

PROJEKTRAPPORT

Harmonisering av metodik för detektion av *Coxiella burnetii*



Anna Macellaro, Sara Ehrs, Talar Boskani, Göran Bölske, Eva Larsson, Anna Aspan

ABSTRACT

Forum for Biopreparedness Diagnostics (FBD) is a collaborative effort between four Swedish governmental institutes, National Food Administration, National Veterinary Institute, Swedish Institute for Infectious Disease Control and the Swedish Defence Research Agency. One of the main goals of this collaboration is harmonisation of methods and equipment between the participating authorities to increase the level of biopreparedness in Sweden.

Coxiella burnetii, the etiological agent of Q-fever, is very contagious and highly resistant to environmental stress. In recent years the incidence of Q-fever has increased in Europe.

A general species specific real-time PCR assay for identification of *C. burnetii* was developed within FBD in 2009. To ensure specificity the assay was further tested on DNA from genetically closely related organisms and organisms that show similar clinical picture. No cross reactivity in real-time PCR was shown in the tested strains. For verification of positive samples a second assay is needed. An additional real-time PCR assay was therefore developed and tested for inclusivity, exclusivity and limit of detection. A method for cultivation of *C. burnetii* from PCR positive tissues and environmental samples was evaluated. However, no new isolates were obtained mainly due to problems of reducing the microbial background (normal micro flora) in the samples. Analysis of strains with the typing method Multiple Loci Variable number of tandem repeats Analysis (MLVA) showed two clusters. All three Swedish *C. burnetii* strains as well as the reference strain Nine mile clustered in one of the two groups. A more reliable phylogenetical positioning of the Swedish strains requires a more extensive genetic analysis of more strains for comparison.

Titel:	Harmonisering av metodik för detektion av <i>Coxiella burnetii</i> Publ.nr MSB284, ISBN 978-91-7383-152-9
Projektid:	1 januari till 31 december 2010
Projektgrupp:	Anna Macellaro (FOI), Sara Ehrs (SVA), Talar Boskani (SMI), Göran Bölske (SVA), Eva Larsson (FOI), Anna Aspan (SVA)
Kontaktperson i FBDs styrgrupp:	Mats Forsman (FOI)
Styrgrupp:	Mats Forsman ordf. (FOI), Mona Byström (FOI), Hans Lindmark (Livsmedelsverket), Annelie Lundin Zumpe (Livsmedelsverket), Benjamin Edvinsson (SMI), Andreas Bräve (SMI), Rickard Knutsson (SVA), Viveca Bäverud (SVA)
Finansiering:	Projektet har finansierats genom tilldelning av MSB anslag 2:4 Krisberedskap
Layout:	Tecknarn i Roslagen
Tryck:	Danagårds Grafiska

INNEHÅLL

1. Bakgrund	4
2. Syfte	5
3. Material och metoder	6
3.1. Utvärdering av FBD:s realtids-PCR för IS1111a	6
3.2. Design av fler multiplex realtids-PCR markörer för identifiering av <i>C. burnetii</i>	6
3.3. Odling av <i>Coxiella burnetii</i> från mjölk- och placentaprov	7
3.4. Multiple Loci Variable number of tandem repeats Analysis (MLVA)	8
4. Resultat	10
4.1. Utvärdering av FBD:s realtids-PCR för IS1111a	10
4.2. Fler PCR-markörer för identifiering av <i>C. burnetii</i>	10
4.3. Odling av <i>C. burnetii</i> från mjölk- och placentaprov	11
4.4. Multiple Loci Variable number of tandem repeats Analysis (MLVA)	11
5. Diskussion	13
6. Slutsatser	15
7. Kompletterande dokument	15
8. Referenser	16
9. Bilagor	17
9.1. Bilaga 1 <i>C. burnetii</i> -stammar som odlats och DNA preparerats på FOI	17
9.2. Bilaga 2 Jämförelse av PCR-markörer, Ct-värden för olika isolat	18

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 FBDs huvudmål är harmonisering av metoder och utrustning mellan de deltagande myndigheterna för att öka beredskapen i Sverige inför en eventuell B-händelse. Vid en avsiktlig eller naturlig spridning av riskklass 3 bakterier är en fungerande krisberedskap, med avseende på medicinska motåtgärder och dekontaminationsförfaranden, beroende av snabba preliminära laboratorieresultat. Till skillnad från odlingsdiagnostik, som ofta ses som en gyllene standard, erbjuder molekylär diagnostik metoder som snabbare kan analysera en större mängd prover med riskklass 3 bakteriefrågeställning.

Coxiella burnetii har hög överlevnadsförmåga och är mycket smittsam. Den orsakar zoonosen Q-feber. De senaste åren har antalet som insjuknar i Q-feber ökat i Europa.

En myndighetsgemensam realtids-PCR för identifiering av *C. burnetii* har tagits fram inom FBD och har testats mot organismer som kan ge samma sjukdomsbild eller är genetiskt närbesläktad med *C. burnetii*. Ingen korsreaktivitet i realtids-PCR kunde påvisas från de testade mikroorganismerna. För verifiering av positiva prov har ytterligare en realtids-PCR utarbetats och testats för inklusivitet, exklusivitet och detektionsgräns.

En metod för att odla fram *C. burnetii* från miljöprover som är positivt med realtids-PCR utvärderades. Det var inte möjligt att med denna metod isolera viabla *C. burnetii* stammar direkt från miljöprover, främst beroende på svårigheter att reducera den mikrobiella bakgrundsfloran.

Jämförelse av uppodlade stammar med MLVA uppvisade två kluster, dels ett kluster med referensstammen Nine mile och svenska isolat, dels ett där övriga stammar klustrade. För tillförlitliga resultat krävs ytterligare isolat att jämföra mot.

1. BAKGRUND

Q-feber orsakas av *Coxiella burnetii*, en liten obligat intracellulär bakterie. *C. burnetii* tillhör riskklass 3 på grund av sin höga smittsamhet, låga infektionsdos och goda överlevnadsförmåga.

