

PCR-baserede typningsmetoder
anvendt i tarmbakteriologien
eller
Erfaringer med brug af MLVA i
overvågningen af bakterielle
zoonoser

Steen Ethelberg, set@ssi.dk
Seniorforsker i epidemiologi
Typningscenteret, ABMP

Sygdomsovervågning

- Indsamling
 - Bearbejdning – Analyse – Fortolkning
- Ageren
 - Epi udredning – Kontrolforanstaltninger – Forebyggelse
- Formål (i tarmbakterie sammenhæng):
 - Finde og opklare udbrud
 - Kortlægge trends
 - Evaluere kontrol strategier
 - Finde risikofaktorer

Zoonotiske bakterier

Typning i hele jord-til-bord kæden

Isolater fra overvågningen af dyr og fødevarer

- **Understøtte hypoteser om udbrud**
 - påvise epidemiske typer
 - påvise smittekilder og smitteveje
 - påvise dyre-reservoir
- **At følge udviklingen løbende**
 - trends
 - ”smittekilde-regnskab”

National overvågning af tarmbakterier på SSI

Registrering:

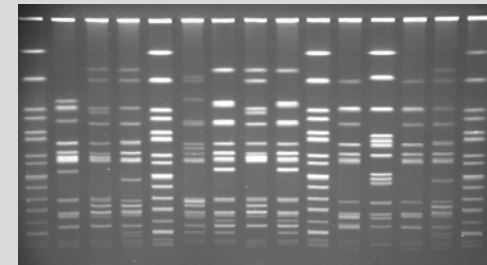
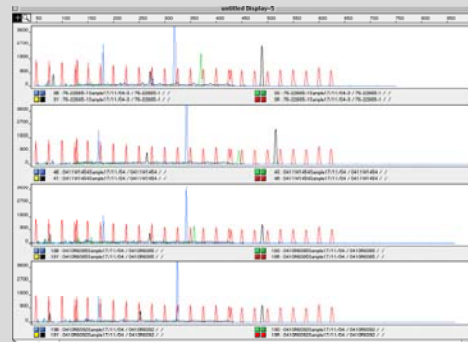
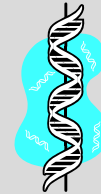
Episoder registreres og isolater modtages

SSI's dyrkningscenter Regionerne



Laboratoriet:

Karakterisering af isolater:
serotypning, molekylær typning,
resistensbestemmelse, fagtypning



Overvågning ved typning, SSI

Rutinemæssig typning af isolater fra patienter:

- ***Salmonella***: Serotype, fagtype, resistensprofil, PFGE, MLVA
- **Verocytotoksin-producerende *E. coli*** (VTEC): Serotype, virulensprofil, PFGE
- ***Listeria***: Serogruppe, riboprint, PFGE
- ***Campylobacter***: ÷ (Riboprint, PFGE ad hoc)
- ***Shigella, Yersinia***: species, sero (PFGE ad hoc)

PCR-baserede typningsmetoder

- MLVA
- PCR-RFLP (PCR +restriktionsfragment analyse)
- Ribotypning
- Sekventering af gener (MLST, virulens gener)

PFGE (Puls-felt gel-elektroforese)

- Vigtigste typningsmetode for tarmbakterier
- PulseNet-US stor succes
 - Omfatter *Salmonella*, VTEC (O157), *Listeria* og *Shigella*





