

WORKSHOP INDAGINI EPIDEMIOLOGICHE

Roma 3 Novembre 2015

Indagine epidemiologica e genotipizzazione finalizzata all'eradicazione della TB

M. Pacciarini - M. Zanoni

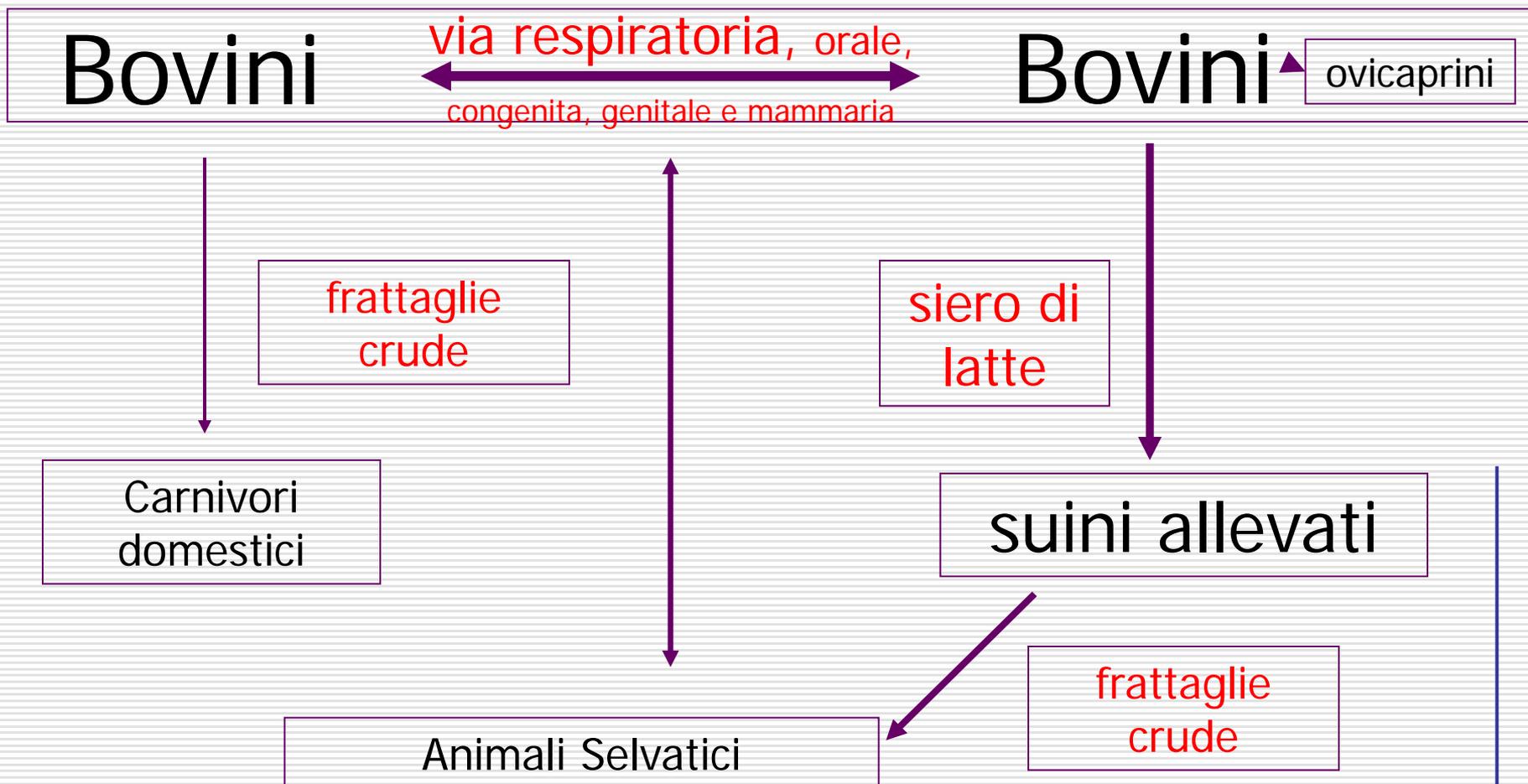
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia Romagna
Brescia (Italy)



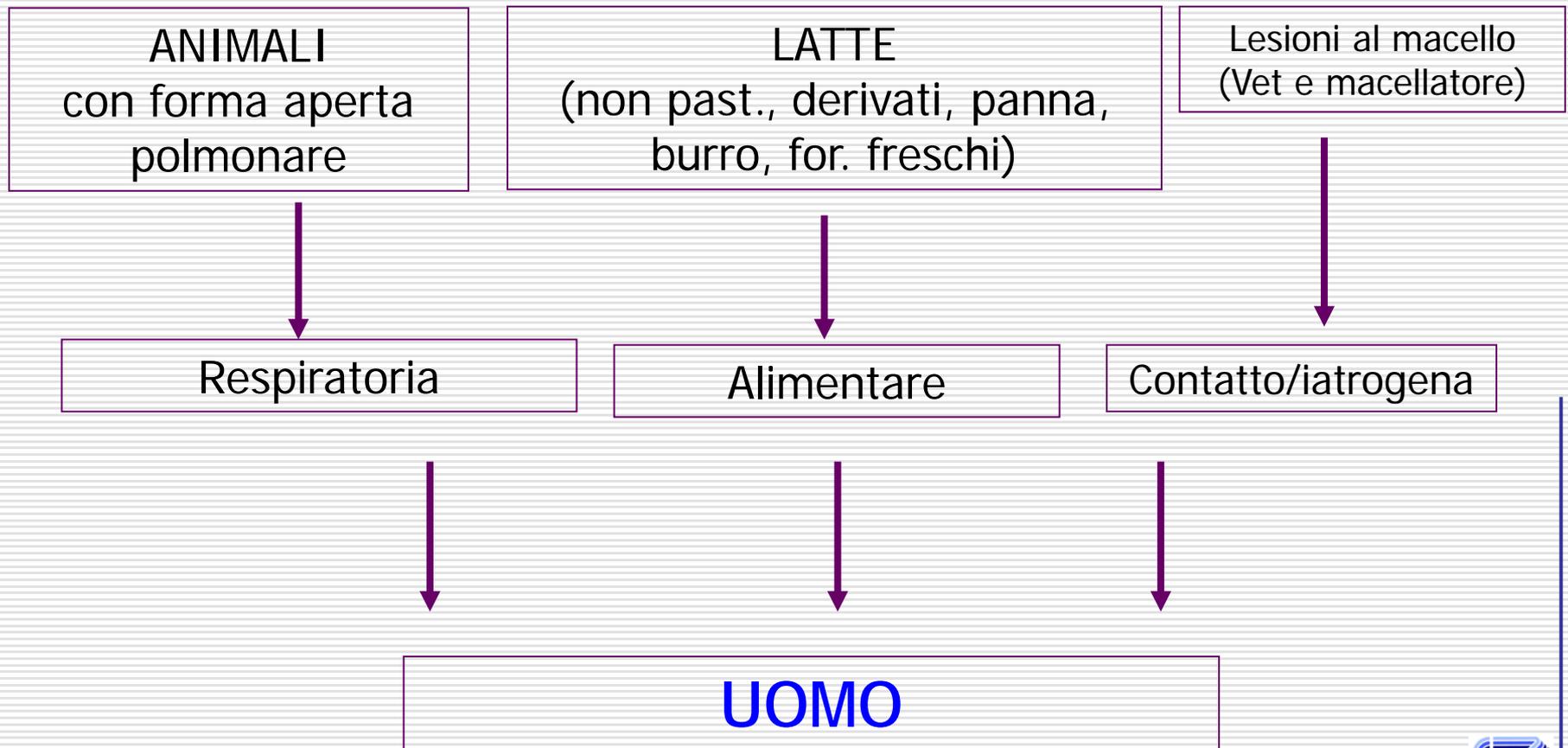
SOMMARIO

- *Epidemiologia di M. bovis*
- *Sorveglianza e controllo TB*
- *Banca dati Nazionale genotipi M. bovis/M. caprae*
- *Distribuzione geografica e MST dei genotipi maggiormente diffusi in Italia*
- *Esempio rintracci epidemiologici*