Under de senaste åren har antalet människor som insjuknat i Q-feber ökat i Sveriges närområde. Mer än 4000 personer har insjuknat i Q-feber i Nederländerna sedan utbrottets början 2007 (Kahn 2011). I Danmark har en ökad förekomst av antikroppar mot *C. burnetii* hos mjölkbesättningar noterats (Agger *et al.*, 2010). Även i Finland har antikroppar påvisats i serum och i mjölk hos nötkreatur (EVIRA). I tankmjölk från flera svenska mjölkproducenter har *C. burnetii* påvisats med serologi och Realtids-PCR. Man har även konstaterat förekomst av *C. burnetii* i ett aborterat foster från nöt (SVA). Mot bakgrund av detta genomfördes under 2009 ett projekt inom FBD med syfte att ta fram referensmaterial genom odling av referensstammen Nine Mile och ytterligare ett antal relevanta *C. burnetii*-stammar (FBD-rapport 2/2009). Även ringtest genomfördes i FBDs regi för molekylär påvisning av *C. burnetii* (FBD-rapport 1/2009).

Med hänsyn till risken att Q-feberutbrott också skulle kunna inträffa i Sverige, liknande de utbrott som drabbat Nederländerna, behöver förmågan att detektera patogenen förbättras och harmoniseras mellan de ingående myndigheterna i FBD.

En Realtids-PCR metod för påvisning av bakterien, som tidigare studier visat fungerar mycket bra bygger på amplifiering av ett repetitivt element (Denison *et al.*, 2007). Detta repetitiva IS-element, *IS1111a* förekommer i ett varierat antal kopior i olika *C. burnetii*-stammar vilket gör att det bara behövs ett fåtal organismer för att kunna detektera *C. burnetii*. I dagsläget finns inte kunskap om IS-elementet kan förekomma som bakgrund i andra typer av organismer. Under 2009 utvärderades en inom FBD framtagen Realtids-PCR för *IS1111a* och korsreaktivitet kontrollerades mot 74 stammar (FBD-rapport 1/2009). Vid det tillfället saknades vissa agens som kan förekomma vid samma typ av frågeställning, oklar feber hos människa eller vid kastning hos djur. *C. burnetii* och *Legionella pneumophila* tillväxer i fagolysosomen och de har ett antal homologa gener som kodar för virulensfaktorer. *Rickettsiae* spp är obligat intracellulära och har samma nisch som *C. burnetii* och är därför också intressesanta att kontrollera att de inte identifieras med *IS1111a*-primrar. *Brucella* spp förekommer vid oklar feber och så även *Chlamydia* spp som också kan leda till kastning. Olika isolat från dessa mikroorganismer undersöktes därför med avseende på korsreaktion i Realtids-PCR.

För identifiering av *C. burnetii* finns på FOI sedan tidigare primrar för ett antal olika PCR-markörer *sodB*, *icd*, *com1a*, *com1b* (*com1a* och *com1b* identifierar olika delar av genen *com1*) framtagna. Dessa har testats på bl a referensstammen Nine Mile och svenska isolat. Ytterligare *C. burnetii*-stammar från olika ursprung har odlats upp och testats med dessa markörer. Ingen av markörerna kunde särskilja olika typer av isolat därför valdes de markörer som fungerade bra i multiplex-PCR tillsammans med *IS1111a* och interna kontrollen sälherpesvironer (PhHV-1). Nya primrar och prober har konstruerats för *sodB* och *com1* och utvärderas med hänseende på inklusivitet, exklusivitet och detektionsgräns. De 74 referensstammar som används inom FBD och agens som kan förekomma vid samma frågeställning har testats.

I projektet ingick att försöka isolera *C. burnetii* från Realtids-PCR positivt mjölk- och placentaprov från ko för att erhålla nya svenska isolat. För att utarbeta metod för odling från mjölk testades negativa mjölkprov. Dels tillsattes enbart mjölk till celler för att se hur cellerna klarade miljön, dels sattes en känd mängd *C. burnetii* till mjölken för att se hur snabbt de kunde detekteras i cellinje. Resultatet från förförsöket beaktades vid odlingen av de Realtids-PCR positiva proven. För att undvika falskt positiva mjölkisolat odlades inga andra *C. burnetii* stammar under tiden. Proverna odlades under fyra veckor. För verifikation av eventuella odlingspositiva gjordes Realtids-PCR med två olika markörer.

2. SYFTE

Syftet med projektet var att harmonisera och förbättra diagnostiken av *C. burnetii* och utvärdera befintlig realtids-PCR metodik inom FBD, dels i humanprover dels i veterinärmedicinska prov.

DELMÅL 1: Utvärdering av FBD:s realtids-PCR för IS1111a.

För att ytterligare validera realtids-PCR med markören IS1111a för identifiering av *C. burnetii* som utvecklats inom FBD (FBD-rapport 1/2009) testades isolat från *Legionella* spp, *Brucella* spp och *Chlamydia* spp. Dessa agens kan förekomma vid samma typ av sjukdomsfrågeställning.

DELMÅL 2: Fler PCR-markörer för identifiering av *C. burnetii*.

För att förstärka identifiering av *C. burnetii* konstruerades nya primrar och prober vilka designades för att anpassas till realtids-PCR med internkontroll som harmoniserar med övriga FBD PCR-primrar. De nya realtids-PCR utvärderades med hänseende på inklusivitet, exklusivitet och detektionsgräns.

DELMÅL 3: Odling av *C. burnetii* från mjölk- och placenta prov.

En metod för isolering av *C. burnetii* från olika typer av prov utarbetades och testades på realtids-PCR positiva mjölk- och placentaprover.

DELMÅL 4: Utvärdering av MLVA-metod.

Den MLVA-metod som finns uppsatt på SVA utvärderades på de framtagna *C. burnetii*-stammarna.

3. MATERIAL OCH METODER

3.1 UTVÄRDERING AV FBD:S REALTIDS-PCR FÖR *IS1111a*

För att ytterligare kontrollera eventuell korsreaktivitet hos primrar för *IS1111a* utfördes exklusivitetstest av bakteriastammar som är aktuella vid samma typ av frågeställning som vid *C. burnetii* infektion. Olika stammar av *Clamydia*, *Brucella* och *Legionella* som fanns på SMI, SVA och FOI testades. Samtliga realtids-PCR inkluderade både probe och intern standard (sälherpesvironer) enligt FBD-rapport 1/2009. Realtids-PCR reaktionerna finns beskrivna i **S1** Utvärdering av FBDs realtids-PCR.

3.2 DESIGN AV FLER MULTIPLEX REALTIDS-PCR MARKÖRER FÖR IDENTIFIERING AV *C. BURNETII*

Det finns ett antal gener beskrivna i litteraturen som är lämpliga för identifiering av *C. burnetii* och som kan användas för verifiering av ett positivt svar med markören *IS1111a*. På FOI finns primrar för olika PCR-markörer (*sodB*, *icd*, *com 1a*, *com 1b*) (**S2** PCR-markörer) vilka tidigare har testats. Ytterligare *C. burnetii* stammar från olika ursprung har odlas upp (Bilaga 1) och testats med dessa markörer (Bilaga 2).

De markörer som har använts är *icd*, *sodB* och *com1*. Efter BLAST-sökning av generna konstaterades att *icd* och *sodB* har homologa gener i andra bakterier, medan *com1* endast är homolog i en viss del av genen (**S3** Multiplex realtids-PCR för *Coxiella*).

Tabell 1. Gener som har använts för design av ny realtids-PCR inom FBD för *C. burnetii*

Gen	Kodar för	Antal kopior i genomet
<i>IS1111a</i> transposase	Transposase gene for IS element <i>IS1111a</i>	7-110 (Klee et al)
<i>icd</i>	Isocitrate dehydrogenase (NADP)	1
<i>sodB</i>	Superoxide dismutase	1
<i>com1</i>	Outer membrane protein	1

Multiplex design och in silico kontroll

Det finns fem sekvenserade genom av *C. burnetii*. För generna ovan finns det även deponerade sekvenser för hela eller delar av genen för andra stammar. En konsensussekvens har tagits fram för alla deponerade sekvenser i nt databasen (NCBI) för respektive gen. Multiplexa PCR på konsensussekvensen har tagits fram med hjälp av programmet Allel ID. Standardvärden i programmet för reaktionsförhållanden (salthalt) och primer/prob design användes. Eftersom PCR för *IS1111a* redan är designad användes den som referensgen vid den multiplexa designen. Smälttemperaturen för internstandard (sälherpesvironer PhHV-1 primrar) skiljer sig med 5-7°C från de för *IS1111a*, varför de inte kan användas vid den multiplexa designen. Däremot kontrollerades i efterhand att inga primer-dimers bildas mellan de designade primrarna och PhHV-1 primrarna. För att få en effektiv och specifik multiplex PCR har följande punkter följts vid designen.

- Kort ampliconlängd
- Samma smälttemperatur som för *IS1111a*
- Primrar och prober hybridiserar så lite som möjligt (<8 kcal/mol)
- Del av gen för PCR är sekvenserat för så många stammar som möjligt

De framtagna primrarna har kontrollerats med:

- BLAST-primer (via Allel ID)
- BLAST amplicon (via Allel ID)
- Visuellt kontroll mot homologa gener
- Hybridisering med primrar och prober för den interna positiva kontrollen (PhHV-1)

3.3 ODLING AV *COXIELLA BURNETII* FRÅN MJÖLK- OCH PLACENTAPROV

Cellkultur

Buffalo Green Monkey Kidney (BGM) fibroblaster (Flow laboratories) odlades i Eagles MEM supplementerat med Earl´s salt; 1x nonessential amino acids; 2mM L-Glutamate; 5% FBS; 0,2% Na-bicarbonate (samtliga Invitrogen).

Förförsök

Ett förförsök gjordes där *C. burnetii* negativ mjölk spikades med en känd mängd av stammen Nine mile för att testa metoden. För att etablera cellinfektion sattes olika koncentrationer av Nine mile till rör med 1 ml BGM cellkultur med en täthet av ca 10^5 celler/ml och centrifugerades vid 1250 rpm 30 minuter och inkuberades vid 37°C. Till mediet sattes 10µg/ml Gentamicin och 0,25µg/ml Fungizone för att inhibera kontaminering. Cellkulturerna kontrollerades varje dag för att upptäcka vakuolbildning, dvs. infektion.

Odling av *C.burnetii*-positiv placenta och mjölk

Placentorna sköljdes i 0,9% NaCl med 10µg/ml Gentamicin och 0,25µg/ml Fungizone innan de mosades med pistong i rör med tillsats av NaCl. Röret vortexades och fylldes upp till 10ml med NaCl, vortexades igen och centrifugerades vid 1250 rpm 5 minuter. Två ml av supen filtrerades genom 0,45µ-sprutfilter innan den centrifugerades vid 12 750 rpm 15 minuter. Pelleten sattes till rör med 1 ml BGM cellkultur, centrifugerades vid 1250 rpm 30 minuter och inkuberades vid 37°C. Cellerna kontrollerades varje dag för att upptäcka vakuolbildning. Mjölken späddes 1:10 med NaCl och vortexades innan den filtrerades genom 0,45µ filter, centrifugerades vid 12 750 rpm 15 minuter varefter pelleten sattes till rör med 1 ml BGM cellkultur, centrifugerades vid 1250 rpm 30 minuter och inkuberades vid 37°C. Cellkulturerna kontrollerades varje dag för att upptäcka vakuolbildning, dvs. infektion. Efter fyra veckor började cellerna i rören att lossna så de trypsinerades och allt material fördes över till små flaskor med nya fräscha celler för att bättre kunna följa eventuell infektion. Varje vecka gjordes mediebyte och eventuell tillväxt kontrollerades med realtids-PCR med markören *IS1111a*.

Försök att odla från filtrerade prover upprepades ytterligare en gång. Sköljda, tvättade placentabitar fick ligga i en petriskål och torka in en vecka för att kontaminanter skulle avdödas. Tyvärr växte kontaminanterna genast de kom i kontakt med cellodlingsmedium trots tillsats av både Gentamicin och Fungizide.

3.4 MULTIPLE LOCI VARIABLE NUMBER OF TANDEM REPEATS ANALYSIS (MLVA)

Variation mellan olika stammarna kunde påvisas med MLVA och åskådliggöras genom konstruktion av ett dendrogram (Arricau-Bouvery *et al.*, 2006). Vi valde 10 olika locus som skulle kunna visa skillnader i de stammar vi hade odlat. PCR-amplifieringen gjordes i en totalvolym av 25µl. Vid högre koncentration av DNA, ca 1 ng, användes Dynazyme DNA polymerase (PCR1) medan för amplifiering av stammar där DNA-koncentrationen var lägre än 1 ng (Balaceau, Brajuvar, Herzberg, München, S1, Utvinus) användes kitet Bio-X-Act™ Short DNA Polymerase från Bionline (PCR2) med vissa modifieringar.

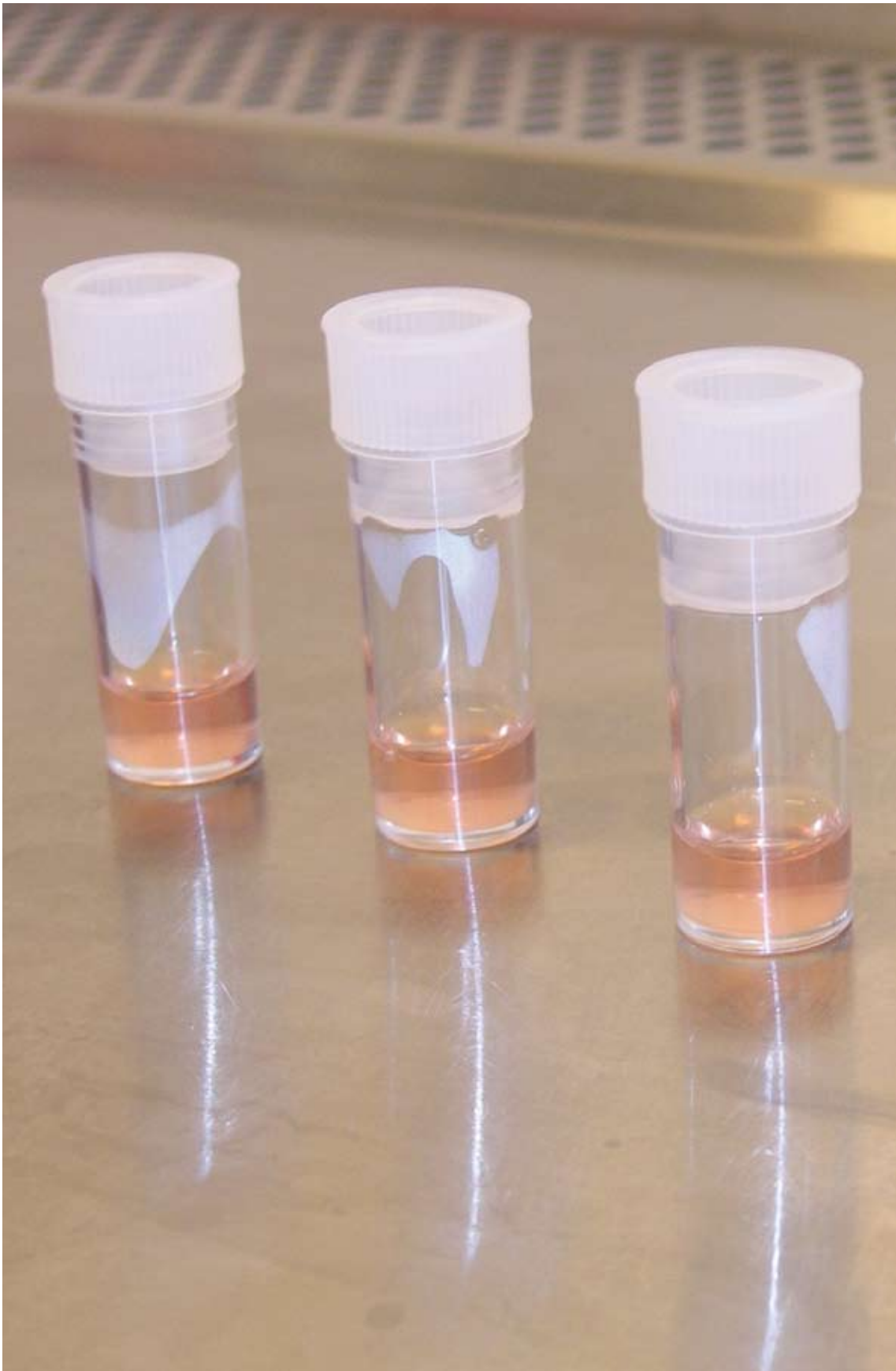
Tabell 2. PCR reaktionsbuffrar

PCR 1		PCR 2	
PCR buffer (Dynazyme)	1X	Optibuffer (Bionline)	1x
Betaine	0,5M	Betaine	0,5M
dNTP	200µM	MgCl ₂	2,5mM
respektive primer (S5 Primers för MLVA.)	0,4pmol	dNTP	200µM
Taq DNA polymerase (Dynazyme)	1U	respektive primer (S5 Primers för MLVA.)	0,4pmol
rent DNA	1ng	Bio-X-ACT short DNA polymerase	0,8U
		rent DNA	0,1-0,01ng

Tabell 3. PCR reaction Biometra T-Gradient termocycler

	Initial	Denaturering	Anneling	Amplifiering	
Temp	94°C	94°C	60°C	72°C	72°C
Tid	5 min	30 sek	30 sek	1 min	10 min
Cykler	1			30	1

För primerparet ms33 skedde amplifieringen vid 70°C under 2,5 minuter. De amplifierade proven analyserades med Ceq 8800 Gene Analysis System (Beckman Coulter)



4. RESULTAT

4.1 UTVÄRDERING AV FBD:S REALTIDS-PCR FÖR IS1111a

Fördelen med att använda IS-element som målsekvens i realtids-PCR assays är att de ofta förekommer i många kopior i olika stammar och då kan ett fåtal organismer räcka för detektion. IS-elementet IS1111a har identifierats i *C. burnetii* stammar och inom FBD finns en realtids-PCR framtagen. Korsreaktiviteten har kontrollerats mot 74 stammar som ingår i ett bibliotek för uttestande av PCR-primrar (FBD-rapport 1/2009). Vid det tillfället saknades vissa agens som kan förekomma vid liknande frågeställning, oklar feber hos människa eller kastning hos djur som därför testats i det här projektet. Sammanlagt har 24 *Brucella*-stammar, varav tre *B. melitensis*, fem *B. abortus*, två *B. suis*, en *B. canis*, en *B. ovis*, och en *B. microti* testats. Även 13 olika *Legionella*-stammar har testats, varav sju *L. pneumonie*, två *L. bozemanii*, en *L. erythra*, en *L. dumoffii*, en *L. longbeachae* och en *L. micdadei*. *L. pneumophila* är den enda kända mikroorganism som liksom *C. burnetii* också tillväxer i fagolysosomen och ett antal gener för virulensfaktorer som uppvisar homologi med *C. burnetii*. *Brucella* spp förekommer vid oklar feber och så även *Clamidia* spp. Dessutom testades två olika *Clamidia*-stammar, *C. abortus* och *C. pecorum*. Samtliga stammar från dessa mikroorganismer har testats med avseende på korsreaktion i realtids-PCR och ingen korsreaktivitet kunde påvisas (S1 Utvärdering av FBDs realtids-PCR).

4.2 FLER PCR-MARKÖRER FÖR IDENTIFIERING AV C. BURNETII

Förutom IS1111a finns ett flertal olika PCR-markörer (*sodB*, *icd*, *com 1a*, *com 1b*) identifierade vilka påvisar en gen i *C. burnetii*. Dessa PCR-primrar har testats på Nine mile och de svenska isolaten. Ytterligare 10 *C. burnetii* stammar (Bilaga 1) från olika ursprung har odlas upp och testas med dessa markörer (Bilaga 2). Ingen av dessa markörer skiljer ut olika typer av isolat. *com1* och *sodB* valdes för att *icd* hade homologier i andra bakterier (S3 Multiplex PCR för Coxiella). De testades i multiplex-PCR och nya primrar och prober designades för att fungera i realtids-PCR med internkontroll som harmoniserar med övriga realtids-PCR metoder utarbetade inom FBD. Inklusivitet, exklusivitet och detektionsgräns utvärderades för den nya multiplex-PCR (Tabell 4 och S4 Resultat multiplex realtids-PCR med IS1111a, *sodB* och *com1*).

Tabell 4 Sammanställning av inklusivitet, exklusivitet och detektionsgräns av multiplex realtids-PCR för identifiering av *C. burnetii*

	IS1111a	com1	sodB	Anmärkning
Känslighet [GE/μl]*	0,03	0,3	0,3	Koncentration DNA bestämd med QuantIT
PCR-effektivitet [%]*	109	100	98	
Inklusivitet	15/15	14/15	14/15	Låg koncentration på ett prov
Exklusivitet	112/113	112/113	111/113	Falskt positiva hade exponentiell kurvform
R2	0,996	1,000	1,000	

*Genom ekvivalenter (GE)

4.3 ODLING AV *C. BURNETII* FRÅN MJÖLK- OCH PLACENTAPROV

Förförsök

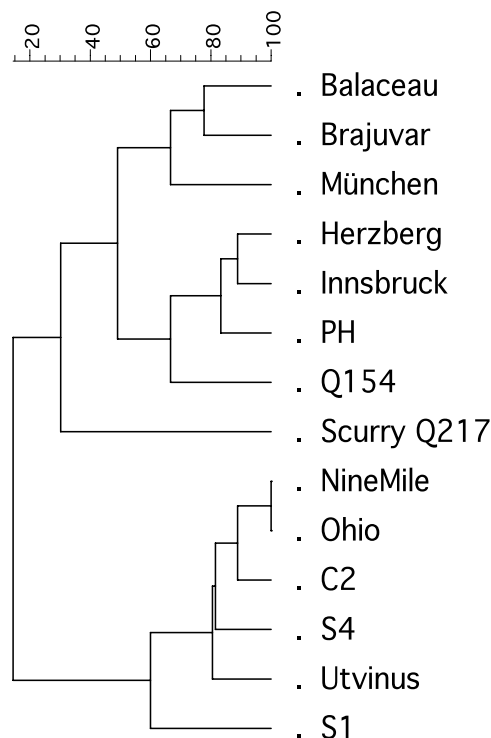
För att utarbeta metod för odling testades *C. burnetii* negativa mjölkprov. Vid mediebyte sparades överfasen, DNA preparerades med MasterPure™ DNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies®) och kontrollerades med realtids-PCR med *IS1111a*. Endast de prov där mjölken hade filtrerats kunde användas, rör med ofiltrerad mjölk var kontaminerade. Bara mjölk hämmade till viss del cellkulturens tillväxt men efter mediebyte återhämtade de sig. Vi kunde inte se några vacuoler eller visa med realtids-PCR att cellkulturerna var infekterade efter en månad.

Odling av *C. burnetii* positiv placenta och mjölk

Ofiltrerade prov sattes till rör med cellkultur men de uppvisade genast kontaminering så de fick utgå ur testet. Även vissa cellkultur-rör med filtrerade prov uppvisade kontaminering. De rör som inte var kontaminerade trypsinerades efter tre veckor och allt sattes till flaskor med nya fräscha celler. Realtids-PCR med *IS1111a* uppvisade i början, efter 1-2 veckor, Ct-värden runt 15-20 för att långsamt sjunka, till försöket avbröts efter 5 månader, till Ct 28-30. De högre Ct-värden i början beror troligen på att det finns kvar *C. burnetii* DNA i provet, men inga levande bakterier. Nya odlingar påbörjades under tiden men ingen kunde uppvisa Ct-värden som visar på tillväxt av *C. burnetii*.

4.4 MULTIPLE LOCI VARIABLE NUMBER OF TANDEM REPEATS ANALYSIS (MLVA)

Variation mellan olika stammarna kunde påvisas med MLVA och åskådliggöras genom konstruktion av ett dendrogram (Arricau-Bouvery *et al.*, 2006). De flesta lokus har ett antal olika varianter på repeats som visar på visst släktskap. I några stammar finns lokus med unikt antal repeats, vilket skulle tyda på att dessa stammar särskiljer sig från övriga.



Figur 1: Dendrogram (UPGMA) konstruerat utifrån MLVA-data från 14 stammar baserat på 10 markörer med Bionumerics.

Dendogrammet baserat på 10 olika lokus-markörer, visar på två olika grupper, en grupp där referensstammen Nine mile och närbesläktade stammar med samma plasmid hamnar, däribland alla svenska isolat. En grupp där stammar med annat plasmidinnehåll klustrar men även stammar som tidigare inte analyserats. I Nine mile-gruppen hamnar S1 lite utanför övriga trots att den isolerades samtidigt som S4, dock från en annan gotländsk gård (Åkesson *et al.*, 1991). I dendrogrammet hamnar stammen Scurry i en egen linje troligen beroende på den i kromosomen integrerade plasmiden.

Tabell 5: Resultat från MLVA baserat på repetitiva lokus (S5 Primrar för MLVA) Arricau-Bouvery *et al* 2006. De mörkmarkerade visar på unikt antal repeats.

Lokus Stamm	ms20	ms22	ms23	ms24	ms27	ms28	ms31	ms33	ms34	ms36
Balaceau	19	6	3	7	3	3	2	9	5	4
Brajuvar	15	6	3	7	3	3	2	9	3	4
C2	15	6	8	27	4	7	5	9	5	4
Herzberg	19	6	3	7	3	3	2	4	3	13
Innsbruck	19	6	3	7	3	3	2	4	3	4
München	15	6	3	7	4	3	2	6	4	4
Nm	15	6	8	27	4	6	5	9	5	4
Ohio	15	6	8	27	4	6	5	9	5	4
PH	19	6	3	7	3	3	2	4	3	13
Q154	18	6	3	8	3	4	2	4	2	13
S1	20	6	3	17	4	6	5	9	5	4
S4	15	6	8	27	4	7	5	10	5	4
Scurry	15	6	7	9	3	4	4	7	2	4
Utvinus	15	6	8	34	4	6	5	9	5	4

Den svenska stammen C2 uppvisar hög homologi med Nm och Ohio som uppvisar ett identiskt mönster. Däremot uppvisar den svenska stammen S4 skillnad i ett lokus, ms33, medan isolatet S1 visar på unika antal repeats i ms20 och ms24, och skiljer sig från de andra två svenska isolaten S4 och C2. Även München har två unika antal repeats i lokusen ms33 och ms34. Scurry har tre unika antal repeats i lokusen ms23, ms24 och ms31 medan Q154 har unika antal repeats i ms20 och i ms24. Både Scurry och Q154 har ett annat plasmidinnehåll än övriga stammar därför borde uppvisa de största skillnaderna. Hittills finns det för få stammar analyserade för att göra någon säkrare jämförelse.

5. DISKUSSION

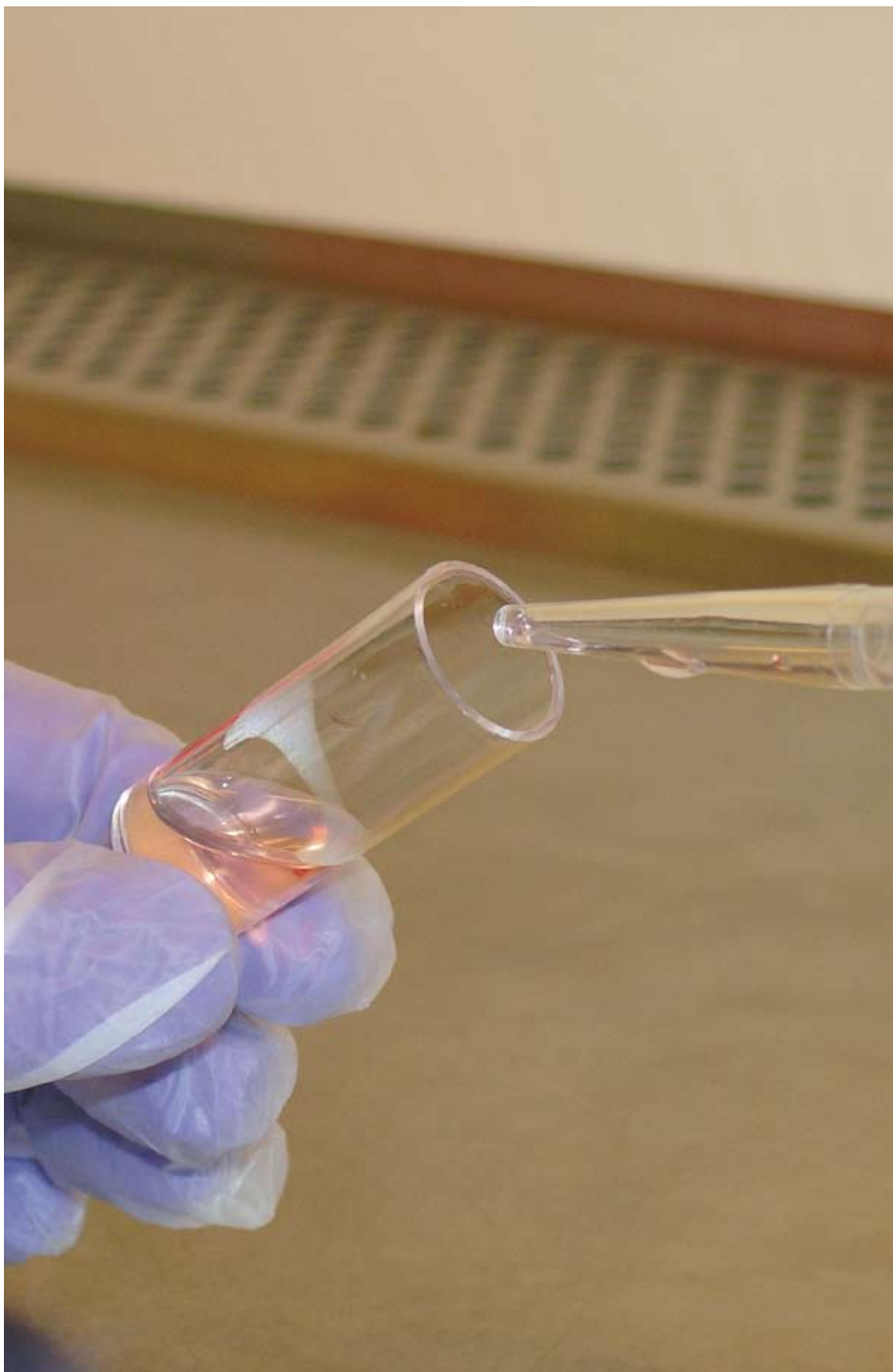
Den realtids-PCR för identifiering av *C. burnetii* som finns framtagen inom FBD utnyttjar det repetitiva elementet *IS1111a*. Den tidigare testade exklusiviteten (FBD-rapport 1/2009) saknar organismer som kan ge samma sjukdomsbild (*Brucella*, *Clamydia*) och genetiskt närbesläktade organismer (*Legionella*). Sammanlagt testades 24 *Brucella*-stammar, två *Clamydia*-stammar och 13 *Legionella*-stammar, och ingen korsreaktivitet kunde påvisas (S1 Utvärdering av FBDs realtids-PCR). För ett fåtal stammar med olika ursprung kunde en svag signal anas i realtids-PCR, vilket även kan bero på viss korskontamination med *C. burnetii* eftersom *IS1111a* detekterar ner till en organism. När miljöisolat eller DNA från ”near neighbors” blir tillgängliga bör de testas med den realtids-PCR som tagits fram inom FBD eftersom det har visats att *C. burnetii* är vanlig i naturen (Kersh *et al.*, 2010).

Det är viktigt att kunna verifiera ett *IS1111a* realtids-PCR positivt prov med någon annan unik markör för att säkerställa diagnosen. Ett antal olika PCR-markörer vilka påvisar en gen (*sodB*, *icd*, *com 1a*, *com 1b*) i *C. burnetii* finns identifierade. De testades först mot olika *C. burnetii* stammar för att se om olikheter mellan de olika stammarna kunde påvisas med någon av dessa markörer, men inga skillnader kunde påvisas (Bilaga 2). Två av dessa markörer, *com1* och *sodB*, valdes ut för att homologier med andra bakterier saknades. Primrar och prober har tagits fram och de utvärderades med hänseende på inklusivitet, exklusivitet och detektionsgräns (Tabell 3 och S4 Resultat multiplex realtids-PCR med *IS1111a*, *sodB* och *com1*). Den nya multiplexa realtids-PCR kan därmed verifiera den tidigare framtagna realtids-PCR *IS1111a* positiva prover.

Det är önskvärt att försöka isolera nya *C. burnetii* stammar, eftersom de stammar som finns att tillgå idag isolerades för mer än 10 år sedan. Detta för att få en aktuell bild av dagens infektivitet hos organismen. *C. burnetii* har påvisats i tankmjölk med realtids-PCR och även från ko-placenta. Förförsök med *C. burnetii* negativ mjölk gjordes för att etablera en metod, men inga vakuoler kunde ses i rören med cellkultur, och ingen växt kunde påvisas med PCR. Kanske hade vi spikat med för få bakterier i början, mjölken inhiberade tillväxt eller bakterierna var inte tillräckligt viabla. Förförsöket beaktades vid starten av isoleringsförsöket.

Det var svårt att odla från mjölk eftersom kontamineringen inte kunde behandlas före odlingen. Placentalit kunde sköljas i en antibiotikalösning innan de mosades och sattes till cellkultur. De prov som inte kontaminerats, eller där annan bakterietillväxt kunde inhiberas, odlades under fem månader då varken infektion av cellkultur eller positiv realtids-PCR kunde konstateras. Kontamineringen gjorde att höga koncentrationer av antibiotika och svamphämmare fick tillsättas vilket eventuellt kan ha stört etablering av infektion med *C. burnetii*.

Vid jämförelsen av MLVA kunde två kluster identifieras. Skillnaderna inom klustren var förväntade bland annat beroende av olika plasmidinhåll. För sju av stammarna (Nine mile, Ohio, C2, Innsbruck, PH, Q154, Scurry) finns genomsekvens för ytterligare verifiering. Nine mile, Ohio och C2 uppvisade nära släktskap vilket också verifierats med sekvensering. Skillnaden mellan S1 och S4 har tidigare inte framkommit (Sjöstedt *et al.*, 1998). De DNA-baserade tester som tidigare fanns att tillgå (REP och ERIK) visade ett identiskt mönster för S1 och S4 medan C2 visade ett avvikande mönster (Rustscheff *et al.*, 1999). Anledningen till den skillnad som framkom i MLVA kan dels bero på att MLVA har högre upplösning än REP eller ERIC, dels skulle proven eventuellt kunna innehålla DNA från mer än en stam. För att verifiera dessa skillnader skulle de återstående svenska isolaten kunna sekvenseras, eller ytterligare markörer för MLVA testas. Odling och preparation som ger högre DNA-koncentration medför att samma PCR-metod kan användas så att inte skillnader i DNA koncentration är en parameter som kan störa analysen. Arricau-Bouvery *et al.*, 2006 visade att stammar hamnade i samma kluster oberoende av om man jämförde 10 eller 17 markörer. Enda undantaget i den jämförelsen var stammen Scurry.



6. SLUTSATSER

- En gemensam realtids-PCR, med markören *IS1111a*, som är känslig och fungerar bra för identifiering av *C. burnetii* finns framtagen inom FBD.
- Erfarenhet av diagnostik av *C. burnetii* har höjts. Idag har samtliga myndigheter inom FBD tillgång till primrar och prober för snabb realtids-PCR för identifiering vilket tidigare har saknats. Vid SMI finns två personer som utför *C. burnetii* diagnostik med PCR och ytterligare minst två som gör serologi. SVA har åtta personer som arbetar med PCR-diagnostik och två som gör serologi. Vid FOI finns minst sex personer som kan PCR-diagnostik.
- Ytterligare två PCR-markörer, *sodB* och *com1*, för identifiering av *C. burnetii* har tagits fram och utvärderats, vilka kan verifiera *IS1111a* PCR.
- Molekylär typning baserat på MLVA för *C. burnetii* har satts upp på FOI och SVA.
- Metod för odling av *C. burnetii* har testats och kan nyttjas när det finns behov av att odla från *C. burnetii* realtids-PCR positiva miljöprover eller vävnadsprover. Bakgrundsfloran är fortfarande en begränsande faktor, för framgångsrik isolering av *C. burnetii*. I prover med hög bakgrundsflora kan isolering endast ske genom injektion och påföljande isolering från organ hos marsvin eller mus.