BioNumerics database med typningsdata

Dice (Opt 1.00%) (Tol 1.0%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

PFGE-Xbal

Serotype FT Amt Dato Alder Køn Amp Apr

	Typhimurium		ÅRHUS AMT	2004-10-08	1	K	R	S	I	S
	Typhimurium	193	RINGKØBING AMT	2004-10-21	45	M	S	S	S	S
	Typhimurium	non	SØNDERJYLLANDS AMT	2004-09-15	70	K	R	S	S	S
	Typhimurium	usp	RIBE AMT	2003-12-02	46	K	S	S	S	S
	Typhimurium	NT	KØBENHAVNS AMT	2004-10-29	82	M	R	S	S	S
	Typhimurium	NT	FREDERIKSBORG AMT	2004-10-28	41	K	R	S	S	S
	Typhimurium		FYNS AMT	2004-10-06	36	K	R	S	S	S
	Typhimurium		KØBENHAVNS KOMMU.	2004-11-08	29	M	R	S	S	S
	Typhimurium		ÅRHUS AMT	2004-11-10	42	M	R	S	S	S
	Typhimurium		KØBENHAVNS KOMMU.	2004-11-03	55	K	R	S	S	S
	Typhimurium	usp	ÅRHUS AMT	2004-10-03	11	M	S	S	S	S
	Typhimurium	44					S	S	S	S
	Typhimurium	20	ÅRHUS AMT	2004-10-01	0	K	S	S	S	S
	Typhimurium	120	VESTSJÆLLANDS AMT	2004-10-15	55	M	S	S	S	S

Samarbejde med DFVF om fælles salmonella-PFGE database (humane, fødevare- og veterinære isolater)

MLVA

- Ny typningsmetode, bruges på SSI på *Salmonella* Typhimurium
- Sammenligner antallet af små DNA-repeats i nogle få bestemte områder af bakteriens genom.

Repetitive DNA-sekvenser

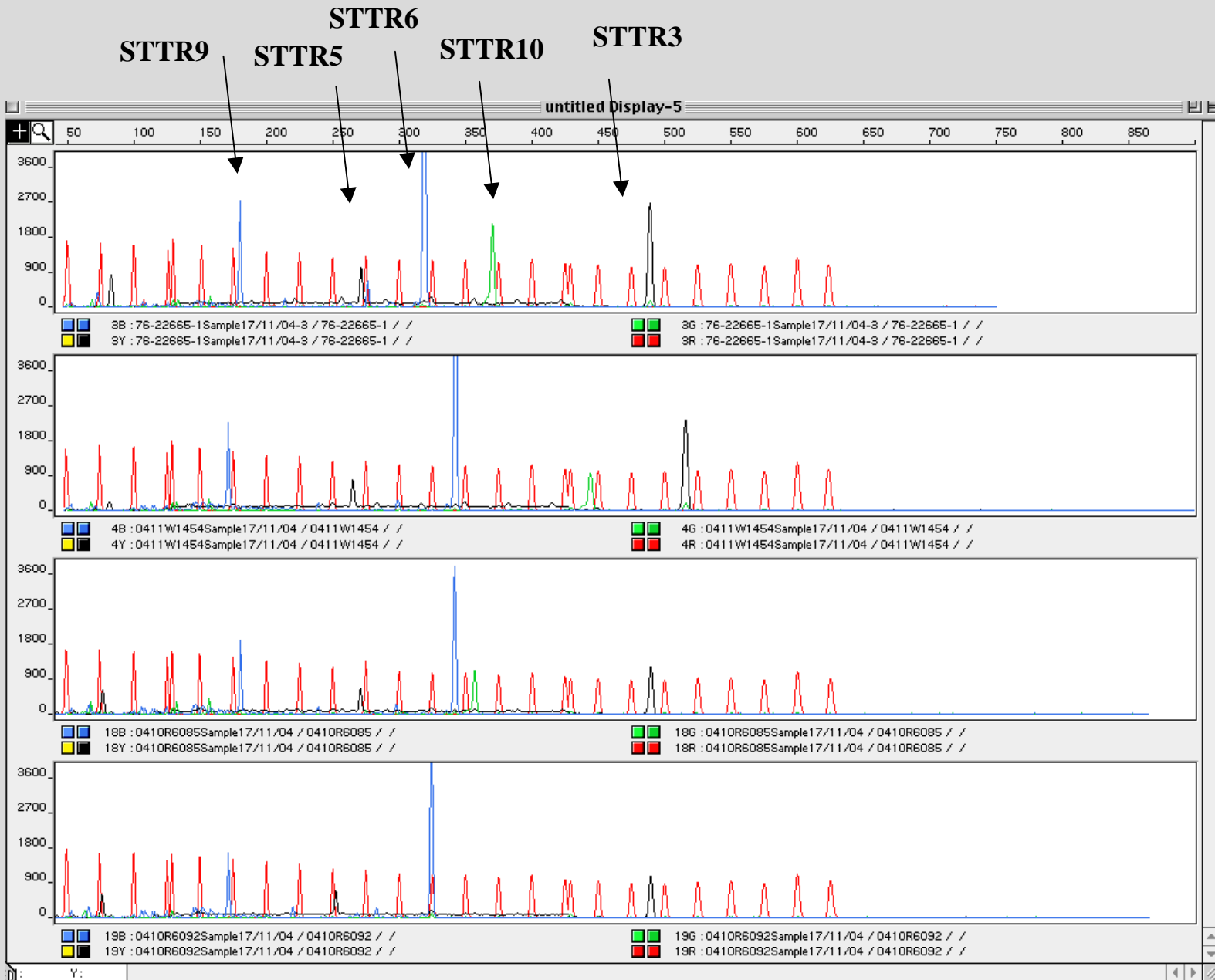
- Repetitive DNA-sekvenser fundet i mange bakterier
- Formentlig involveret i regulering af gen-ekspression
- Antal af repetitive sekvens units varierer fra stamme til stamme pga mispairing ved replikationen, hvilket resulterer i tilføjelse eller deletion af units
- DNA-sekvenser, som repræsenterer et enkelt locus med inter-individual længe-variation, kaldes et **V**ariable **N**umber of **T**andem **R**epeats (**VNTR**) locus
- Antallet af units er meget variabelt
 - Meget diskriminerende metode