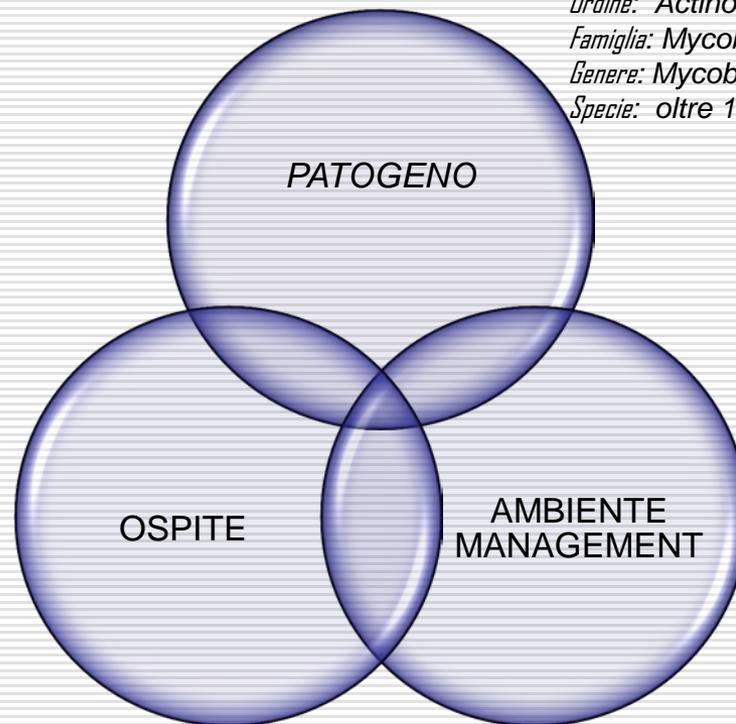
Epidemiologia di *M. bovis*-animali



Epidemiologia di M. bovis-Uomo



Fattori che favoriscono la diffusione



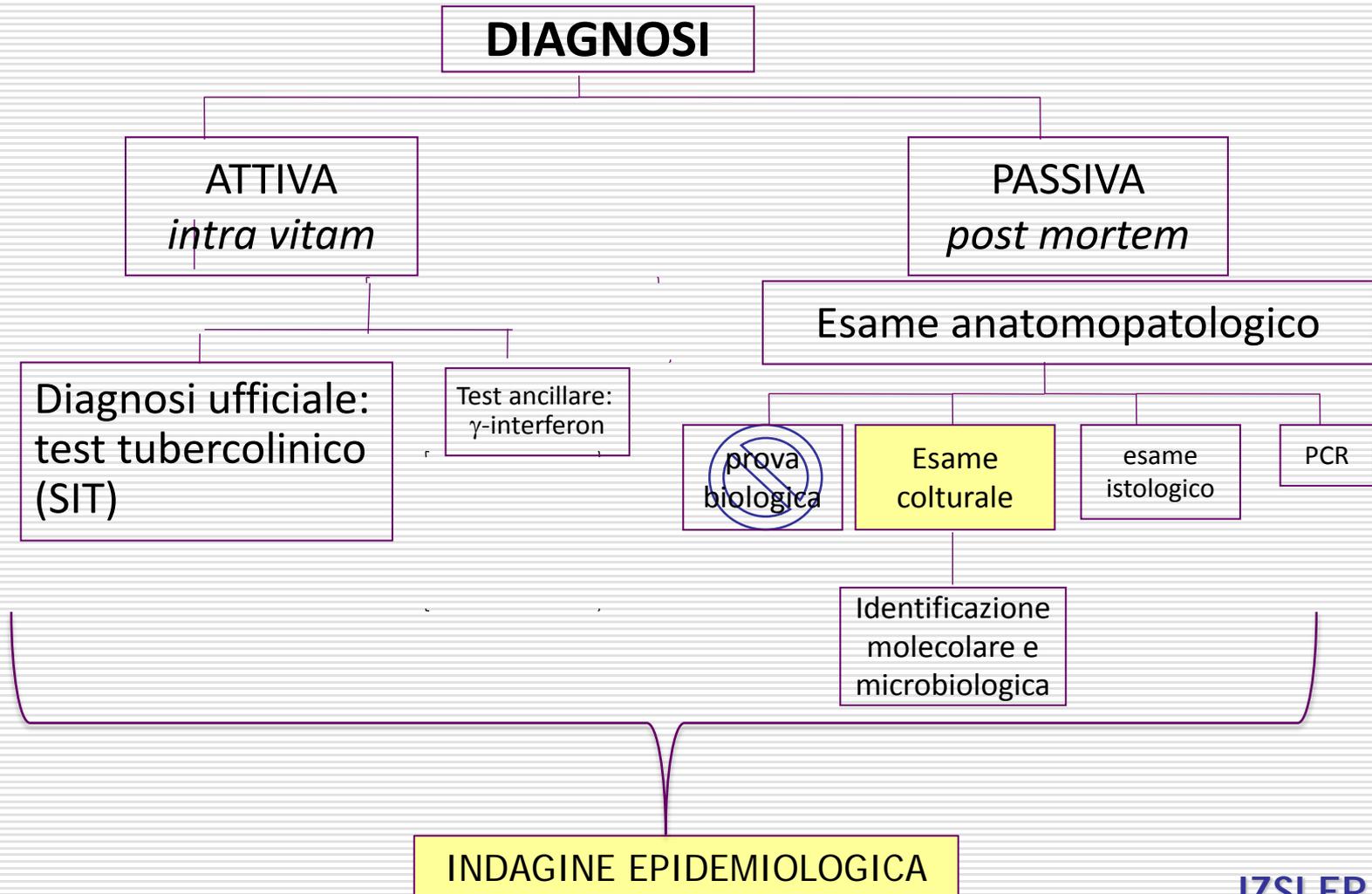
Ordine: Actinomycetaceae

Famiglia: Mycobacteriaceae

Genere: Mycobacterium

Specie: oltre 100 (in continuo aggiornamento)

Sorveglianza e controllo TB



Alcuni punti critici nella sorveglianza

1. Diagnosi in vita (T° / conservazione tuberculina, dose, esecuzione, lettura, rispetto tempi...)
2. Ispezione al macello con **isolamento/identificazione** del micobatterio coinvolto e conseguente invio al CRN-TB per la caratterizzazione genetica)
3. Indagine Epidemiologica (IE): raccolta esaustiva informazioni

3. Raccolta informazioni per IE

L'IE in focolaio, rappresenta l'atto sostanziale e formale che sintetizza le conoscenze apportate da:

- sorveglianza ATTIVA
- Sorveglianza PASSIVA
- visita clinica-anamnestica degli animali e dell'allevamento
- Approfondimenti diagnostici di laboratorio

Che portano ad ipotizzare l'origine e a spiegare la diffusione dell'infezione

A. Stato sanitario dell'allevamento prima della rilievo del focolaio

ata ultima IDT

rilevato negli ultimi 24 mesi di capi positivi/dubbi a IDT

rilevato lesioni al macello -ESITO DELL'ISOLAMENTO-

B. Dati relativi all'allevamento

indirizzo produttivo (numero di animali per categoria)

presenza di altri animali sensibili

stabilizzazione

modalità smaltimento deiezioni

pascolo -indicare località e periodo di utilizzo pascolo-

adozione misure sanitarie

introduzione/vendita/uscita x fiere mercati animali dopo ultima prova IDT -elenco-

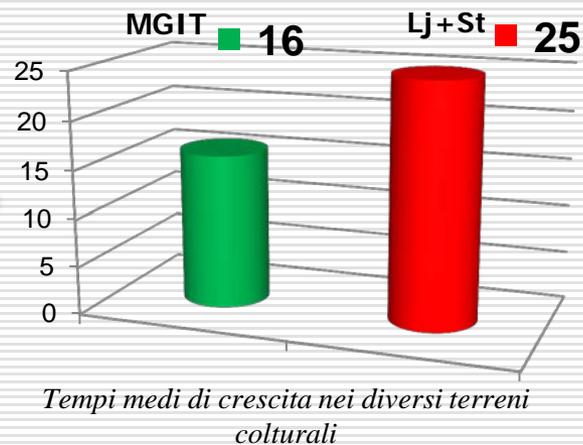
C. Contatti diretti/indiretti con altri allevamenti -elenco-

D. Altri allevamenti dello stesso proprietario -elenco-

2. Ispezione al macello - isolamento

Soggetti dubbi/positivi IDT NVL, invio di materiale per isolamento *M. bovis* = tipizzazione molecolare

Mycobacterium	Totale n° isolati	% isolati con i differenti sistemi	
		MGIT 960	LJ + ST
<i>M. bovis</i>	858	99,8	87,2
<i>M. avium</i>	92	95,7	72,7
<i>M. fortuitum</i>	54	92,6	94,4
<i>M. marinum</i>	33	60,6	100,0
<i>M. nonchromogenicum</i>	49	81,6	85,7
<i>M. chelonae</i>	30	100,0	93,3
" <i>M. terrae complex</i> "	18	77,8	77,8
<i>M. kansasii</i>	8	100,0	75,0
<i>M. microti</i>	14	71,4	64,3
<i>M. gordonae</i>	4	100,0	100,0
<i>M. bovis</i> + <i>M. avium</i> (2)			
<i>M. bovis</i> + <i>M. kansasii</i>	4	100,0	100,0
<i>M. bovis</i> + <i>M. nonchromogenicum</i>			
TOTALE	1164	96,6	86,2



Centro di Referenza Nazionale per la tubercolosi da *M. bovis*

Istituito con il
DM 4 Ottobre 1999 *“Centri di referenza
nazionali nel settore veterinario”*
IZSLER – Brescia

- Collaborazione con la rete
degli IZZSS nazionali

Raccolta dei ceppi è stata possibile
grazie al ruolo di CRN-TB istituito
con DM 4 Ottobre 1999 presso l'IZSLER



Banca dati nazionale genotipi *M. bovis*/*M. caprae*

Raccolta ceppi *M. bovis*/*M. caprae* isolati da bovino/bufalo sul territorio nazionale a partire dal 2000



Tipizzazione molecolare:
Dal 2000 tecnica spoligotyping
Dal 2008 tecnica spoligotyping
+ MLVA 12 VNTR/MIRU (loci selezionati per la loro elevata capacità discriminativa)

Apri parentesi ricordando che *M. caprae* è considerato un agente causale della TB:

- Manuale OIE 2012, Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals chapter 2.4.7
- Working Document on casual agents of Bovine Tuberculosis (SANCO/7059/2013).

Questo ci ha permesso di allestire una banca dati nazionale contenente genotipi e informazioni dei ceppi di *M. bovis*/*M. caprae* isolati in Italia a partire dal 2000.

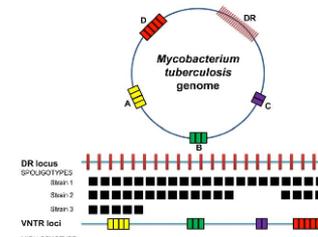


Figure 1. Schematic illustrating the principles of the CRISPR- and VNTR-based genotyping in *M. tuberculosis*. These genotyping methods are known as spoligotyping and MLVA-VNTR typing, respectively. Spoligotyping is based on the detection of 43 unique spacers located between direct repeats at a specific locus of the *M. tuberculosis* genome known as the direct repeat (DR) locus. Spoligotyping patterns are commonly represented by black and white squares indicating presence or absence of particular spacers, respectively. The deletion of some of these 43 spacers allows to differentiate between strains. MLVA-VNTR analysis relies on the identification of different number of repeats at several loci scattered around the bacterial genome (marked by A, B, C, and D in the figure). The number of repeats at each locus is combined to generate a unique numerical code used to establish phylogenetic and epidemiological links between strains. doi:10.1371/journal.pone.0007815.g001

Genotipizzazione *M. bovis*/ *M. caprae*

Subtipizzazione, caratterizzazione genetica dei ceppi ha fornito informazioni utili sull'evoluzione della popolazione di *M. bovis* presente in Italia. Studio della struttura e distribuzione dei genotipi nel tempo e nello spazio.

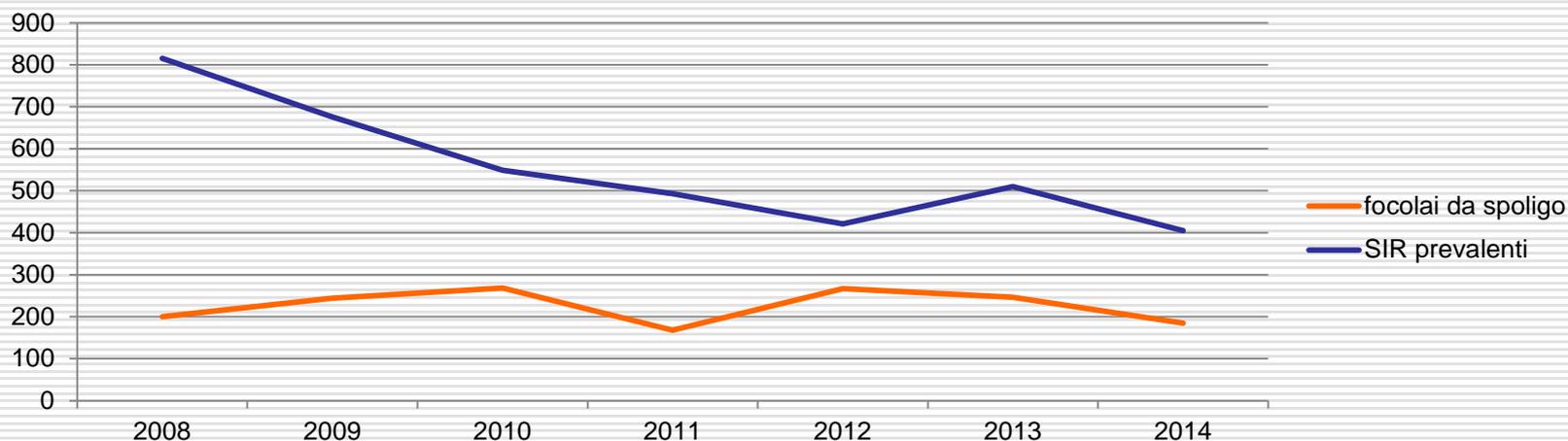
Mappatura geografica

Studio della struttura, e distribuzione dei genotipi di *M. bovis*/*M. caprae* in Italia: confronto con altre popolazioni presenti in Europa

Rintraccio epidemiologico

Caratterizzazione genetica più approfondita, maggiore capacità discriminativa ha fornito un valido strumento a supporto delle indagini epidemiologiche tradizionali

N° focolai e n° ceppi genotipizzati



Massimo dell'informazione e affidabilità banca dati è c'è se avessimo almeno 1 ceppo isolato/focolaio/caso. Nel grafico vediamo andamento n° focolai e n° ceppi genotipizzati dal 2008-2014 presenti in banca dati. Nel tempo situazione migliorata maggiore rappresentatività.

Tipizzazione molecolare di *M. bovis*/*M. caprae*

Dal 2000 genotipizzazione Spoligotyping: Metodo storicamente e universalmente utilizzato per tipizzazione ceppi di *M. bovis*, si basa sul polimorfismo locus DR, identifica delezioni delle sequenze spacers

Dal 2008 genotipizzazione Spoligotyping + Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA): mappatura geografica e rintraccio epidemiologico (maggiore comprensione della presenza di cluster geografici e temporali)

- *Marcatori ETRA-E (Frothingham and Meeker-O'Connell, 1998)*
- *Sette marcatori VNTR (Boniotti et al. 2009):*
- *VNTR2163a (QUB11a)*
- *VNTR2163b (QUB11b)*
- *VNTR2996 (MIRU26)*
- *VNTR3155 (QUB15)*
- *VNTR4052 (QUB26)*
- *VNTR1895 (QUB1895)*
- *VNTR 3232*

642 BONIOTTI ET AL.

J. CLIN. MICROBIOL.

TABLE 3. Allelic diversity at each locus among the 100 SB0120 panel

Locus	No. of isolates with MIRU-VNTR allele:																		Allelic diversity (h)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		>18
MIRU 4/ETR-D				100																0.00
MIRU 10				100																0.00
MIRU 39				100																0.00
ETR-C					100															0.00
MIRU 2		99	1																	0.01
MIRU 40	1	98	1																	0.03
MIRU 20	3	97																		0.05
MIRU 23	1		1	95	3															0.09
QUB18/VNTR 1982		3	95	2																0.09
QUB23	1		2			95	1												1	0.09
QUB5/MIRU 27	1	95	4																	0.09
MIRU 24	1	94	3	1	1															0.11
MIRU 16		5	92	3																0.14
MIRU 31/ETR-E			85	15																0.25
QUB1895/VNTR 1895		6	9	84											1					0.28
QUB15	7	5	82	6																0.31
QUB11b		9	10	81																0.32
QUB26		6	3	80	11															0.34
MIRU 26		1	1	14	79	5														0.35
QUB11a				2	4	2	4	8	78	1	1									0.37
ETR-A				39	61															0.47
VNTR 3232				5	3	67	14	10	1											0.51
VNTR 3336		1		1	1	1	8	1	5	16	57	3	1		1			2	2	0.63
ETR-B			21	36	43															0.64

Spoligotyping: storia evolutiva ceppi isolati e mappatura geografica

Spoligotyping+ VNTR: maggiore capacità differenziativa con l'analisi (MLVA) applicata a 12 marcatori VNTR caratterizzati da queste piccole seq rip a tandem. Ogni ceppo può avere un numero variabile di unità ripetitive in ciascuno dei 12 loci.



Spoligotyping

Metodo storicamente e universalmente utilizzato per tipizzazione ceppi di *M. bovis* si basa sul polimorfismo locus DR, identifica delezioni delle sequenze spacers

- ✓ 4386 ceppi *M. bovis*/*M. caprae* isolati in Italia da 3163 focolai dal 2000 al 2014
- ✓ Differenziati 143 spoligotipi diversi

Spoligotipi più frequenti:

SB0120: 49,2% (*M. bovis*)

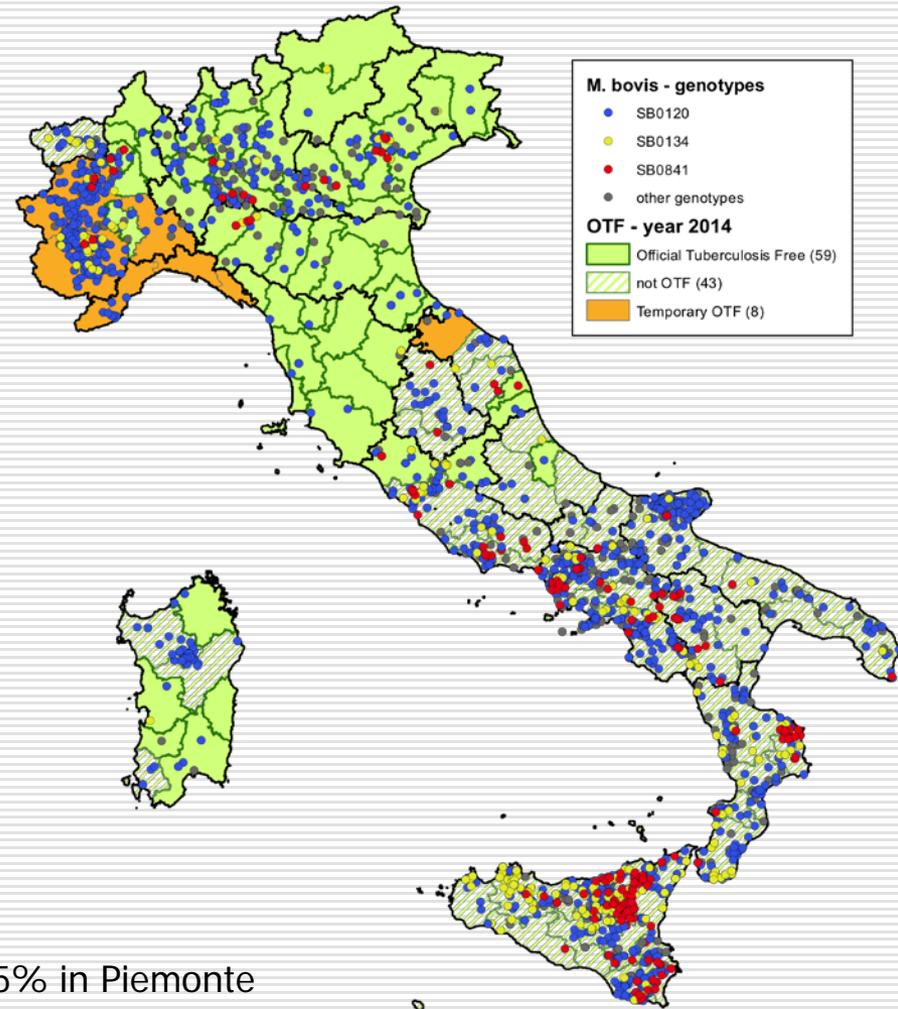
SB0134: 10,1% (*M. bovis*)

SB0841: 6,2% (*M. bovis*)

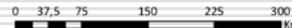
SB0418: 5,16% (*M. caprae*)

Presenza *M. caprae* in Italia nel 9,2% dei focolai

Distribuzione geografica degli spoligotipi maggiormente diffusi di M. bovis 2000-2014



Distribuzione in tutta la penisola, SB0120 > 65% in Piemonte

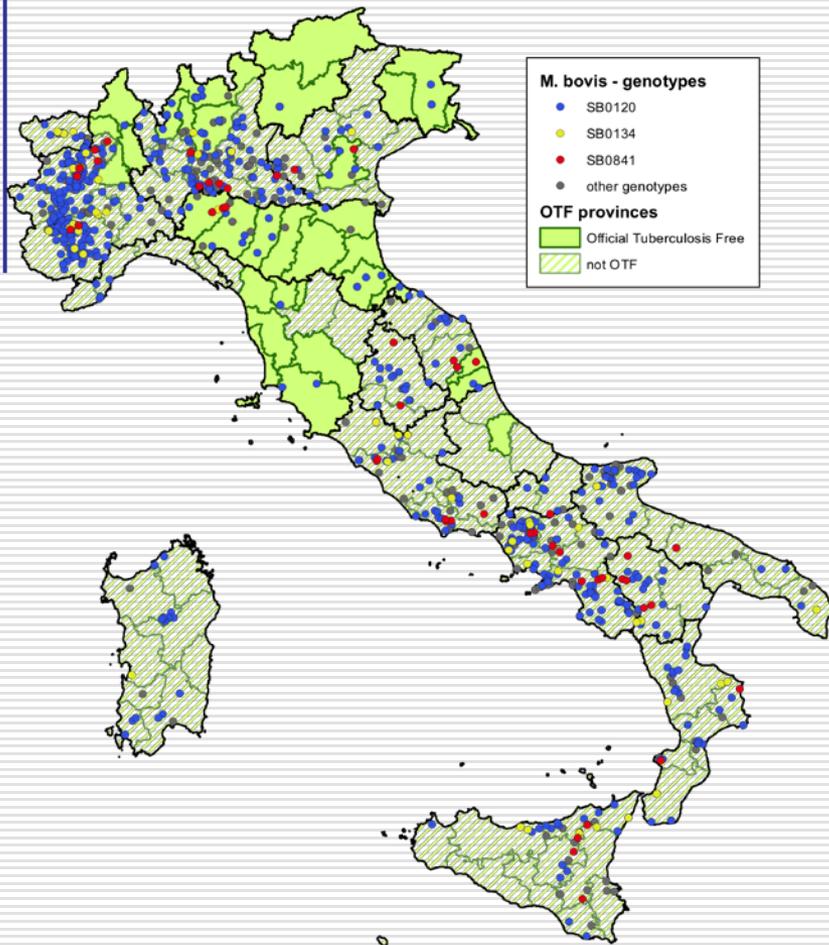


Distribuzione geografica dei genotipi di *M. bovis*

2000-2007

BOVINE TUBERCULOSIS IN ITALY - YEAR 2000/2007

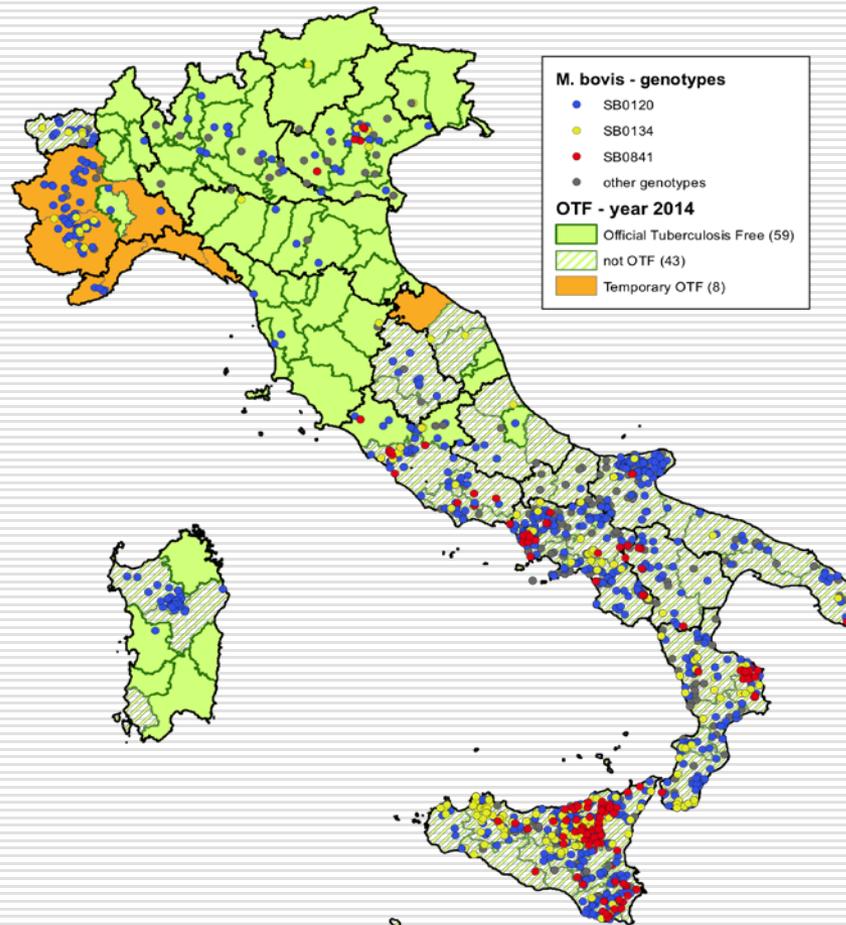
update 31/12/2014



2008-2014

BOVINE TUBERCULOSIS IN ITALY - YEAR 2008/2014

update 31/12/2014



0 37,5 75 150 225 300 Km



0 37,5 75 150 225 300 Km

Maggior parte dei ceppi analizzati 1° periodo del NI: rete raccolta efficiente NI ma non nel Sud, 2° periodo NI OTF

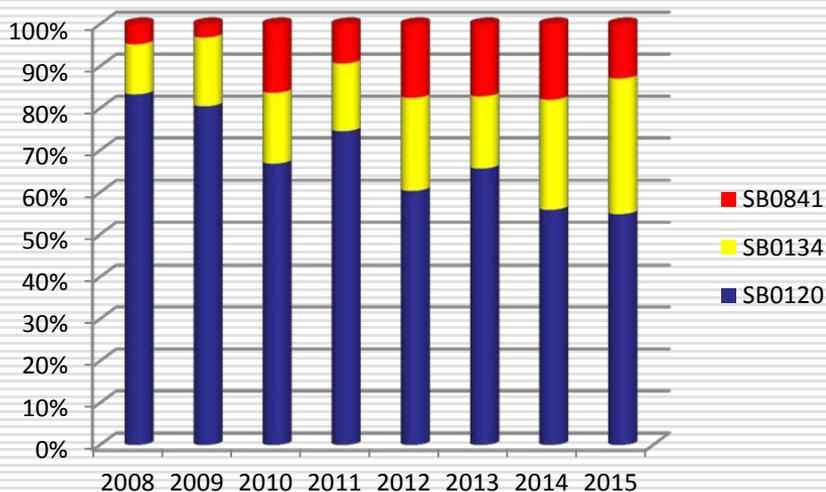


Distribuzione geografica dei genotipi di *M. bovis*

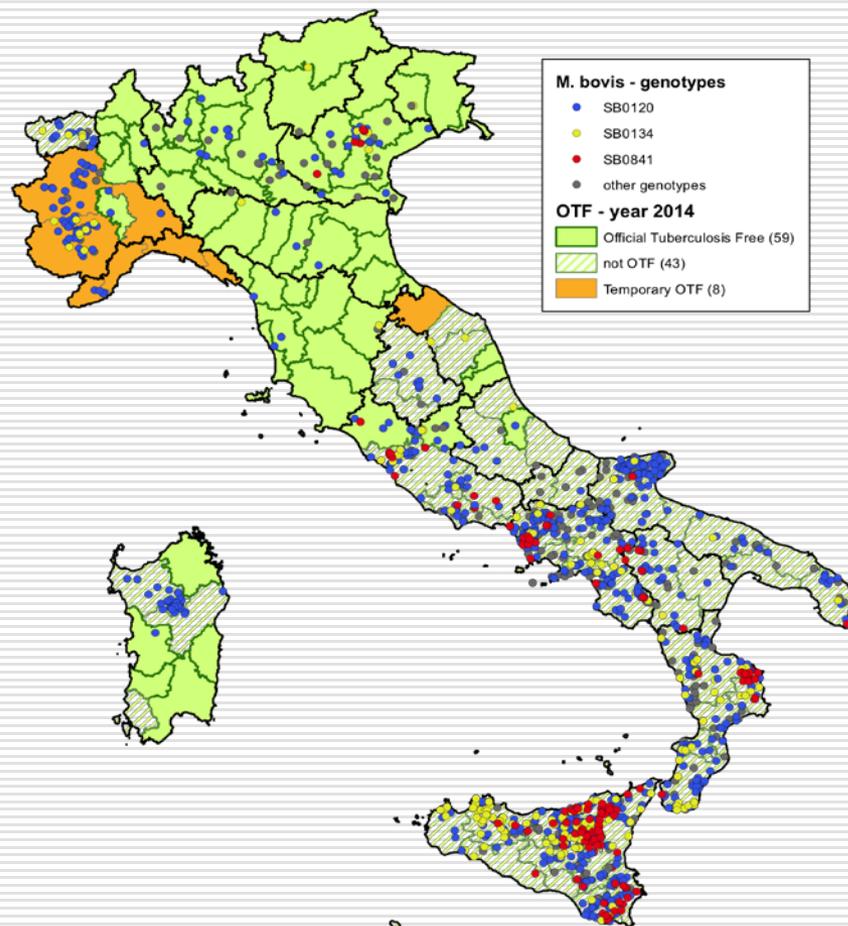
BOVINE TUBERCULOSIS IN ITALY - YEAR 2008/2014

update 31/12/2014

Frequenza spoligotipi



Diminuzione della frequenza di SB0120 e maggiore freq. SB0134 e SB0841 corrispondente ad aumento Frequenza di qs spoligotipi in Sicilia.



0 37,5 75 150 225 300 Km



Distribuzione geografica degli spoligotipi maggiormente diffusi in Italia dal 2008-2014.

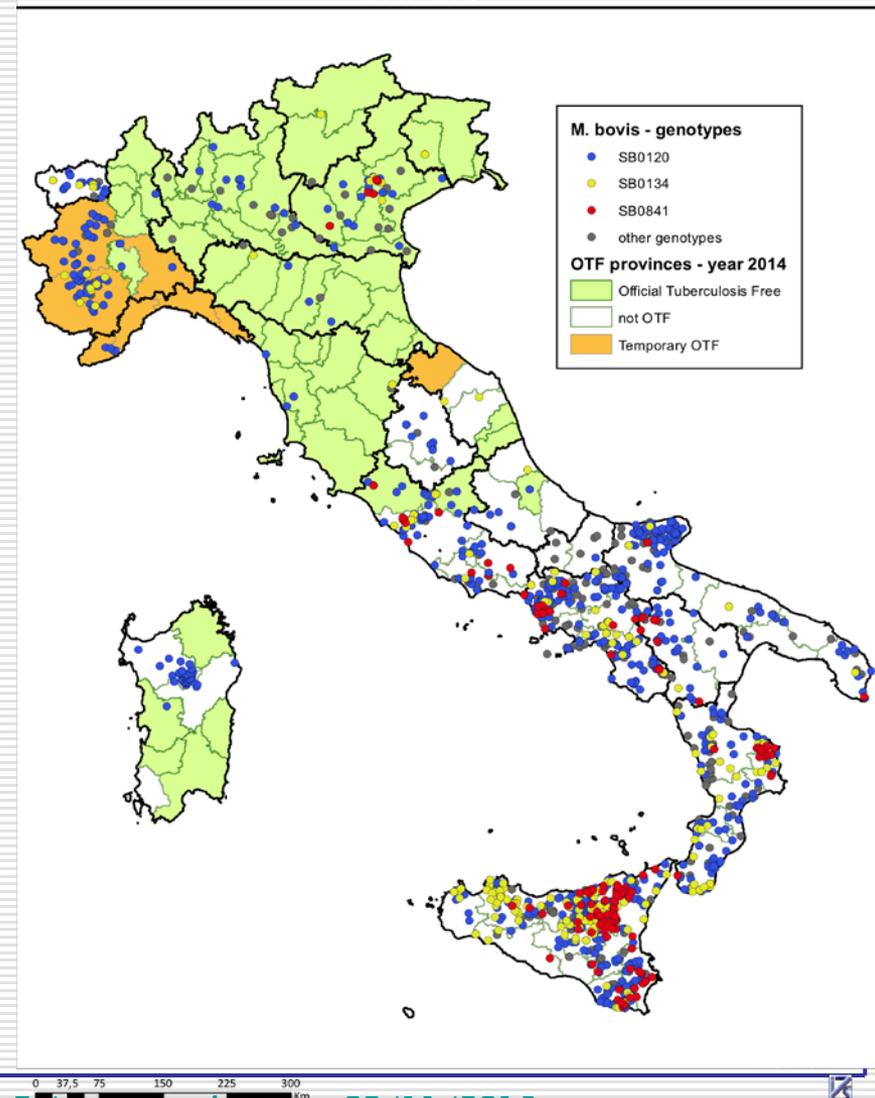
Analisi spoligotyping combinata con MLVA (12 marcatori VNTR) applicata dal 2008:

Aumenta capacità differenziativa

2518 ceppi *M. bovis*/*M. caprae* isolati da 1809 focolai bovino/bufalo sono stati differenziati in 748 genotipi.

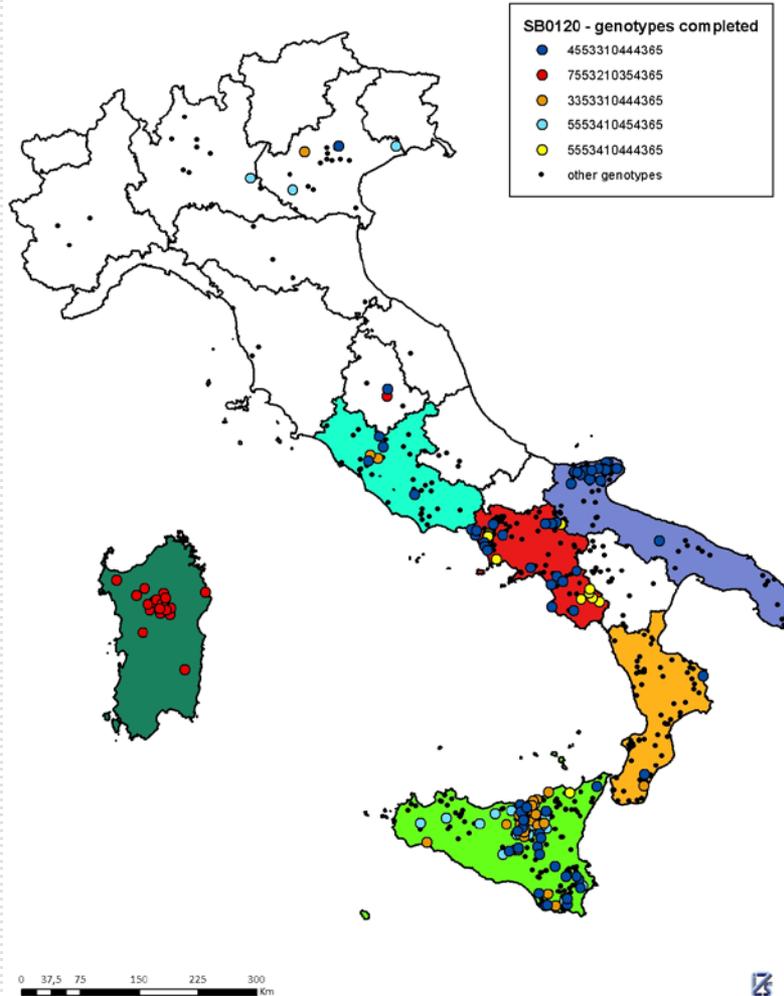
BOVINE TUBERCULOSIS IN ITALY - YEAR 2008/2014

update 31/12/2014



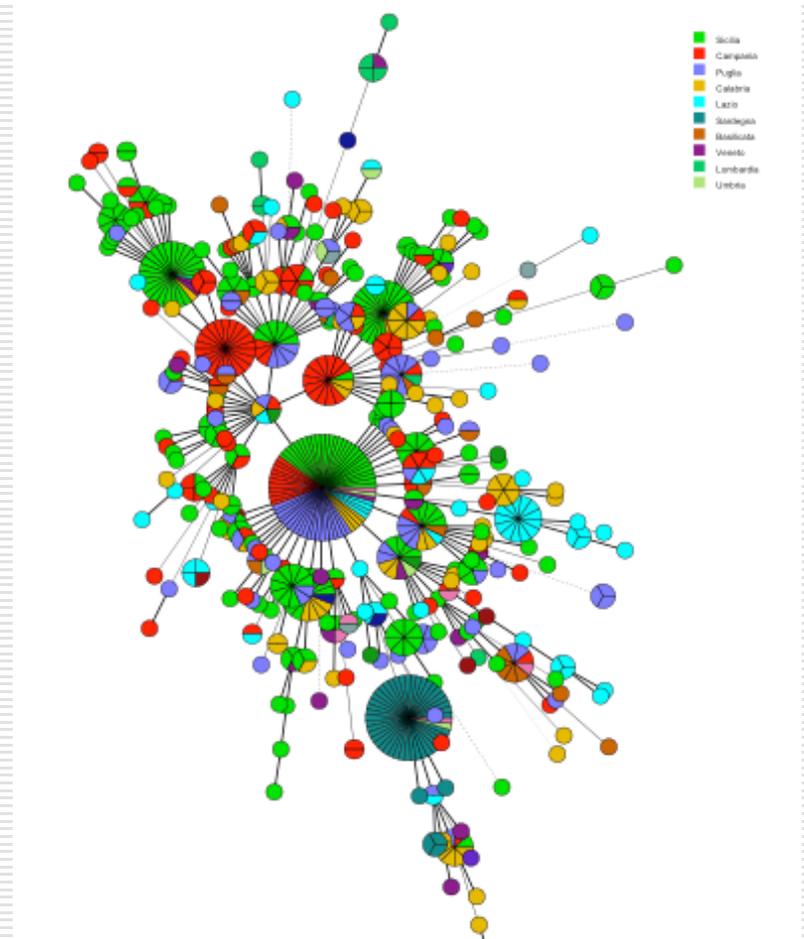
Distribuzione geografica genotipi maggiormente diffusi SB0120

BOVINE TUBERCULOSIS IN ITALY - YEAR 2008/2015
update 31/05/2015



Genotipi + frequente diffuso in Sicilia, Puglia, Campania, alcuni mostrano precisa clusterizzazione geografica: 1 Sardegna, 1 Campania, 1 Sicilia

