVA 2
NM-I RSA 493, EP3	<i>Dermacentor andersoni</i> (tick)	USA	1937											3	MLVA E
NM-II RSA 439, EP165	<i>Dermacentor andersoni</i> (tick)	USA	1937											3	MLVA E
RAK8	<i>Ixodes ricinus</i> (tick)	Austria	1990											3	MLVA E
L35	Human blood	Slovakia	1954											4	MLVA D
CbC7	Caprine	France												5	MLVA 20
Priscilla	Goat cotyledon	USA	1980											6	MLVA F / 21
CbO1	Ovine	France												6	MLVA 19
CbO2	Ovine	France												6	MLVA 19
Priscilla, EP3	Goat cotyledon	USA	1980											6	MLVA F
Priscilla, EP50	Goat cotyledon	USA	1980											6	MLVA F
CbB10	Bovine	France												7	MLVA 2
Henzerling (RSA331)	Human blood, acute Q fever	Italy	1945											8	MLVA A
Luga	<i>Apodemus flavicollis</i> (mouse spleen)	Russia	1958											8	MLVA B
DER	<i>Dermacentor marginatus</i> (tick)	Slovakia	1967											8	MLVA B
48	<i>Haemaphysalis punctata</i> (tick)	Slovakia	1967											8	MLVA C
L	<i>Dermacentor marginatus</i> (tick)	Slovakia	1968											8	MLVA A
Florian	Human blood	Slovakia	1956											8	MLVA A
Henzerling (RSA331)	Human blood, acute Q fever	Italy	1945											8	MLVA A
Luga	Tick	Russia	1958											8	MLVA B
27	<i>Dermacentor marginatus</i> (tick)	Slovakia	1968											8	MLVA D
1/IIA	<i>Dermacentor marginatus</i> (tick)	Slovakia	1968											8	MLVA A
Cbug_Q212	Human heart valve	Nova Scotia	1981											9	
Q229	Human endocarditis	Nova Scotia	1982											9	
S	Hepatitis, chronic Q fever	USA	1981											9	MLVA G

^a Gray and white squares indicate the presence and absence of the allele for the SNPs located within the single-copy genes, respectively (Fig. 1A). Green and light green squares indicate the presence of the allele for the SNPs located within the multicopy IS1111 element, with dark green squares yielding a different curve than light green squares. White squares indicate the absence of the allele (Fig. 1B). A, adenine; G, guanine; C, cytosine; T, thymine. The blue squares indicated for SNP 4557 strain CbB10 represent the presence of both alleles. Matching colors in the SNP genotype column represent identical SNP profiles.

^b MLVA types indicated by numbers (1) and letters (24) were published elsewhere.

Huijsmans et al., 2011



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Multispacer sequence typing (MST)

Tecnica basata sul **sequenziamento di numerose regioni intergeniche** dopo l'analisi di sequenza del genoma completa



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

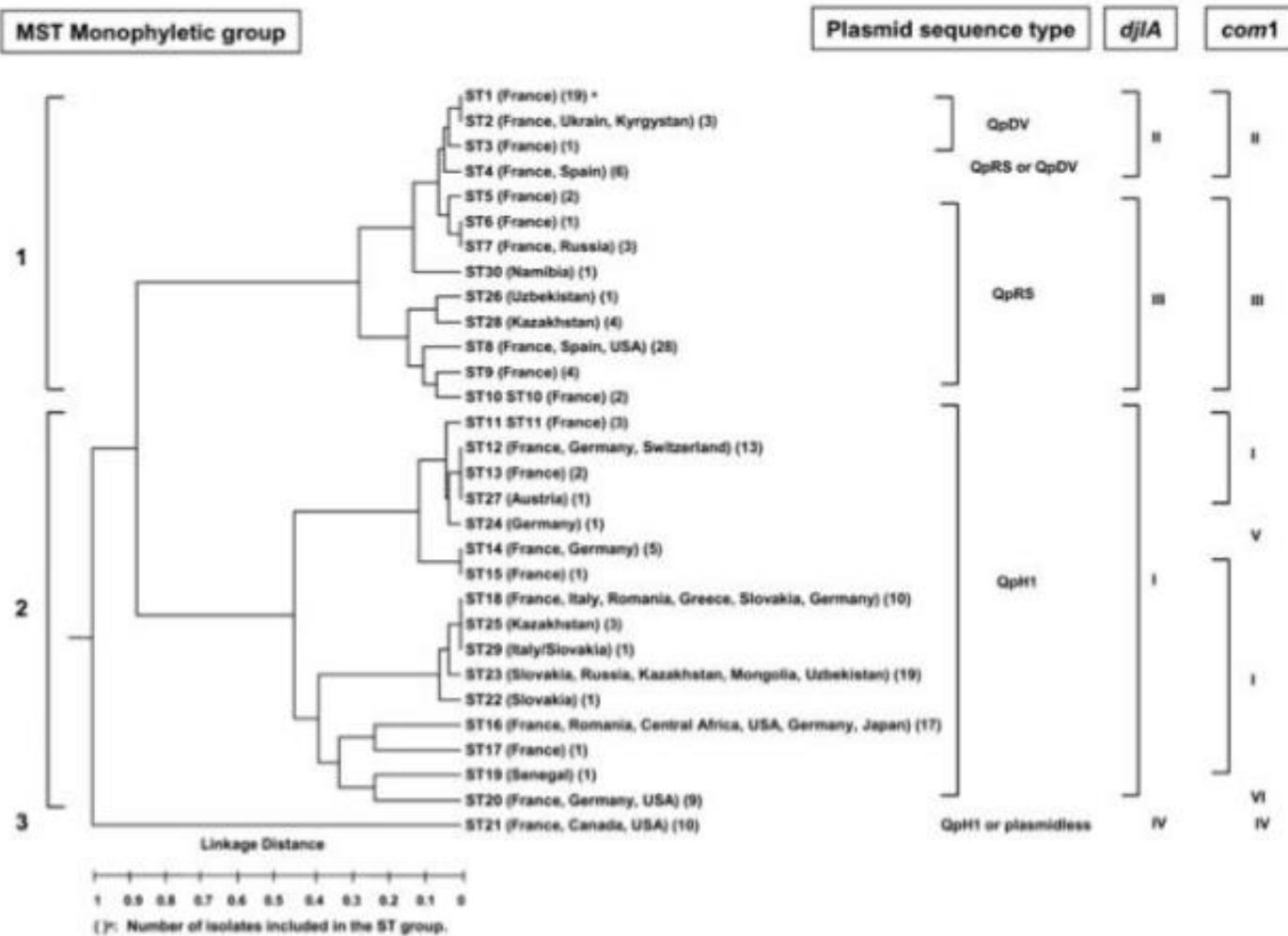


Figure. Dendrogram of the genetic relatedness among the 30 different sequence types defined by multispacer sequence type (MST) analysis. The dendrogram was constructed by unweighted pair-group method with arithmetic mean. Plasmid sequence type, *com1* group, and *djlA* group corresponding to each ST are indicated on the right of the figure. The 3 monophyletic groups defined by MST analysis are indicated on the left.

Glazunova et al., 2005



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Grazie per l'attenzione !!!



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana