

PROJEKTRAPPORT

Odling och framtagande av referensmaterial för *Coxiella burnetii* samt PCR ringtest 2009

Anna Macellaro, Totalförsvarets forskningsinstitut • Ulrika Allard-Bengtsson, Statens veterinärmedicinska anstalt • Anna Aspán, Statens veterinärmedicinska anstalt • Göran Bölske, Statens veterinärmedicinska anstalt • Eva Larsson, Totalförsvarets Forskningsinstitut • Ralfh Wollin, Smittskyddsinstitutet

ABSTRACT

The main goal with FBD is to improve multidisciplinary cooperation in order to harmonize methods, education, training and exercises for diagnostic preparedness applications regarding dangerous pathogens.

Coxiella burnetii is the etiological agent of Q fever. The bacterium is highly resistant to environmental stress and is highly infectious. In recent years, there has been Q fever outbreak in the Netherlands, with increased number of cases each year. In Finland the microorganism has recently been identified in milk. To date, the ability to detect *Coxiella burnetii* in Sweden has been limited. To increase the possibility of detection within the FBD agencies, several reference strains were cultivated and DNA was prepared. An inter-laboratory exercise between FBD agencies was performed, to compare the identification methods and for future harmonisation. The strains were compared to published data by using MLVA and sequencing. The amount of living bacteria was compared with OD (optical density) and the results showed that a DNA concentration of 200 ng corresponded to 10^8 bacteria. By diluting known number of bacteria we could detect one single cell with Real Time PCR (marker IS1111) after two weeks of culturing and with Real Time PCR (marker SOD) after three weeks. In comparison, it took four weeks to find living *Coxiella* cells within cell vacuoles. ACCM-agar plates, specifically developed for growing *Coxiella*, were tested for growth. However, this method demands large initial seeding of *Coxiella* cells, and gave very limited growth after 4 weeks. Thus, this method cannot replace traditional cell culturing of *Coxiella*.

Titel:	Odling och framtagande av referensmaterial för <i>Coxiella burnetii</i> samt PCR ringtest 2009 Publ.nr MSB280, ISBN 978-91-7383-148-2
Projektid:	1 april till 31 december 2009
Projektledare:	Anna Macellaro, Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI)
Projektgrupp:	Eva Larsson, Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI), Ralfh Wollin, Smittskyddsinstitutet (SMI), Ulrika Allard-Bengtsson, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), Anna Aspán, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), Göran Bölske, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA)
Kontaktperson i FBDs styrgrupp:	Ida Andersson, ida.andersson@smi.se
FBDs styrgrupp 2009:	Pär Larsson (FOI), Mats Forsman (FOI), Mona Byström (FOI), Cecilia Dahlberg (Livsmedelsverket), Marianne Boysen (Livsmedelsverket), Annelie Lundin Zumpe (Livsmedelsverket), Benjamin Edvinsson (SMI), Ida Andersson (SMI), Ralfh Wollin (SMI), Viveca Bäverud (SVA), Rickard Knutsson, ordf, (SVA)
Finansiering:	Projektet har finansierats genom tilldelning av MSB:s anslag 2:4 Krisberedskap
Layout:	Tecknarn i Roslagen
Tryck:	Danagårds Grafiska

INNEHÅLL

1. Sammanfattning	3
2. Bakgrund	4
3. Syfte	5
4. Metoder	6
5. Resultat och diskussion	9
6. Slutsats	13
7. Referenser	13
Bilaga 1	14

SAMMANFATTNING

Forum för BeredskapsDiagnostik (FBD) är ett samarbete mellan fyra svenska myndigheter, Livsmedelsverket, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), Smittskyddsinstitutet (SMI) och Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI). Ett av forumets huvudmål är harmonisering av metoder och utrustning mellan de deltagande myndigheterna för att öka beredskapen i Sverige inför en eventuell B-händelse.

Q-feber orsakas av *Coxiella burnetii* som har hög överlevnadsförmåga och är mycket smittsam. Under de senaste åren har återkommande utbrott av Q-feber skett i Nederländerna, med ökat antal fall per år, även i Finland har mikroorganismen påvisats i mjölk. I Sverige har förmågan att detektera organismen varit begränsad, för att öka detektionsmöjligheten hos myndigheterna inom FBD har ett antal referensstammar odlats upp och DNA preparerats. Dessa har sedan testats hos respektive myndighet inom FBD för att jämföra metoderna och för att i framtiden kunna harmonisera dessa.

Med MLVA och sekvensering kunde de olika stammarna kontrolleras gentemot publicerade data.

Antalet levande bakterier jämfördes med OD, optical density och DNA koncentration där 200ng motsvarar 10^8 bakterier. Genom att göra en spädningsserie av känt antal bakterier kunde vi konstatera att efter två veckor kan en bakterie detekteras med RT-PCR (IS1111), efter tre veckor med RT-PCR (SOD) och efter fyra veckor som vakuol i cellrör.

2. BAKGRUND

Q-feber orsakas av en liten obligat intracellulär bakterie, *Coxiella burnetii*. Bakterien har en mycket hög överlevnadsförmåga och är mycket smittsam, det behövs bara ett fåtal organismer för att orsaka sjukdom. Den tillhör riskklass 3.

Under de senaste åren, från 2007 och framåt, har bl a Nederländerna haft återkommande Q-feber utbrott. Under 2007 diagnostiserades ett sextiototal fall av Q-feber, för att under 2008 öka till nästan sjuhundra fall. Med hänsyn till risken att Q-feber utbrott också skulle kunna inträffa i Sverige, liknande de utbrott som drabbat Nederländerna, behöver förmågan att detektera patogenen förbättras. I Finland har antikroppar påvisats i serum och mjölk hos nötkreatur i en besättning, vilket har verifierats med PCR på mjölk. Förmågan att detektera patogenen med molekylärbiologiska metoder bör testas och övas bland myndigheterna inom Forum för Beredskapsdiagnostik. För detta ändamål måste referensmaterial tas fram, genom odling av referensstammen Nine Mile och ytterligare ett antal relevanta *Coxiella burnetii*-stammar.

3. SYFTE

Målet med verksamheten är att förstärka den diagnostiska förmågan med avseende på Q-feber och jämföra de olika myndigheternas metoder idag för en framtida harmonisering.

Delprojekt 1

Odling av fyra utvalda *Coxiella burnetii* stammar tillgängliga på FOI (bilaga 1). Från dessa framställs bakterielysat som distribueras av FOI till övriga myndigheter inom FBD. Under hösten har ytterligare tre stammar odlats upp och lysat framställts.

Delprojekt 2

Förmågan hos de olika myndigheterna att detektera *Coxiella* med befintlig metodik testas med hjälp av distribuerat referensmaterial av *Coxiella burnetii*.

Förbereda för odling från eventuella PCR - positiva prover.



4. METODER

Delprojekt 1

CELLER OCH BAKTERIESTAMMAR

Buffalo Green Monkey Kidney (BGM) fibroblaster (Flow laboratories) odlades i Eagles MEM supplementerat med 1x nonessential amino acids; 2mM L-Glutamate; 5% FBS; 0,2% Na-bicarbonate (samtliga Invitrogen). *Coxiella burnetii* stammar använda i denna studie beskrivs i tabell 1.

Tabell 1.

Stam	Plasmid	Ursprung	Referens
<i>Coxiella burnetii</i> Nine Mile RSA 493, PhI	QpH1	Fästing, USA 1939	Gåva från prof Mallavia, USA
<i>Coxiella burnetii</i> S4	QpH1	Färplacenta Sverige 1991	Isolerad i Giessen, Tyskland
<i>Coxiella burnetii</i> C2	QpH1	Ströbädd, Sverige 1997	Isolerad på FOI Umeå, Sverige
<i>Coxiella burnetii</i> Priscilla Q177	QpRS	Getplacenta USA 1980	Gåva från prof Krauss Giessen, Tyskland
<i>Coxiella burnetii</i> Ohio ATCC VR 542	QpH1	Komjolk, USA 1955	ATCC VR 542
<i>Coxiella burnetii</i> Scurry Q217	Saknar plasmid	Human lever USA 1981	Gåva från prof Mallavia, USA
<i>Coxiella burnetii</i> Innsbruck	QpH1	Get Österrike	Gåva från prof Krauss Giessen, Tyskland

Odling och rening av *Coxiella burnetii* från BGM celler

För att etablera cellinfektion sattes *Coxiella burnetii* till rör med 1 ml BGM celler med en täthet av ca 10^5 celler/ml och centrifugerades vid 1250 rpm 10 minuter och inkuberades vid 37°C. Cellerna kontrollerades varje dag för att upptäcka vakuolbildning, dvs. infektion. När infektionen var etablerad infekterades cellkulturflaskor och mediet samlades var 7:e dag. Nytt medium tillsattes, eller cellerna trypsinerades och delades i två cellkulturflaskor för att stimulera vakuolbildningen och infektionen. Bakterierna samlades genom differentialcentrifugering, först vid låg hastighet, 1500rpm i 5 minuter sedan centrifugerades supernatanten vid maximal hastighet, 3500rpm under 1 timme. Bakteriepelleten tvättades två gånger med PBS innan preparation av totallysat. 10^8 bakterier/ml värmeinaktiverades vid 68°C under 3 timmar, och avdöningen kontrollerades på celler under 4 veckor.

För att få en uppfattning om hur lång tid det tar att odla upp en bakterie gjordes en spädningsserie av stammen S4, där OD=1 estimerades motsvarar 10^8 bakterier/ml. De spädda bakterierna sattes till rör med celler och inkuberades med daglig kontroll under fyra veckor. Teoretiskt skulle två veckor, med generationstid på 12h, räcka, att erhålla 10^4 bakterier/ml vilket borde resultera i synliga vakuoler i cellmattan.

***Coxiella burnetii* PCR från cellkultur**

PCR gjordes dels direkt från mediet, dels från renat DNA där MasterPure™ DNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies®) användes. 150µl cellkulturmedium sattes till samma volym 2x T and C Lysis solution innehållande 50µg Proteinase K och blandades noggrant. Proven inkuberades vid 65°C under 15 minuter med vortex mix var 5:e minut. Efter nedkyllning till 37°C tillsattes 5µg RNase och inkubationen fortsatte vid 37°C under 30 minuter. Slutligen placerades proven på is innan total-DNA precipiterades genom tillsats av 175µl MPC Protein Precipitation Reagent till provet och blandades noga i 10 sekunder. Cellrester centrifugerades ner vid 10 000xg under 10 minuter och supernatanten fördes över till ett nytt rör. DNA:t precipiterades med isopropanol (1:1) blandades noga genom att vända röret flera gånger, följt av centrifugering vid 10 000xg under 10 minuter. DNA-pelleten tvättades två gånger med 75% etanol. Proven lufttorkades och pelleten löstes i TE buffert.

Real tids PCR mix innehöll 1-5µl templat, 0,5µM av respektive primer (Eriksson et al) och 1x Perfecta SYBR Green FastMix (innehållande dNTP, reaktionsbuffer, MgCl₂, polymerase) från Quanta Biosciences.

Total DNA preparation från *Coxiella burnetii*

Bakteriepelleten resuspenderades i DNasebuffert (40mM Tris pH 8,0; 10mM MgSO₄; 1mM CaCl₂ Promega) och 20U DNase tillsattes. Provet inkuberades vid 37°C under 30 min, varefter Tris pH 8,0; EDTA; SDS och Proteinase K till slutkoncentrationerna 50mM; 1mM; 0,5%; 50µg/ml respektive tillsattes och inkuberades vid 55°C under 1 timme. Fenol/kloroform skakning 2x följde för att slutligen precipitera DNA:t genom tillsats av natriumacetat och etanol. DNA:t tvättades 2 ggr med 80% etanol och fick lufttorka. Den torkade pelleten resuspenderades i TE och värmeinaktiverades vid 80°C under 30 minuter. Renhet och koncentration kontrollerades med OD 260/280 mätning.

Odling av *Coxiella burnetii* på specialplattor

Coxiella burnetii är obligat intracellulär och har tidigare inte kunnat odlas på agarplattor, tills Omsland et al mars 2009 publicerade att de lyckats. Man har tidigare kunnat konstatera att *Coxiella burnetii* har en viss metabolisk aktivitet i sur miljö, bl a har man kunna göra inmärkning med radioaktivitet (Hackstadt et al), men det var omöjligt att inducera bakterien till delning utan värdcell. Det fasta mediet bygger på tidigare erfarenheter och det krävs bl a hög koncentration av L-cystein. Plattorna innehåller, förutom en mängd olika salter och joner där Cl⁻ såväl Na⁺ och K⁺ halt specificeras, dessutom neopepton, RPMI och fetalt kalvserum och de bör inkuberas vid 37°C i en miljö med 5% CO₂ och 2,5% O₂ under 14 dagar.

MLVA amplifikation

För att kunna särskilja de olika stammarna gjordes MLVA-amplifiering enligt Arricau-Bouvery et al. Vi valde 5 olika locus som skulle kunna visa skillnader i de stammar vi hade för avsikt att odla. PCR-amplifieringen gjordes i en totalvolym av 25µl innehållande ca 1ng renat DNA; 1X PCR buffer (Dynazyme); 0,5M Betaine 1U Taq DNA polymerase; 200µM dNTP; av respektive primer (tabell 2). Proven amplifierades i Biometra T-Gradient termocycler med en initial denaturering vid 94°C under 5 minuter (10 min för ms07) följt av 30 cykler med 94°C under 30 sekunder, 60°C 30 sekunder och 72°C under 1 min, programmet avslutades med 72°C amplifiering under 5 minuter. För primerparen ms07 och ms33 skedde amplifieringen vid 70°C under 150 sekunder. De amplifierade proven analyserades på 4%-ig agarosgel, för ms22 och ms33 och 2%-ig agarosgel för övriga.

Tabell 2. Primers för MLVA

Locus namn	Primer sequence
Cbu0988_ms07_126bp_8U_1112bp	L:CTCTTAGCCATCGCTTACCACT R:AACGAAAATTGGTTTGCATTTT
Cbu1941_ms20_18bp_15U_402bp	L:CTGAAACCAGTCTTCCCTCAAC R:CTTTATCTTGGCCTCGCCCTTC
Cbu1980_ms22_11bp_6U_246bp	L:GGGGTTTGAACATAGCAATACC R:CAATATCTTTTCTCCGCATT
Cbu1941_ms36_9bp_4U_447bp	L:GAAACCAGTCTTCCCTCAACAG R:ATAACCGTCATCGTCACCTTCT
Cbu1435_ms33_7bp_9U_262bp	L:TAGGCAGAGGACAGAGGACAGT R:ATGGATTTAGCCAGCGATAAAA

Delprojekt 2

På FOI finns Real Tids PCR för detektion av *Coxiella burnetii* uppsatt där genen för SOD och markör för plasmiden pQH1 identifieras (Eriksson et al). För att höja detektionsnivån har primerpar för identifiering av generna icd, com a, com b samt IS1111 tagits fram där primerparet mot IS1111 kan detektera färre än 25 bakterier.

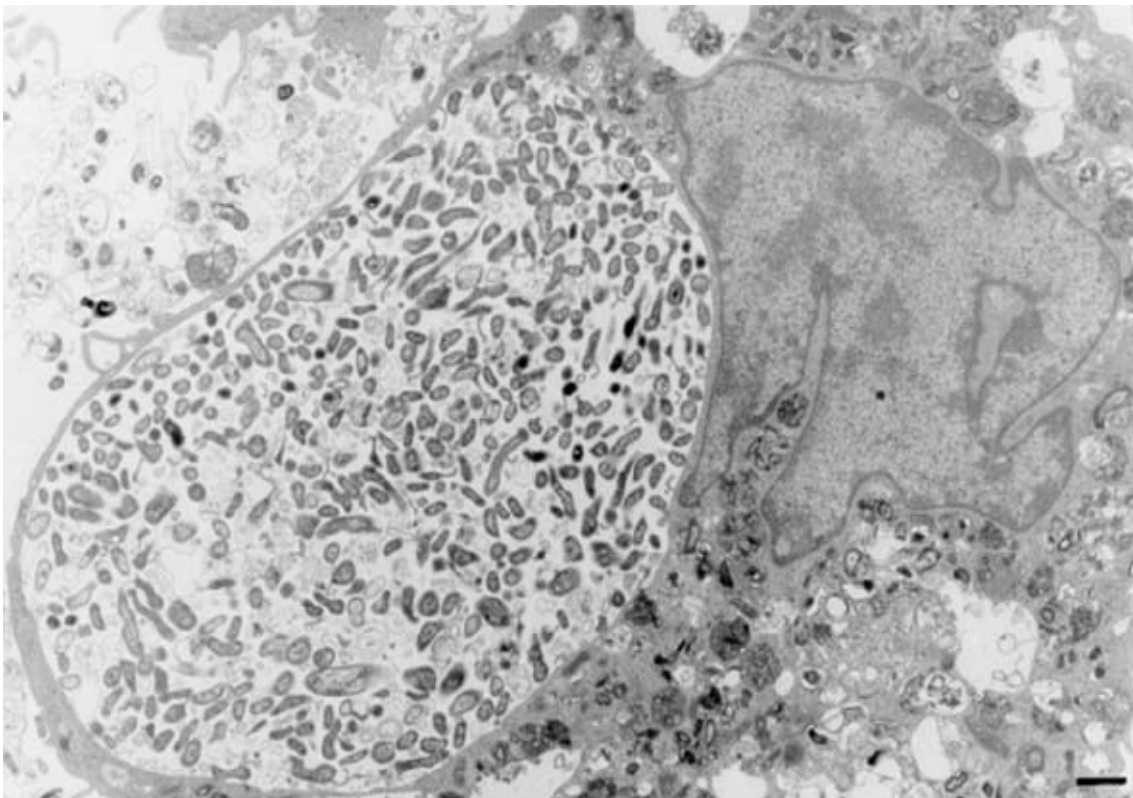
5. RESULTAT OCH DISKUSSION

Delprojekt 1

SYFTE OCH BAKGRUND

Inom ramen för delprojektet var syftet att odla upp så många olika *Coxiella*-stammar som möjligt, helst från isolat i nutid och eller från nöt och komjölk. Eftersom organismen är väldigt smittsam, bör varje stam odlas för sig, det behövs bara en organism för att orsaka infektion. Dessutom är det omöjligt att se om cellerna infekterats av en eller flera stammar. Tillväxten är mycket långsam, generationstiden för *Coxiella* är ca 10-12h.

*Figur 1 TEM snitt av BGM-cell infekterad med *Coxiella burnetii* stam Nine mile efter 48h. (bar 1µm)*
(Foto L. Johansson Umeå Universitet)



RESULTAT

Odling av *Coxiella burnetii*

Initialt har fyra stammar odlats upp, Nine mile RSA 493, Nm, är en klassisk referensstam, S4 och C2 är svenska isolat och Priscilla har ett annat plasmidinnehåll, tabell 1.

OD-mätningar har gjorts och antalet viabla bakterier/OD-enhet har estimerats, OD=1 motsvarar 1×10^8 viabla bakterier vilket motsvarar 200ng renat DNA. Stammarna avdödades vid 68°C 3h i värmeskåp, varefter prov sattes till rör med cellkultur och odlades under fyra veckor varvid cellmattan studerades varje dag för att kunna upptäcka eventuella vakuoler. Förutom daglig kontroll av cellmattan utfördes även RT-PCR efter 4 veckor för att bekräfta att bakterierna inte hade en tillväxt under fyra veckors kontrollodling. Om bakterierna däremot avdödas i vattenbad vid 68°C upptäcktes vakuoler efter drygt två veckor, avdödningen hade inte fungerat utan det krävs värmeskåp för att alla bakterier verkligen ska vara avdödade. Detta fenomen har också setts vid avdödning av andra motståndskraftiga mikroorganismer.