Analisi MLVA con 12 marcatori VNTR differenzia SB0120 in 319 genotipi (20 con n° focolai > 10)



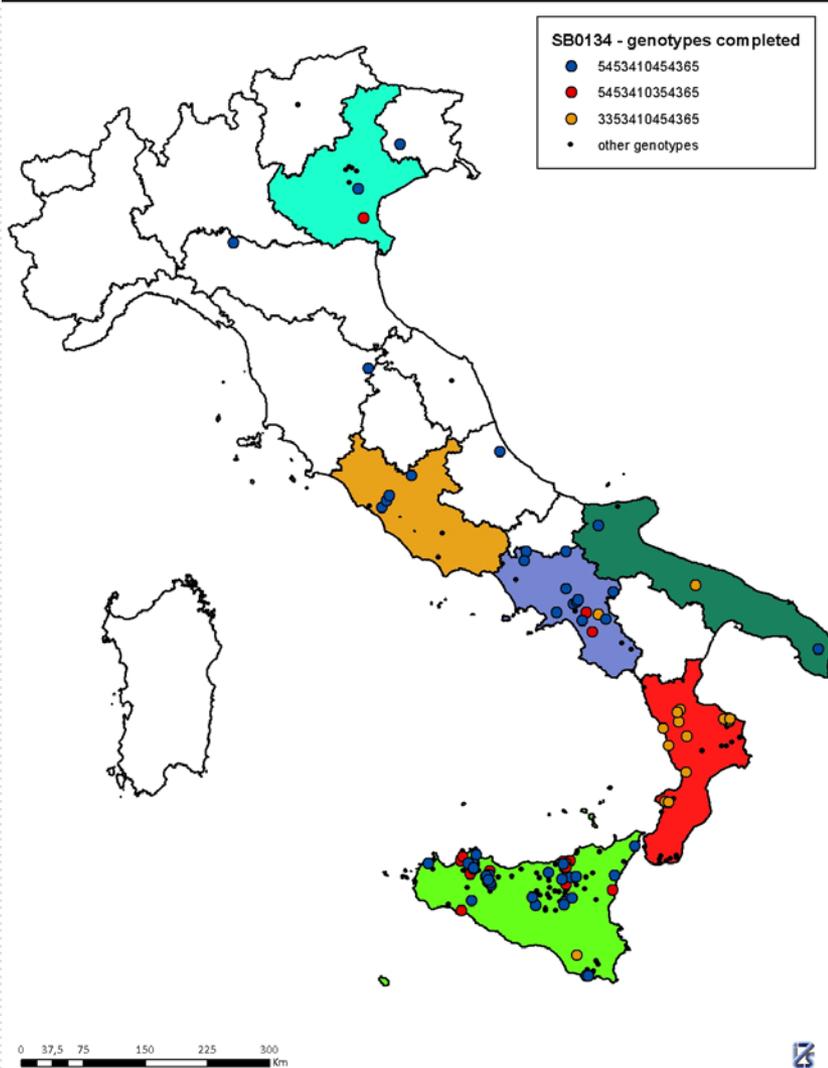
Analisi filogenetica MST: rappresentazione genotipi: frequenza dimensione sfera, colore regione. Alcuni di questi erano presenti anche in altre regioni sono stati ridotti piani eradicazione. Notiamo associati ai cluster principali molte varianti genetiche risultato microevoluzione nel tempo cluster principali.



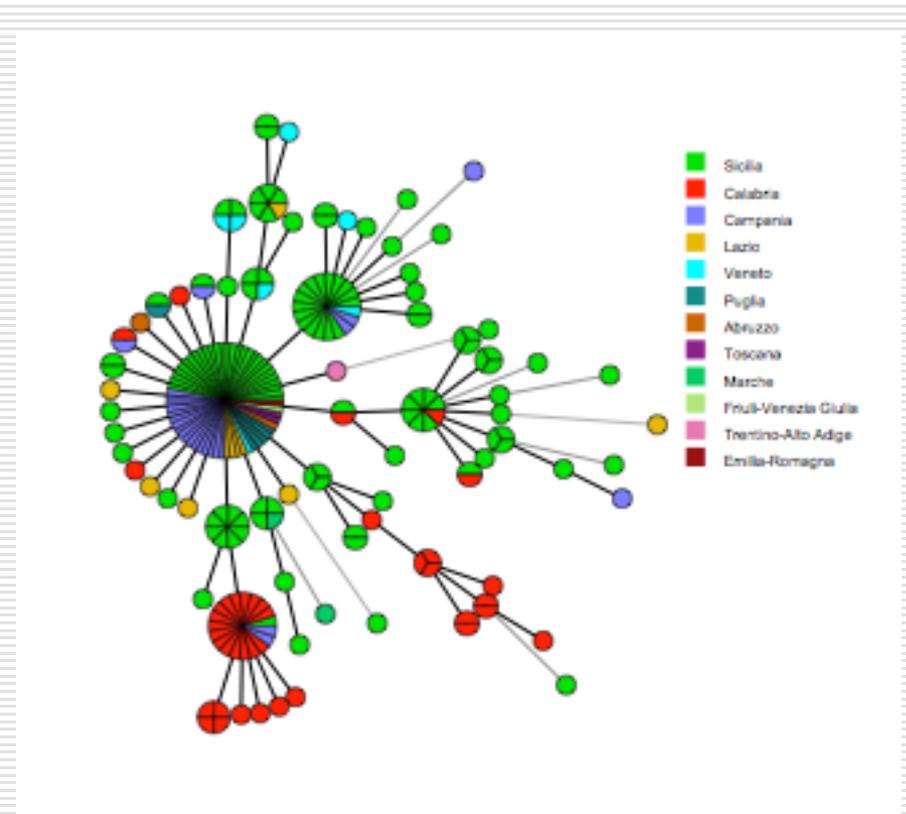
Distribuzione geografica dei genotipi maggiormente diffusi di SB0134

BOVINE TUBERCULOSIS IN ITALY - YEAR 2008/2015

update 31/05/2015



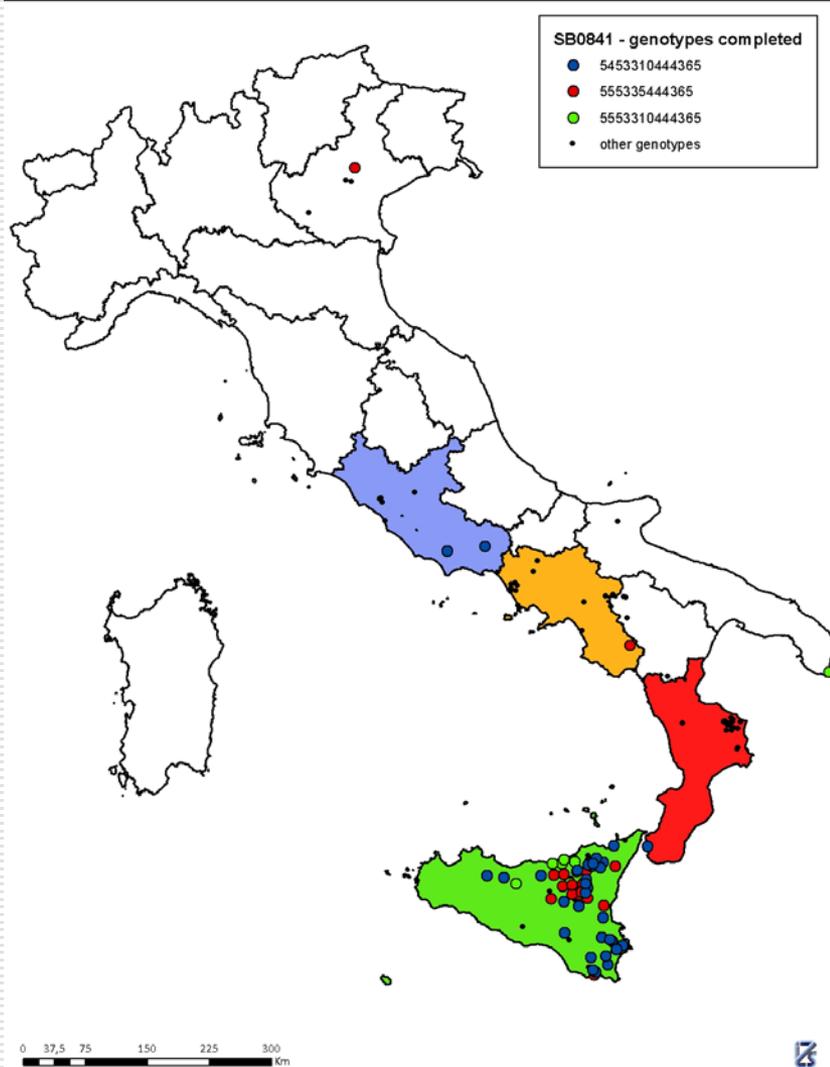
Analisi MLVA con 12 marcatori VNTR differenza SB0134 in 76 genotipi



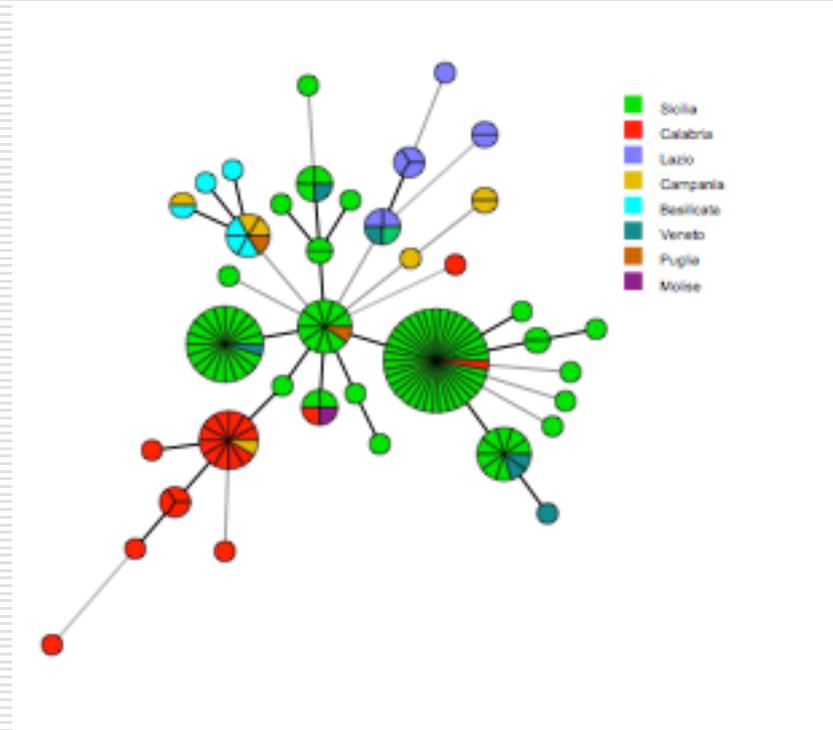
Distribuzione geografica dei genotipi maggiormente diffusi di SB0841.