7. KOMPLETTERANDE DOKUMENT

Kompletterande dokument **S1-S5** finns på FBDs interna projektrum (Wikin), under projekt 7, 2010 'Harmonisering av *Coxiella* detektion' och finns att tillgå vid förfrågan.

S1 Utvärdering av FBDs realtids-PCR

S2 PCR-markörer

S3 Multiplex PCR för *Coxiella*

S4 Resultat multiplex realtids-PCR med *IS1111a*, *sodB* och *com1*

S5 Primrar för MLVA

8. REFERENSER

- Agger JF., Christoffersen AB., Rattenborg E., Nielsen J., and Agerholm JS. 2010. Prevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in Danish dairy herds. *Acta Vet Scand.* 2010; 52(1): 5.
- Arricau-Bouvery N., Hauck Y., Bejaoui A., Frangoulidis D., Bodier CC., Souriau A., Meyer H., Neubauer H., Rodolakis A. and Vergnaud G. 2006. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiol.* 2006 Apr 26;6:38.
- Delprojekt: Multiplex realtids-PCR för *Coxiella* (Design) av Sara Ehres, SVA https://forumbd.foi.se/images/1/1e/Multiplex_PCR_f%C3%B6r_coxiella.docx
- Denison MA., Thompson HA. and Massung .A. 2007. IS1111a insertion sequences of *Coxiella burnetii*: characterization and use for repetitive element PCR-based differentiation of *Coxiella burnetii* isolates. *BMC Microbiology*, 7:91 doi:10.1186/1471-2180-7-91.
- Edvinsson B., Ehres S., Garbom S., Larsson P., Nilsson C. och Peterzon A 2009. Validering av multiplex realtids-PCR för harmonisering av molekylär detektion av riskgrupp 3 bakterier inom FBD. FBD-rapport 1/2009.
- EVIRA <http://www.evira.fi/portal/se/evira/aktuellt/arkiv/?bid=881>
- Kahn www.thebulletin.org/web-edition/columnists/laura-h-kahn/lessons-the-netherlands
- Kersh GJ., Wolfe TM., Fitzpatrick KA., Candee AJ., Oliver LD., Patterson NE., Self JS., Priestley RA., Loftis AD. and Massung RF. 2010. Presence of *Coxiella burnetii* DNA in the environment of the United States, 2006 to 2008. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Jul;76(13):4469-75.
- Klee SR., Tyczka J., Ellerbrok H., Franz T., Linke S., Baljer G. and Appel B. 2006. Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiol.* 2006 Jan 19;6:2.
- Macellaro A., Allard-Bengtsson U., Aspán A., Bölske G. och Larsson E. 2009. Odling och framtagande av referensmaterial för *Coxiella burnetii* samt PCR ringtest FBD-rapport2/2009.
- Rustscheff S., Norlander L., Macellaro A., Sjöstedt A., Vene S. and Carlsson M. 2000. A case of Q fever acquired in Sweden and isolation of the probable ethiological agent *Coxiella burnetii* from indigenous source. *Scand. J. Infect. Dis.* 32: 605-607 2000.
- Sjöstedt A., Göransson I., Macellaro A. and Norlander L. 1998. Genotypic and phenotypic characterization of two Swedish isolates and two prototypic strains of *Coxiella burnetii*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1998 Feb;20(2):165-72.
- SVA <http://www.sva.se/sv/undersida/Nyheter-fran-SVA/Q-feber-orsak-till-stord-fruktsamhet/>
- Åkesson Å., Krauss H., Thiele H.D., Macellaro A., Schwan O. and Norlander L. 1991. Isolation of *Coxiella burnetii* in Sweden. *Scand J Infect Dis.* 1991;23(2):273-4.

9. BILAGA 1

C. BURNETII-STAMMAR SOM ODLATS OCH SOM DNA HAR PREPARERATS FRÅN

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	2010
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	2010
Herzberg	Human, Greece		fr Krauss	2010
München	Sheep, Germany	QpH1	fr Krauss	2010
Innsbruck	Goat, Austria	QpH1	fr Krauss	2009
Balaceanu	Human, Rumänien		fr Krauss	2010
Brajuvar	Human, Rumänien		fr Krauss	2010
Utvinis	Human, Rumänien		fr Krauss	2010

9. BILAGA 2

JÄMFÖRELSE AV PCR-MARKÖRER, CT-VÄRDEN FÖR OLIKA ISOLAT

Markör Stam	<i>sodB</i> Ct	<i>IS1111a</i> Ct	<i>icd</i> Ct	<i>com 1a</i> Ct	<i>com 1b</i> Ct
Balaceau	24	17,4	23	22,9	23,4
Brajuvar	26,3	19,1	24,9	24,9	24,9
C2	27	20,8	25,6	25,2	25,4
Herzberg	23	16,3	21,3	21,8	22,2
Innsbruck	24,5	17,6	23,5	23,4	23,7
München	24,1	17,6	22,6	22,6	23,2
Nm	23,9	18,4	23,3	22,8	22,9
Ohio	26,6	20,3	25,2	24,8	25,2
P/H	25	18,7	23,1	23,1	23,4
Q154	25,5	17,5	24	23,8	24,7
S1	24,7	17,8	22,9	23	22,9
S4	26,8	20,2	25	25,1	25,1
Scurry	28,4	21,8	27,3	27,3	27,3
Utvinus	25,1	18,8	23,4	23,3	23,5
H2O	nd	nd	nd	nd	nd

nd= not detectable