MLVA

- Kombineret analyse af flere VNTR områder = **MLVA**
 - **M**ultiple **L**ocus **V**NTR **A**nalysis
- MLVA er udviklet for *S. Typhimurium* med brug af 5 VNTR områder, STTR3, 5, 6, 9 og 10
 - Repeteret enhed består af 6, 9 eller 33 bp.

PCR og data analyse

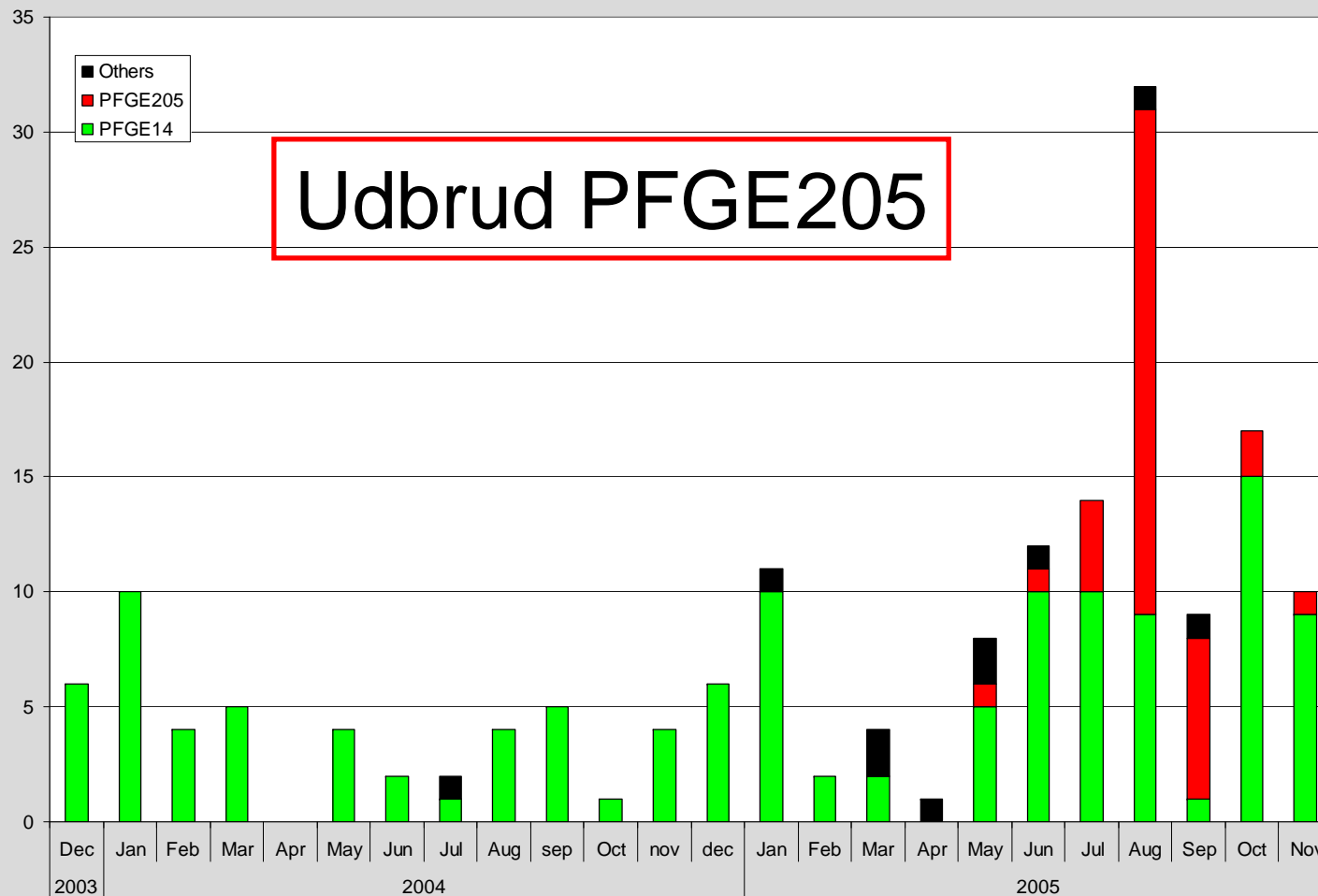
- Farvemærkede primere rettes mod det konserverede område omkring VNTR-området
- Multiplex PCR til alle 5 loci
- Bestemmelse af fragmentstørrelse på ABI310 sequencer
 - Kapillær elektroforese
- Data importeres til BioNumerics og MLVA typen bestemmes ud fra fragment størrelserne
 - Automatiseret ved brug af scripts