BOVINE TUBERCULOSIS IN ITALY - YEAR 2008/2015

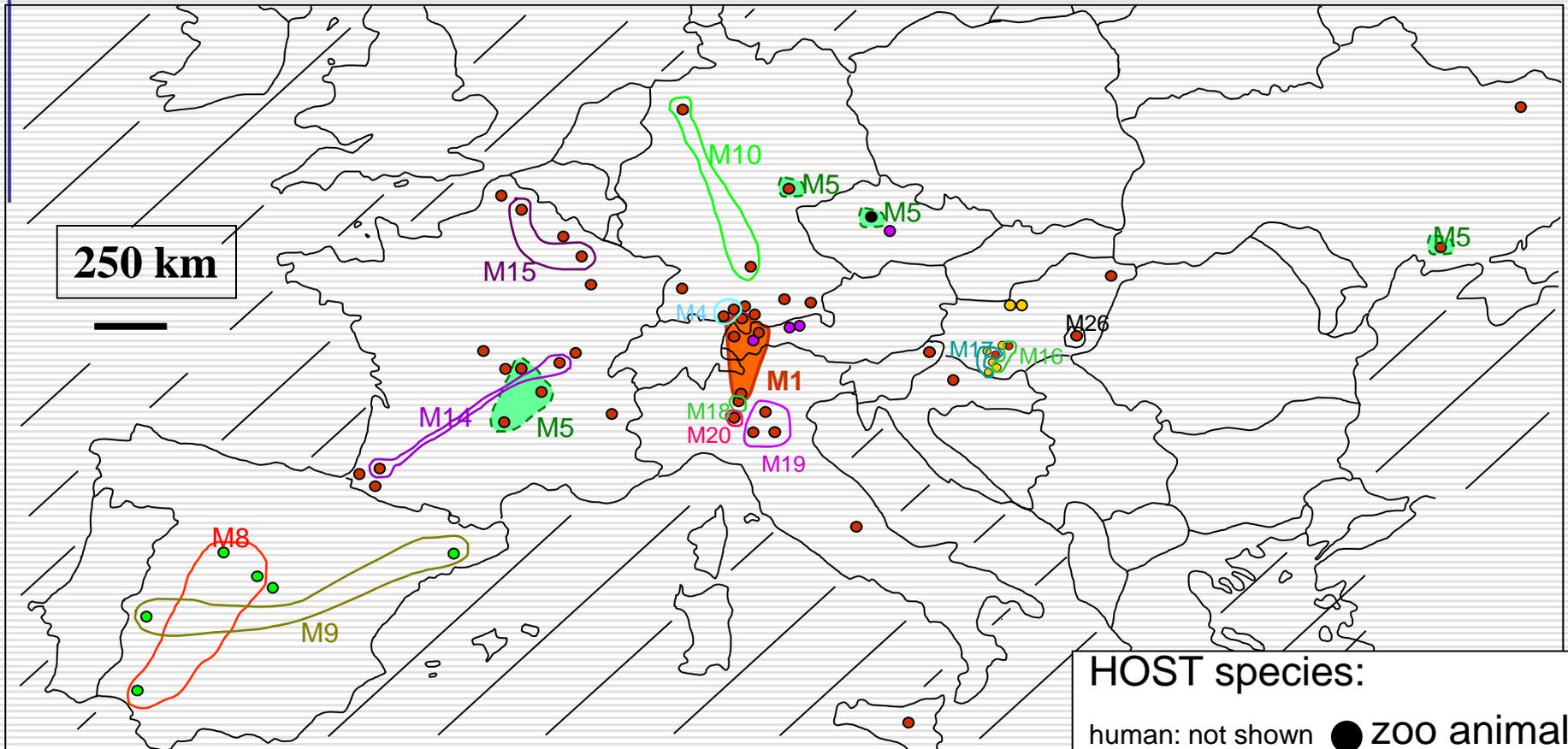
update 31/05/2015



Analisi MLVA con 12 marcatori VNTR differenzia SB0841 in 41 genotipi



M. caprae: distribuzione geografica



Prodingher et al. 2005: *M. caprae* segnalato in diversi paesi europa centrale, europa dell'est, Francia, Spagna nel bovino, fauna selvatica

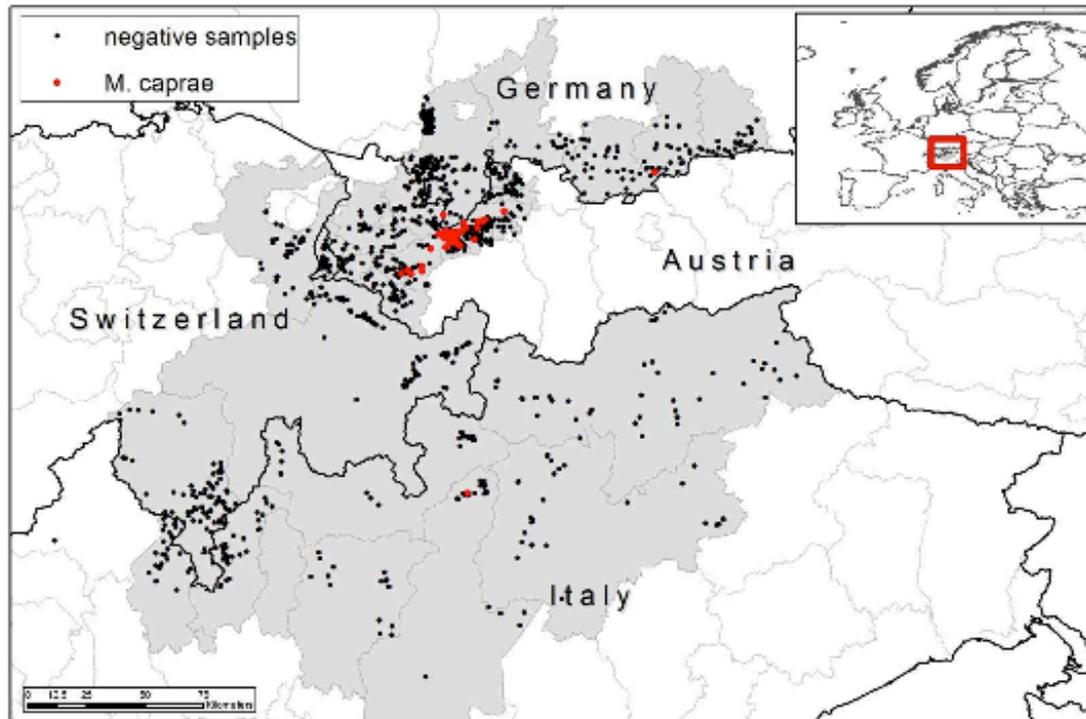
M. caprae: nel cervo in Europa



M2: Reed deer samples analyzed



Results - spatial distribution



Copyright: DI Michael Schwarz DSR AGES

Studio di prevalenza della TB nella fauna selvatica delle Alpi pubblicato da Fink et al. (2015) eseguito su 1655 cervi della Svizzera, Italia, Austria, Germania: cervo è ospite di mantenimento di *M. caprae* ed esistono delle aree hot-spot (Lechtal, Vorarlberg) evidenziate in rosso.



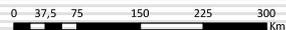
Distribuzione geografica *M. caprae* in Italia 2000-2014



bovis
OTF - year 2014
Official Tuberculosis Free (59)

9,2%

Prevalenza del 9,2% ma con
diversa distribuzione territoriale

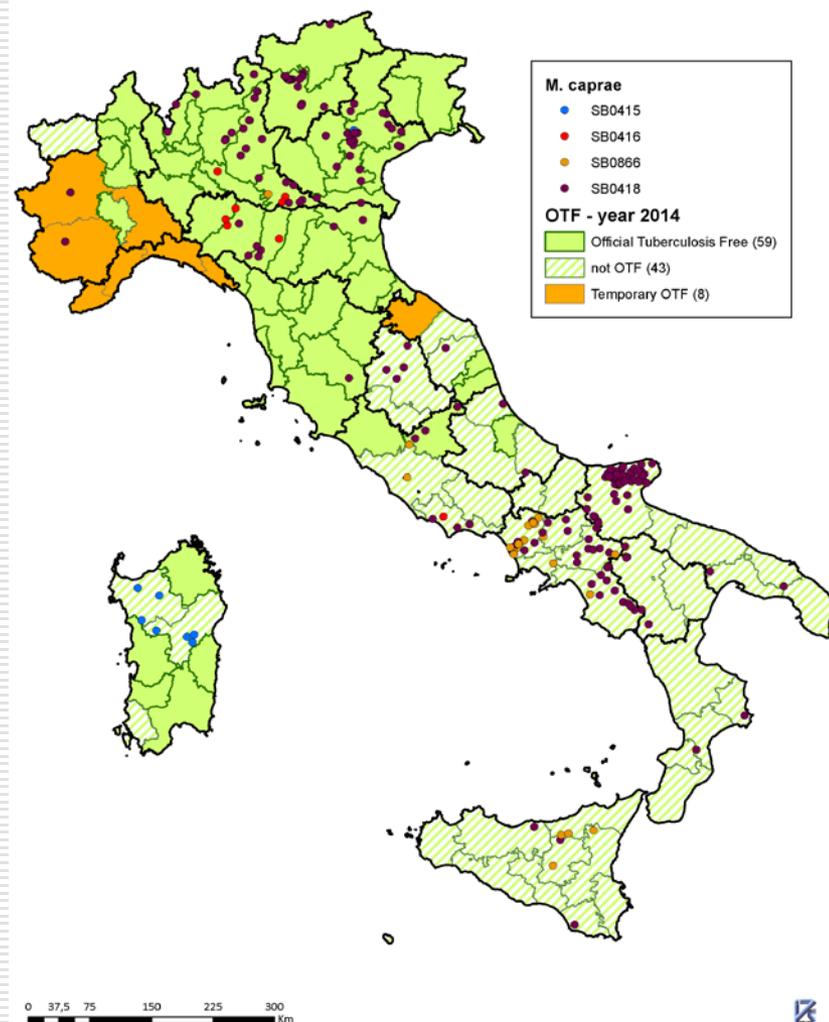


Distribuzione geografica spoligotipi *M. caprae* in Italia

M. caprae: sono presenti 11 spoligotipi diversi di cui 7 segnalati sporadicamente 4 presenti in più di 10 allevamenti con una precisa localizzazione geografica

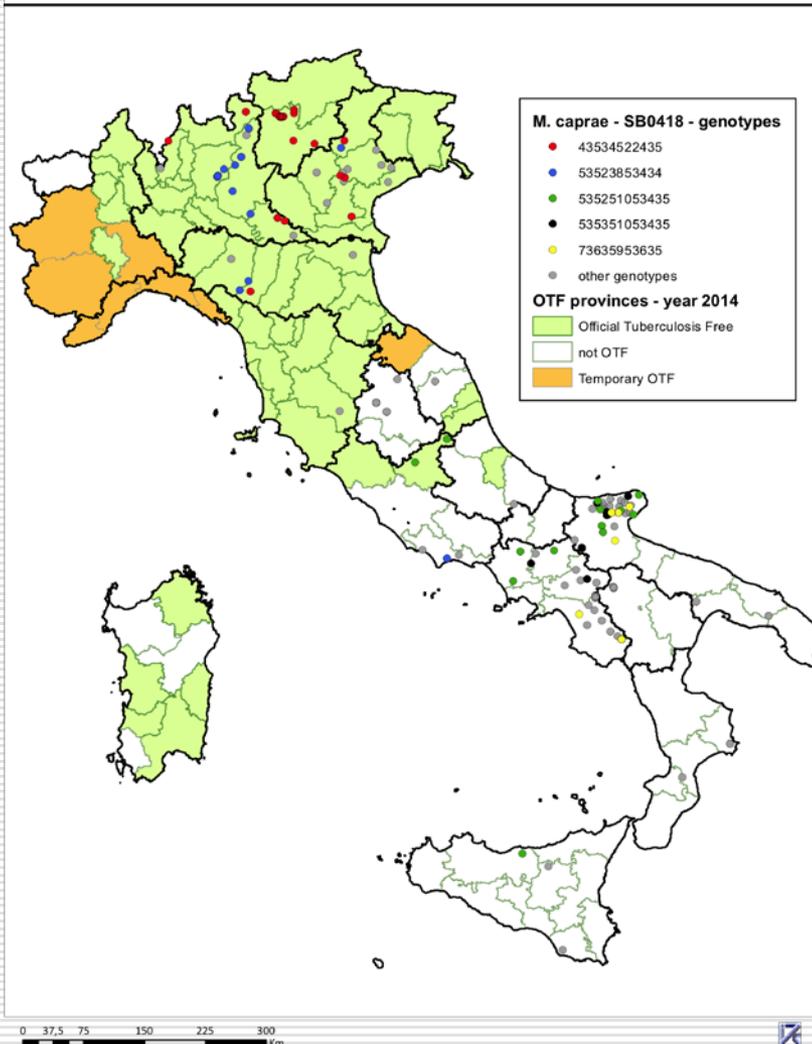
Spoligotype	N° strains	N° outbreaks	%
SB0418	340	198	76,7
SB0866	34	25	9,6
SB0416	18	12	4,6
SB0415	13	11	4,2
SB1886	5	5	1,9
SB1887	2	2	0,7
SB1883	1	1	0,3
SB1884	1	1	0,3
SB1573	1	1	0,3
SB2174	1	1	0,3
SB2223	2	1	0,3
Total	418	258	