Ytterligare tre stammar har odlats upp och lyserats och är tillgängliga för eventuell ny ringtest under 2010. Dessa stammar är: Ohio som är isolerad från komjölk, Scurry som saknar plasmid och Innsbruck med en annorlunda MLVA-profil, tabell 1.

Vid titrering av S4 för påvisande av en bakterie kunde vakuoler skönjas först efter 3,5 vecka och vid RT-PCR konstaterades att i två av sex cellrör kunde 10^3 bakterier påvisas. Efter fem veckor påvisades 10^5 bakterier i tre av cellrören, 10^3 i ett cellrör och mindre än 10^2 i två sista cellrören. De sista två, där inga vakuoler kunde ses, kontrollerades med RT-PCR med IS1111 som kan påvisa 25 bakterier och de var negativa, dvs fyra veckors odling räcker för att påvisa en bakterie.

Odling av *Coxiella burnetii* på specialplattor

Specialplattor för odling på fast medium har provats för Nm och C2. Det tog 14 dagar innan man kunde skönja 0,05-0,1mm stora kolonier vid mikroskopering, trots ymp med tät bakteriekultur. Försök har gjorts med att plocka kolonier från dessa plattor för odling i rör med celler. Från varje stam plockades fyra enskilda kolonier till cellrör som kontrollerades varje dag i mikroskop och med RT-PCR varje vecka. Från båda stammarna kunde troligt växt konstateras med RT-PCR efter fyra veckor.

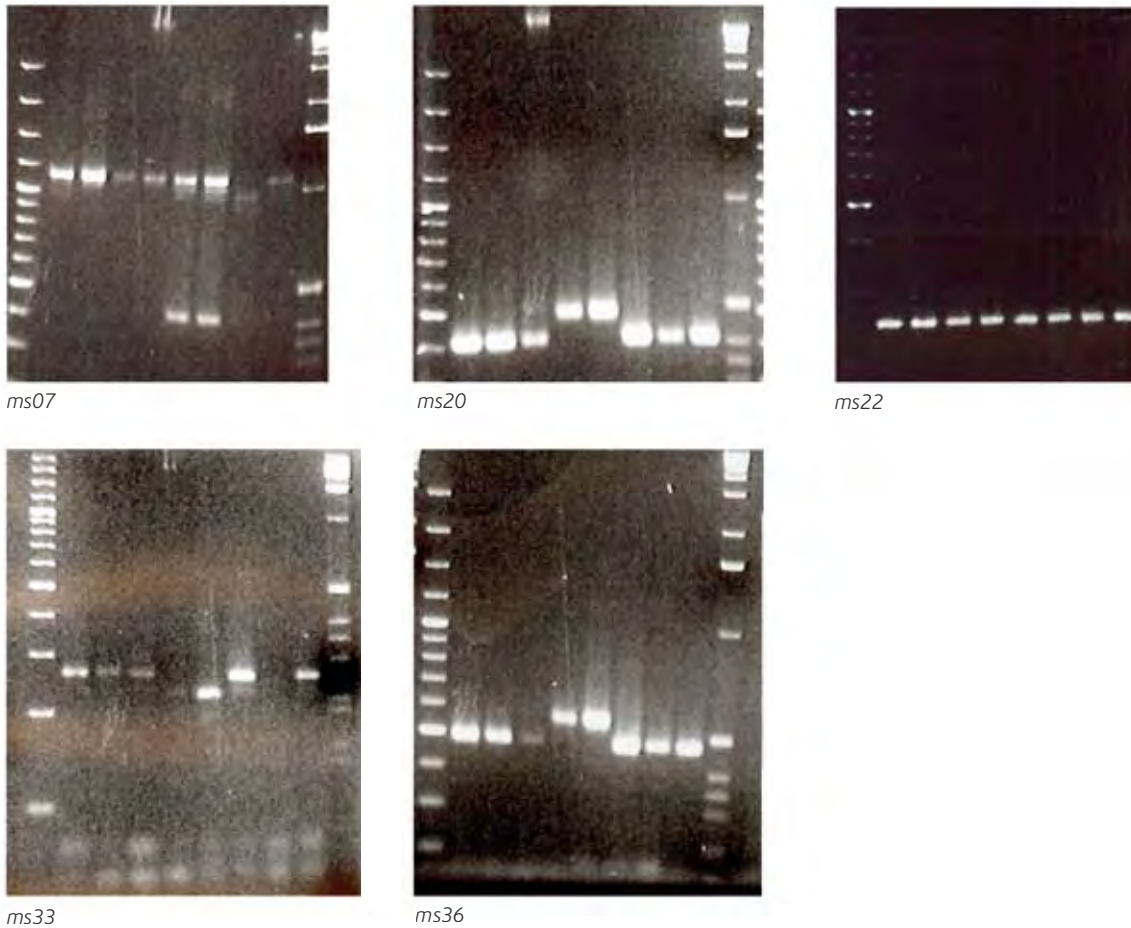
Odling på plattor ger varken snabbare eller högre utbyte än odling i celler. Metoden lämpar sig bäst när det är viktigt att isolera enskilda kolonier som t ex vid genetiska modifieringar och mutationsstudier av enskilda gener.