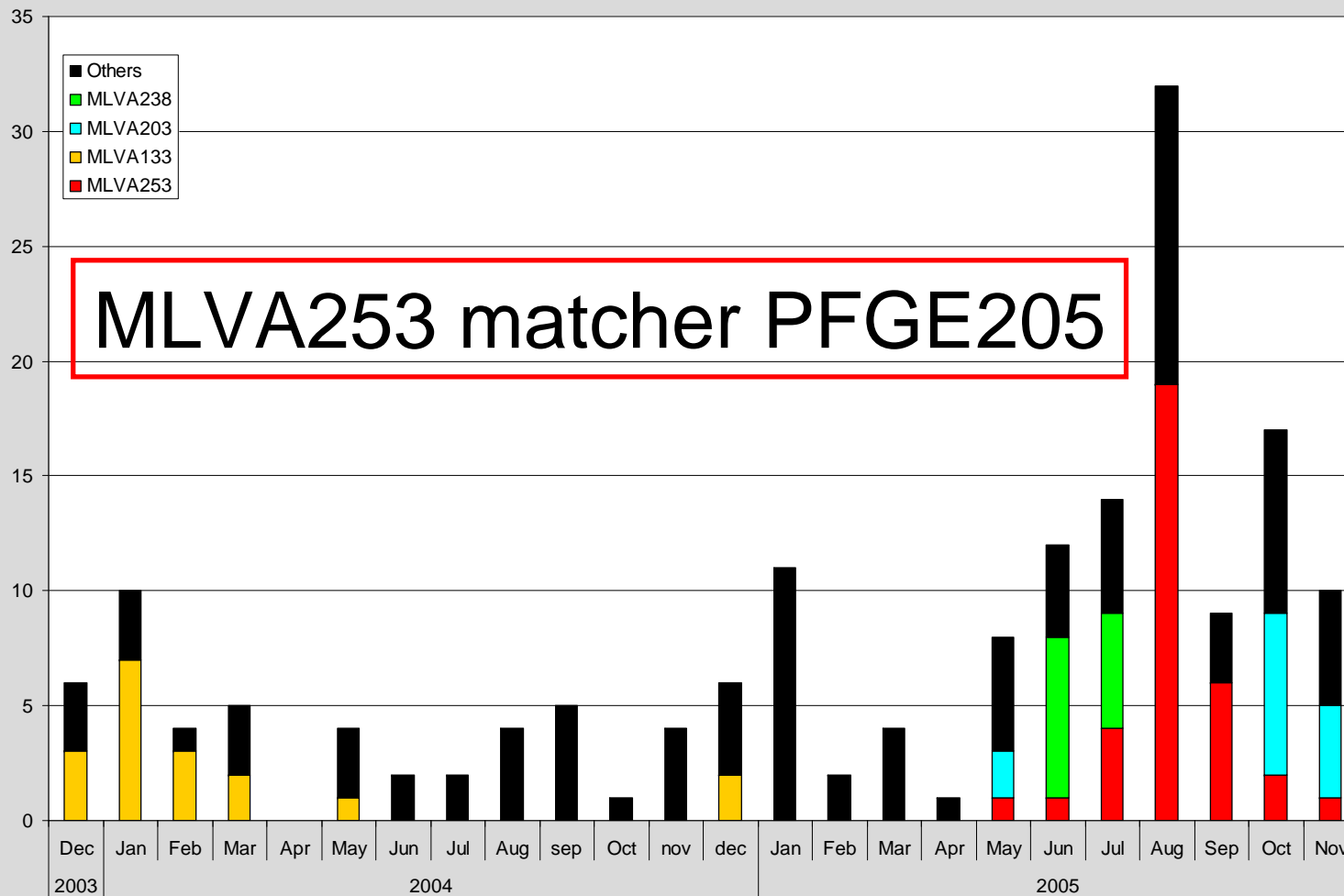


	MLVA frags					MLVA reps						
	MLVA_frags:STTR3	MLVA_frags:STTR5	MLVA_frags:STTR6	MLVA_frags:STTR9	MLVA_frags:STTR10	MLVA_reps:STTR3	MLVA_reps:STTR5	MLVA_reps:STTR6	MLVA_reps:STTR9	MLVA_reps:STTR10		
	490.0	252.0	330.0	171.5	0.0	11.0	27.0	25.0	16.0	0.0	0407R5810	JPX.0004.DK
	489.9	252.6	330.5	171.4	0.0	11.0	27.0	25.0	16.0	0.0	0407S11273	JPX.0004.DK
	489.6	252.4	330.4	171.3	0.0	11.0	27.0	25.0	16.0	0.0	0409R5951	JPX.0004.DK
	489.8	252.6	324.6	171.6	0.0	11.0	27.0	24.0	16.0	0.0	0406R5704	JPX.0005.DK
	489.8	252.6	324.6	171.4	0.0	11.0	27.0	24.0	16.0	0.0	0407H29027	JPX.0005.DK
	486.9	253.6	325.5	171.0	0.0	11.0	27.0	24.0	16.0	0.0	0409W63251	JPX.0005.DK
	490.0	252.0	324.0	171.0	0.0	11.0	27.0	24.0	16.0	0.0	0410F71837	JPX.0005.DK
	490.0	252.0	324.0	171.0	0.0	11.0	27.0	24.0	16.0	0.0	0410H57392	JPX.0005.DK