BOVINE TUBERCULOSIS IN ITALY - YEAR 2000/2014 update 31/12/2014

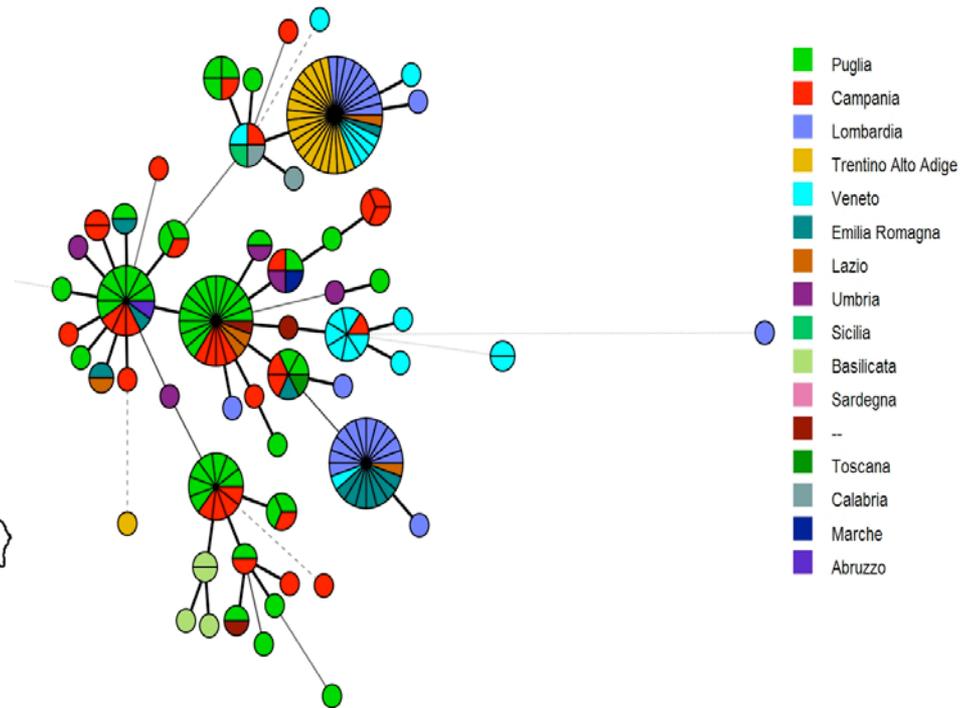


Distribuzione geografica dei 5 genotipi maggiormente prevalenti di SB0418

BOVINE TUBERCULOSIS IN ITALY - YEAR 2000/2014
update 31/12/2014



Analisi MLVA con marcatori VNTR differenza SB0418 in 53 genotipi



Diversa distribuzione geografica: 2 nel Nord Italia (focolai di TN e Vallecamonica) ricostruzione epidemiologica, minore dispersione genetica, 3 Sud Italia varianti genetiche da microevoluzione nel tempo dai cluster principali

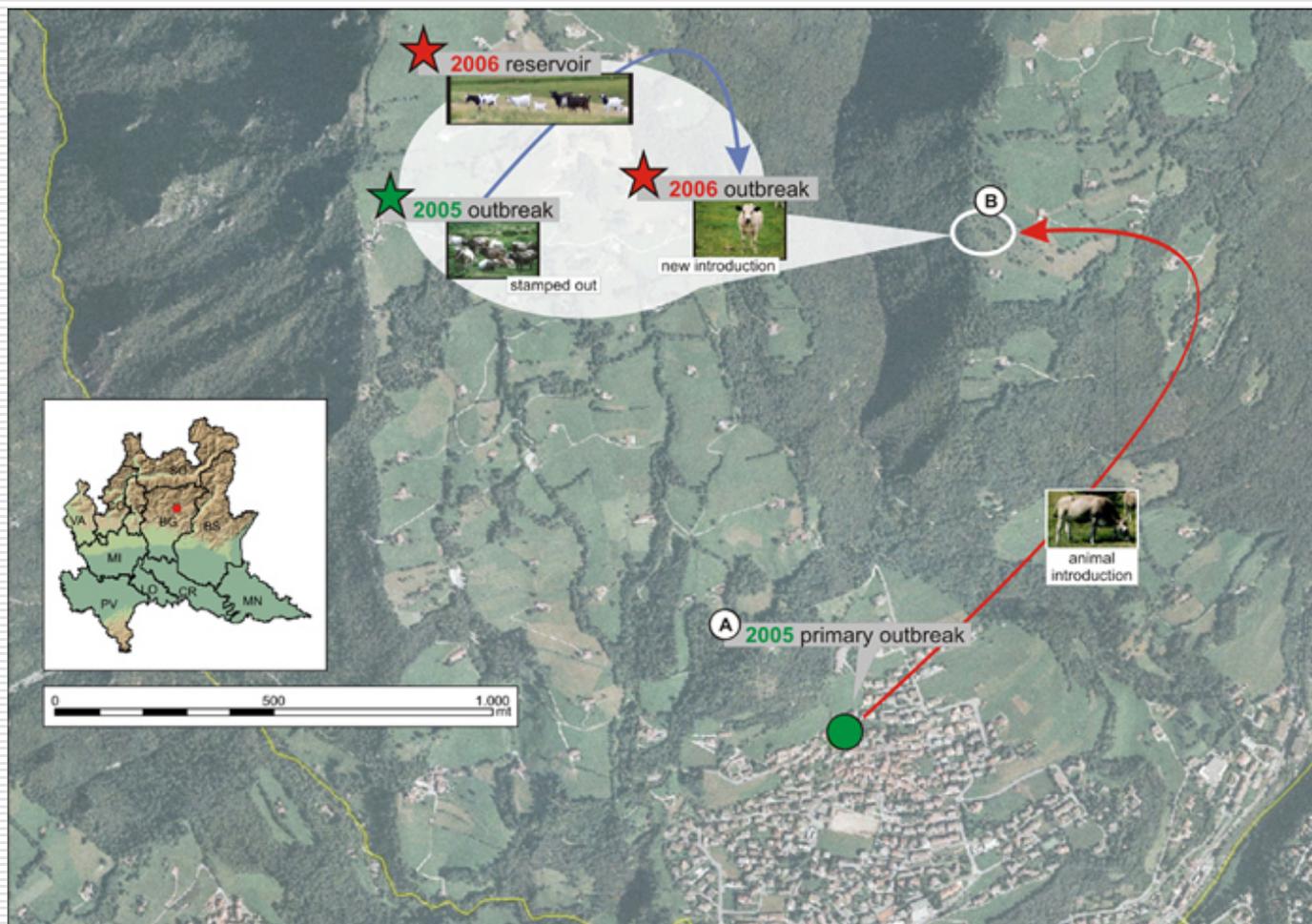


Riassumendo.....prima degli esempi

- Tipizzazione molecolare ci ha consentito di studiare:
- La struttura della popolazione di *M. bovis*/*M. caprae* in Italia negli ultimi 15 anni.
- Spoligotyping + MLVA 12 marcatori: caratterizzazione genetica più dettagliata, identificazione di clusters geografici, correlazioni filogenetiche.
- La maggior parte dei focolai è rappresentata da pochi genotipi prevalentemente localizzati nel Sud Italia alcuni diffusi in passato in altre regioni. Molte varianti genetiche associate ai clusters principali.
- Valido supporto alle indagini epidemiologiche tradizionali

costituiscono il punto di partenza
Genotipo diffuso non fornisce informazioni utili.

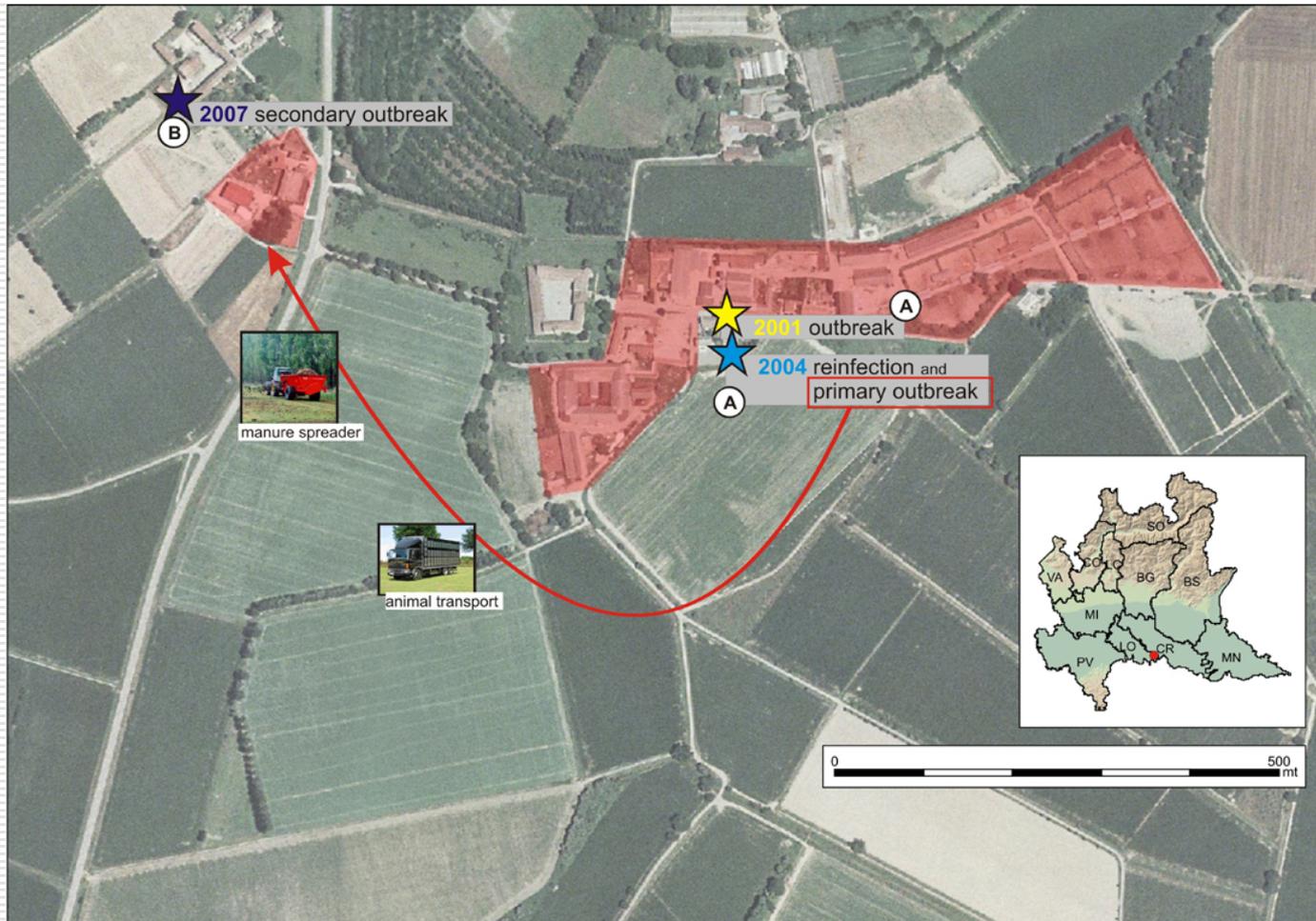
Esempio rintraccio epidemiologico (coinvolti bovini e capre)



YEAR	HERD	SPOLIGO TYPE	ETR A	ETR B	ETR C	ETR D	ETR E	MIRU 2	MIRU 10	MIRU 20	MIRU 23	MIRU 24	MIRU 26	MIRU 27	MIRU 39	MIRU 40	VNTR 2163a	VNTR 2163b	VNTR 3155	VNTR 1982	VNTR 1612	VNTR 4052	VNTR 1095	VNTR 3232	VNTR 3336
2005	B	SB020	5	4	5	3	2	2	2	2	4	2	5	2	2	2	10	4	3	3	6	4	4	6	12
2006	B	SB020	5	4	5	3	2	2	2	2	4	2	5	2	2	2	10	4	3	3	6	4	4	6	12
2006	B	SB020	5	4	5	3	2	2	2	2	4	2	5	2	2	2	10	4	3	3	6	4	4	6	12