Som kontroll odlades på samma sätt *Wolbachia persica*, som också är obligat intracellulär, där kolonier kunde ses efter bara 4 dagars inkubering.

PCR på *Coxiella burnetii*

För att kontrollera tillväxt har RT-PCR utförts på både cellkulturmedium, pelleterade bakterier och Masterpure DNA-preppar. Dessutom har PCR-amplifiering gjorts på preparerade lysat, tvättade bakterier som värmeavdödats, och DNA-preppar, där cell-DNA har eliminerats. Vid kontroll av celler odlade och preparerade på P3 sågs amplifiering även av dessa eftersom RT-PCR är en mycket känslig metod. Istället preparerades celler utanför P3 och bakgrundsnivån kunde sänkas. Test av DNAs behandling före lysering och Master pure preparationen av skördade bakterier visade också att bakgrundsnivån kunde sänkas.

Figur 2. MLVA resultat för markörer ms07, ms20, ms22, ms33 och ms 36.
Brunn 1 O'GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus (starkare band vid 1000bp och 500bp); Brunn 2 Nm; Brunn 3 C2; Brunn 4 S4;
Brunn 5 Priscilla; Brunn 6 Innsbruck; Brunn 7 Ohio; Brunn 8 Scurry; Brunn 9 pos



MLVA på *Coxiella burnetii*

För att försöka särskilja de olika stammarna har MLVA (enl Arricau-Bouvery et al 2006) testats på de olika stammarna. Nm uppvisar de mönster som publicerats för alla fem markörerna. De svenska isolaten visar samma mönster som Nm medan den Priscilla som vi odlat upp visar ett annat mönster än det som publicerats för Priscilla. MLVA PCR-produkter skickades för sekvensering till MWG, Tyskland och sekvenserna visade att vår Nm är identisk med Nm RSA493 för alla fem markörerna. Våra svenska isolat visar homologi med RSA 493 för samtliga markörer. Den Priscilla vi har visade högst identitet med RSA 331 Henzerling för samtliga markörer.

Av de tre senaste isolaten visade Innsbruck och Scurry samma MLVA profil för de fem markörerna som de som publicerats, för Ohio har inga motsvarande data hittats ännu.

Delprojekt 2

SYFTE OCH BAKGRUND

Delprojekt 2 syftade till att testa myndigheternas befintliga PCR-metoder för identifiering av *Coxiella burnetii*. De olika myndigheternas metoder jämförs och i framtiden kan de harmoniseras. Det är också viktigt att testa ett flertal stammar med olika ursprung och genetisk bakgrund.