	490.0	253.0	324.0	171.0	0.0	11.0	27.0	24.0	16.0	0.0	0410R6092	JPX.0005.DK
	489.3	253.1	325.2	171.4	0.0	11.0	27.0	24.0	16.0	0.0	0410W72257	JPX.0005.DK
	490.0	253.0	325.0	171.0	0.0	11.0	27.0	24.0	16.0	0.0	0411F73950	JPX.0005.DK
	489.0	253.0	325.0	172.0	0.0	11.0	27.0	24.0	16.0	0.0	0411R6110	JPX.0005.DK
	490.0	252.0	325.0	171.0	0.0	11.0	27.0	24.0	16.0	0.0	0411W115	JPX.0005.DK
	489.0	253.0	325.0	171.0	0.0	11.0	27.0	24.0	16.0	0.0	0411W80391	JPX.0005.DK
	489.5	233.7	325.1	171.5	0.0	11.0	24.0	24.0	16.0	0.0	0410R6029	JPX.0109.DK
	490.0	259.0	330.0	171.0	0.0	11.0	26.0	25.0	16.0	0.0	0410F67283	JPX.0115.DK
	489.9	270.9	312.2	171.5	0.0	11.0	30.0	22.0	16.0	0.0	0406M79650	JPX.0003.DK
	489.9	270.7	0.0	171.4	0.0	11.0	30.0	0.0	16.0	0.0	0408R5934	JPX.0074.DK
	490.0	288.0	342.0	171.0	0.0	11.0	33.0	27.0	16.0	0.0	0410R6098	JPX.0114.DK