Areale dei focolai in Val Seriana e rispettivi profili genetici

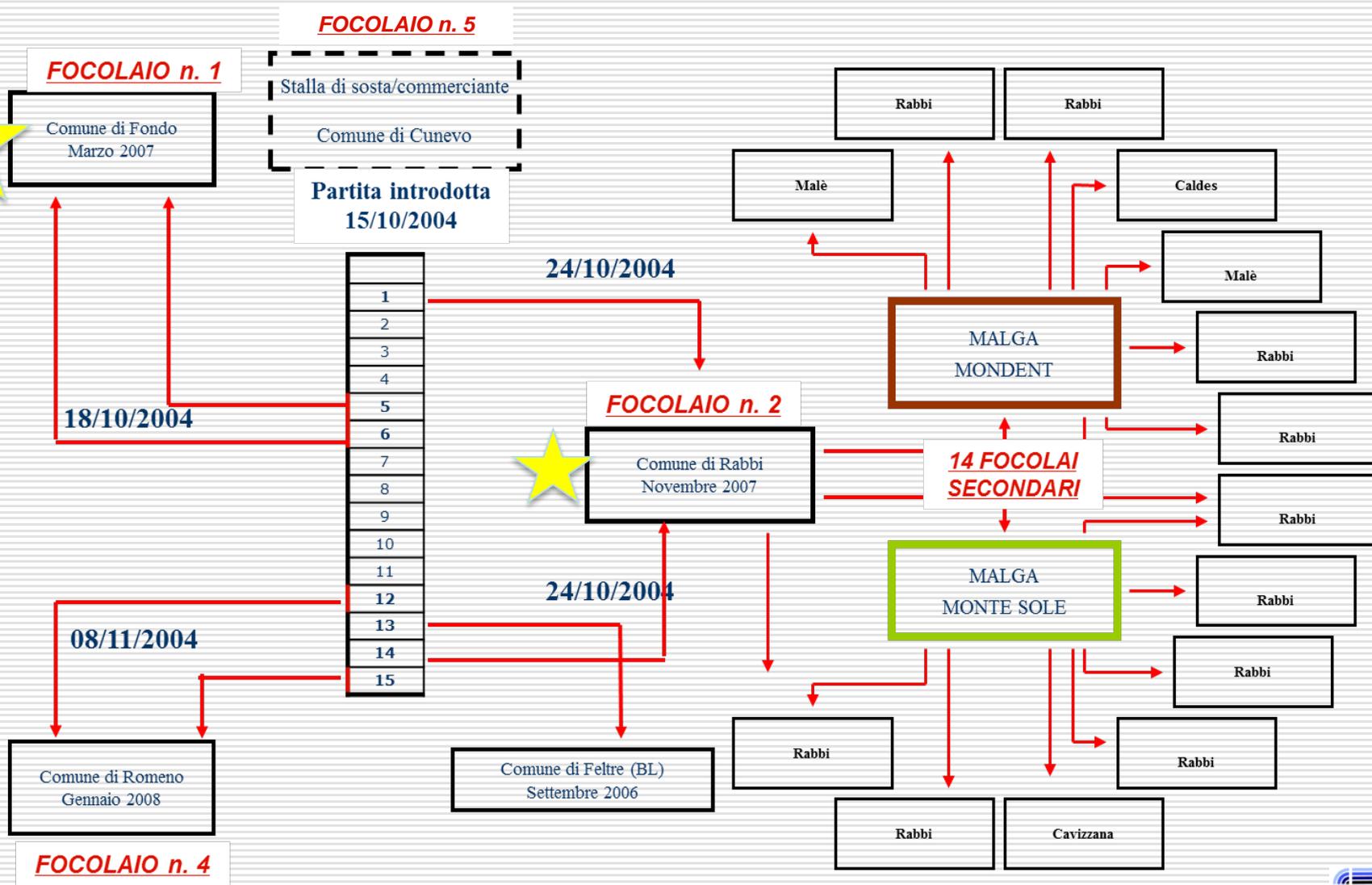
Esempio rintraccio epidemiologico (*M. bovis*)



YEAR	HERD	SPOLIGOTYPE (spacers deleter)	ETR A	ETR B	ETR C	ETR D	ETR E	MIRU 2	MIRU 10	MIRU 20	MIRU 23	MIRU 24	MIRU 26	MIRU 27	MIRU 39	MIRU 40	VNTR 2163a	VNTR 2163b	VNTR 3155	VNTR 1982	VNTR 1612	VNTR 4052	VNTR 1895	VNTR 3232	VNTR 3336
2001	A	"6,7,29,30,31,32"	5	5	4	3	2	2	2	2	4	2	5	2	2	2	10	4	3	6	6	4	4	6	13
2004	A	"6,7,29,30,31,32"	5	5	4	3	2	2	2	2	4	2	5	2	2	2	10	4	3	6	6	4	4	6	13
2007	B	"6,7,29,30,31,32"	5	5	4	3	2	2	2	2	4	2	5	2	2	2	10	4	3	6	6	4	4	6	13

Areale dei focolai Lodi e rispettivi profili genetici

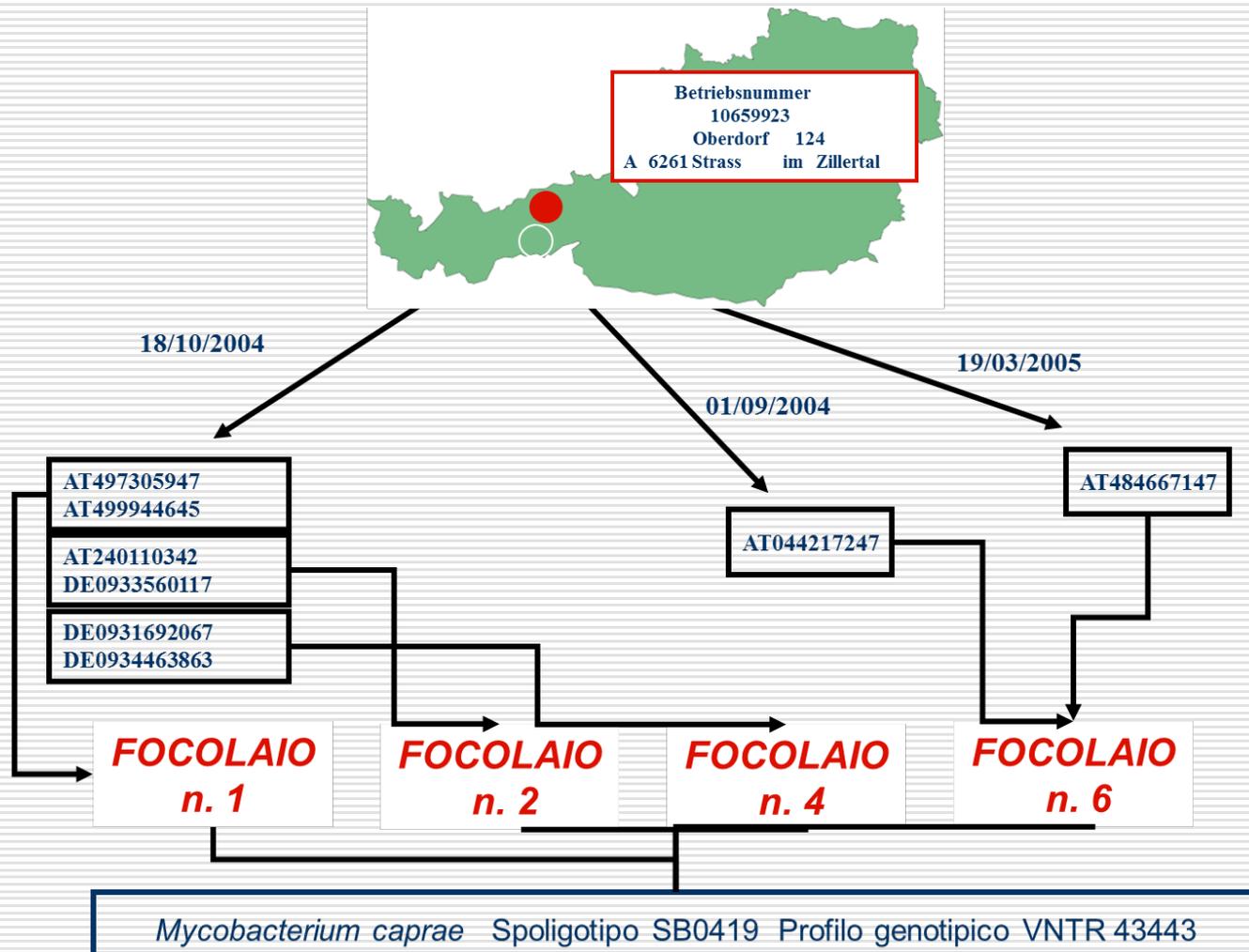
Esempio rintraccio epidemiologico (*M. caprae*)



Focolai Provincia di Trento anno 2007: Correlazioni epidemiologiche partita introdotto nel 2004



Esempio rintraccio epidemiologico (*M. caprae*)



Rintraccio dei capi infetti dei focolai 1,2,4

CONCLUSIONI

- Controllo anagrafe/identificazione animali
- Corretta applicazione/interpretazione dell'IDT
- Sorveglianza al macello
- Isolamento e identificazione *M. bovis* e tipizzazione molecolare dal CRN-TB;
- Indagini epidemiologiche approfondite in casi di focolaio;
- Combinazione dati epidemiologici derivati da indagini convenzionali a quelli derivati dalla tipizzazione molecolare;
- Tempestiva estinzione/rimozione dei focolai

grazie per l'attenzione

Hanno collaborato per il CRN-TB:

G. Alborali, M. B. Boniotti,

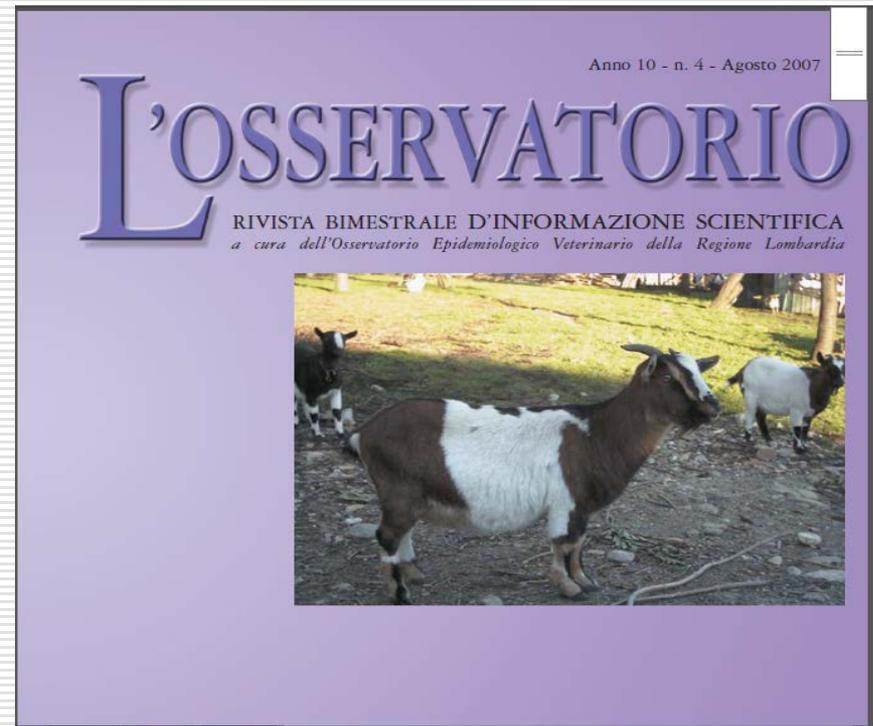
M. D'Incau, D. Avisani,

M. Chiari , G. Zanardi

e Sig. ra M. Guerini, Ing. M. Tironi,

A. Moneta, I. Barraco ,A. Mangeli,

D. Loda



www.izsler.it

IZSLER 