RESULTAT

Ett ringtest utfördes där fyra *Coxiella* DNA, tre *Burkholderia* DNA samt tre negativa prov ingick. Ringtestet sammanställdes och distribuerades av SMI (Sandra Rodin). På FOI identifierades *Coxiella* med primers mot genen för *icd* och IS1111 i RT-PCR där 25 bakterier kan identifieras. *Burkholderia* identifieras med primer mot genen för *flag*, *B.mallei* med primer mot genen för *flip* och *B. pseudomallei* med primer mot genen för *orf11*.

Resultat från övriga myndigheter presenteras inom projektet Utvärdering av multiplex realtids PCR för diagnostik inom FBD

6. SLUTSATSER

Den Nine mile stam som odlats upp är identisk med den publicerade referensstammen RSA 493 som alltid används som referens för *Coxiella burnetii*.

De svenska isolaten har också identiska sekvenser med RSA 493 för dessa fem markörer, för att kunna se om de uppvisar skillnader mot nm krävs ytterligare sekvenseringsdata.

Den stam som vi odlat upp som Priscilla stämmer inte med den publicerade Priscilla Q177 för de fem markörerna, däremot uppvisar den sekvensidentitet med Henzerling RSA 331 för dessa.

MLVA av Innsbruck och Scurry på de fem markörerna överensstämmer med de publicerade.

Fyra veckor räcker för att se om *Coxiella* tillväxer i cellrör, tre veckor för RT-PCR med primer för SOD-genen och efter två veckor kan primern för IS1111a identifiera tillväxt.

Speciella ACCM-plattor för odling av *Coxiella* är varken lämpliga för odling av större mängder eller för isolering av *Coxiella* från misstänkta prov.

I ringtestet kunde alla fyra stammarna identifieras med de RT-PCR som finns på FOI.

7. REFERENSER

Arricau-Bowery N, Hauck Y, Bejaoui A, Frangoulidis D, Bodier CC, Souriau A, Meyer H, Neubauer H, Rodolakis A, Vergnaud G. 2006. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiol.* 2006 Apr 26;6:38

Eriksson U, Byström M, Forsman M. 2004. Metodik för snabbidentifiering av ett urval av potentiella biologiska stridsmedel, FOI-RH 0290 SE, April 2004

Hackstadt T, Williams JC. 1981. Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 May;78(5):3240-4.

Omsland A., Cockrell D.C., Howe D., Fischer E.R., Virtaneva K., Sturdevant D.E., Porcella S., and Heinzen R.A. 2009. Host cell-free growth of the Q fever bacterium *Coxiella burnetii*. *Proc. Natl Acad Sci vol 106, no 11 p4430-4434.*

BILAGA 1

Coxiella burnetii stammar tillgängliga på FOI

Stam	Ursprung	Plasmid	Ref	Odlade
Nine Mile RSA 493, Ph I	Tick, USA	QpH1	fr Mallavia	2009
Nine Mile RSA 493, Ph II	Tick, USA	QpH1	fr Mallavia	
Nine Mile Ph I+II	Tick, USA	QpH1	fr Krauss	
Nine Mile ATCC VR 616	Human, USA	QpH1	ATCC	
S1	Sheep placenta, Sweden	QpH1	Isol. Krauss	
S4	Sheep placenta, Sweden	QpH1	Isol. Krauss	2009
C2	Hay, Sweden	QpH1	Isol Umeå	2009
Pricilla Q177	Goat placenta, USA	QpRS	fr Krauss	2009
Ohio ATCC VR 542	Milk, USA	QpH1	ATCC	2009
Scurry Q 217	Human, liver biopsy USA	Plasmidless	fr Mallavia	2009
Kearno Q154	Human, heart valve, USA	QpRS	fr Mallavia	
Herzberg	Human, Greece		fr Krauss	
Henzerling	Human, blood Italy	QpH1	fr Krauss	
München	Sheep, Germany	QpH1	fr Krauss	
Innsbruck	Goat, Austria	QpH1	fr Krauss	2009
Balaceanu	Human, Rumänien		fr Krauss	
Brasov	Human, Rumänien		fr Krauss	
Utvinis	Human, Rumänien		fr Krauss	