PFGE typer indenfor DT104

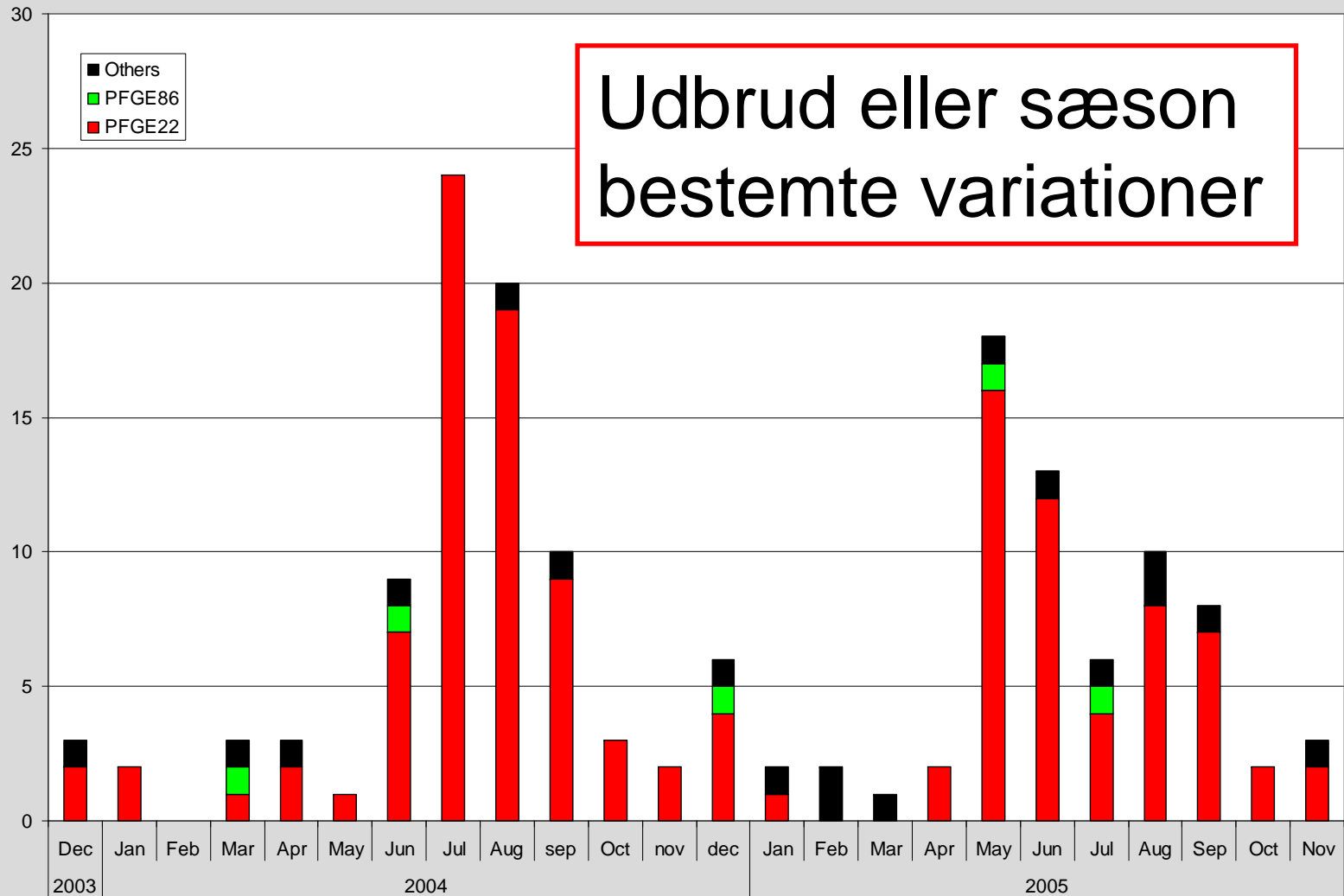


MLVA typer indenfor DT104

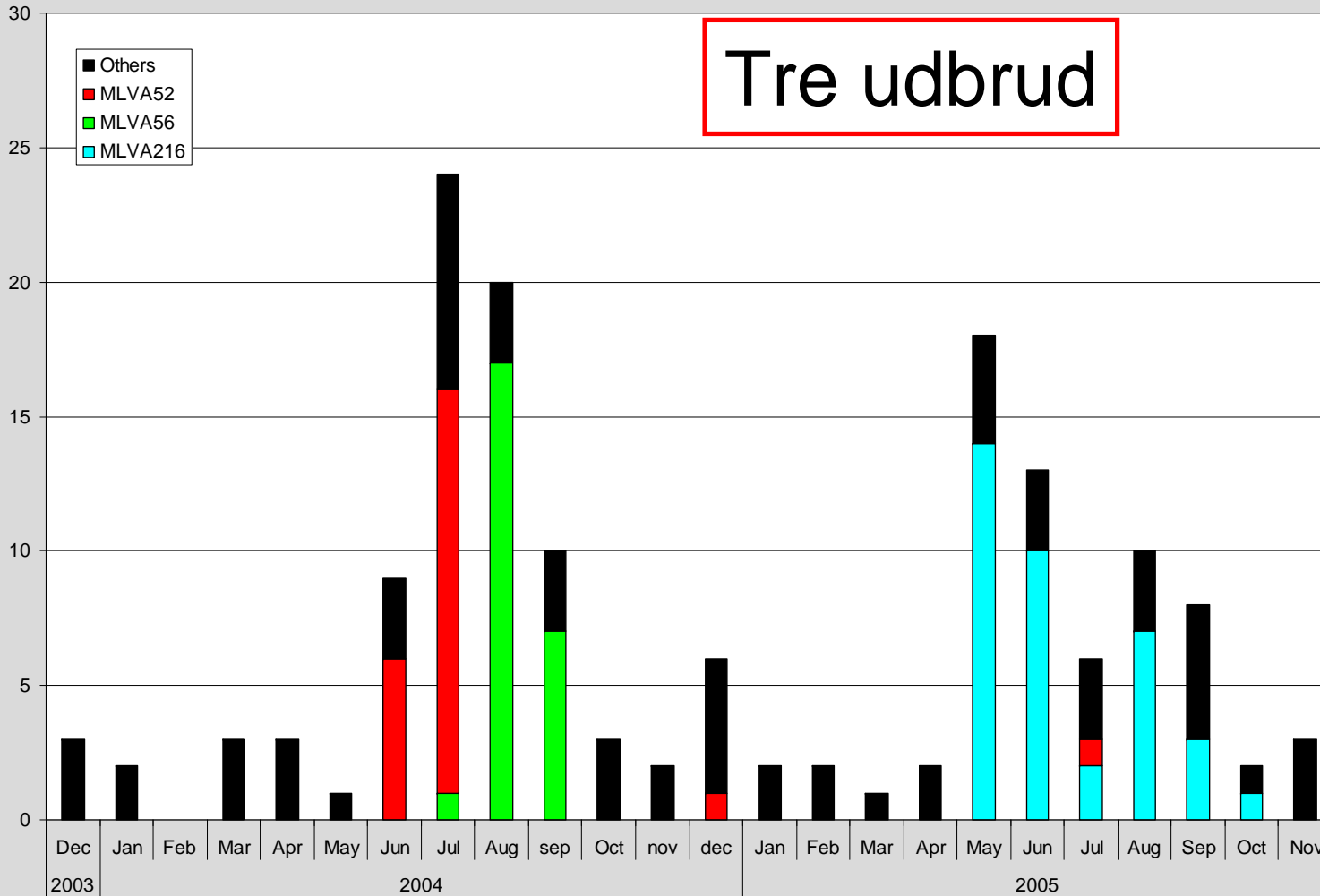




PFGE typer indenfor DT12



MLVA typer indenfor DT12



Fagtype distribution (forekomst > 5%)

Hyppigste fagtyper	Antal isolater (procent af total)	Antal af PFGE typer	Antal af isolater med hyppigste PFGE type (procent)	Antal af MLVA typer	Antal af isolater med hyppigste MLVA type (procent)
104	173 (17.0%)	11	125 (72%)	84	34 (20%)
120	161 (15.8%)	24	65 (40%)	36	40 (25%)
12	153 (15.0%)	14	130 (85%)	47	37 (24%)
193	60 (5.9%)	26	21 (35%)	28	20 (33%)
NT	116 (11.3%)	36	33 (28%)	49	31 (27%)
RDNC	106 (10.4%)	45	25 (24%)	70	11 (10%)
Andre	250 (24.5%)	-	-	-	-
Alle isolater	1019 (100%)	148	-	373	-

Clusters

Clusters	Period	Phage type	PFGE type	MLVA type	Resistance profile	Outbreak
1	Dec 03-Mar 04	DT104	PFGE14	MLVA133	ampicilin sulfomethoxazole	Local slaughterhouse Isolate match
2	Jun-Jul 04	DT12	PFGE22	MLVA52	sensitive	Local butchershop Interviews
3	Aug-Sep 04	DT12	PFGE22	MLVA56	sensitive	Only Copenhagen area
4	Aug-Sep 04	NT	PFGE47	MLVA59	ampicilin streptomycin tetracylin	
5	Oct-Dec 04	NT	PFGE99	MLVA5	ampicilin sulfomethoxazole streptomycin tetracycline	Isolate match Imported meat
6	Jan-Nov 05	DT120	PFGE6	MLVA109	sensitive	
7	Apr-Aug 05	RDNC	PFGE19	MLVA215 MLVA167	sensitive	Slaughterhouse, North Jutland

Clusters

Clusters	Period	Phage type	PFGE type	MLVA type	Resistance profile	Outbreak
8	May-Aug 05	DT12	PFGE22	MLVA216	sensitive	Local slaughterhouse Pig herd, isolate match
9	Jun-Jul 05	DT104	PFGE14	MLVA238	MR	
10	Jun-Oct 05	DT104	PFGE205 PFGE215	MLVA253 MLVA350 MLVA351 MLVA352	MR	Meat isolate Interviews Restaurant
11	Jul-Aug 05	DT136	PFGE208	MLVA266	sensitive	
12	Oct-Nov 05	DT193	PFGE84	MLVA301	ampicilin sulfomethoxazole streptomycin tetracycline	Local butcher Meat isolate
13	Oct-Nov 05	DT104	PFGE14	MLVA203	sensitive	
14	Oct-Nov 05	NT	PFGE74	MLVA435	ampicilin sulfomethoxazole streptomycin tetracycline	

MLVA - Fordele

- Kort arbejdstid og billig analyse
- Høj reproducerbarhed i og mellem laboratorier
- God til overvågning og udbrudsefterforskning
- Data nemme at opbevare og sammenligne
 - Talkode ikke billeder
- Meget diskriminerende

MLVA - Ulempner

- For diskriminerende?
- Specifik for hver bakterietype
 - *S. Typhimurium*
 - *S. Enteritidis*
 - VTEC O157

Kort sagt

- Overlegent koncept
- Et meget stort handicap: skal udvikles for hver bakterietype for sig.

Mere om MLVA...

Eva Møller-Nielsen, emn@ssi.dk

Mia Torpdahl, mtd@ssi.dk

Typningscentret, ABMP

- Torpdahl M, et al.: A regional outbreak of *S. Typhimurium* in Denmark and identification of the source using MLVA typing. *Euro Surveillance Monthly*. 2006
- Ethelberg S, et al.: Outbreak with multi-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 linked to carpaccio, Denmark, 2005. *Epidemiology & Infection*. 2007
- Lindstedt BA, et al.: Harmonization of the multiple-locus variable-number tandem repeat analysis method between Denmark and Norway for typing *Salmonella* Typhimurium isolates and closer examination of the VNTR loci. *J Applied Microbiology*. 2007
- Torpdahl M, et al.: Tandem Repeat Analysis for Surveillance of Human *Salmonella* Typhimurium Infections. *Emerging Infectious Diseases*. 2007.