



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO

AGGIORNAMENTI METODI MOLECOLARI CRN-TB

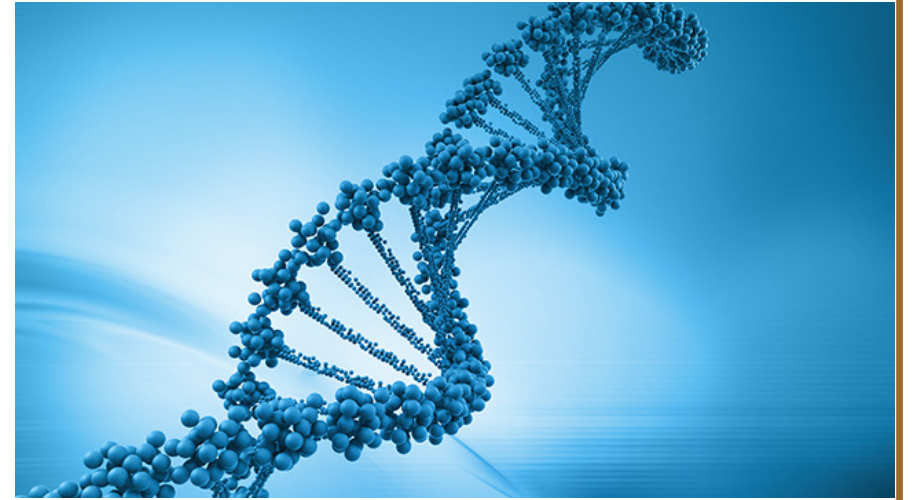
Beatrice Boniotti

**Centro Referenza Nazionale Tubercolosi Bovina
Laboratorio Nazionale di Riferimento della Tubercolosi Bovina**

Workshop CRN-TB 21 Giugno 2022



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO

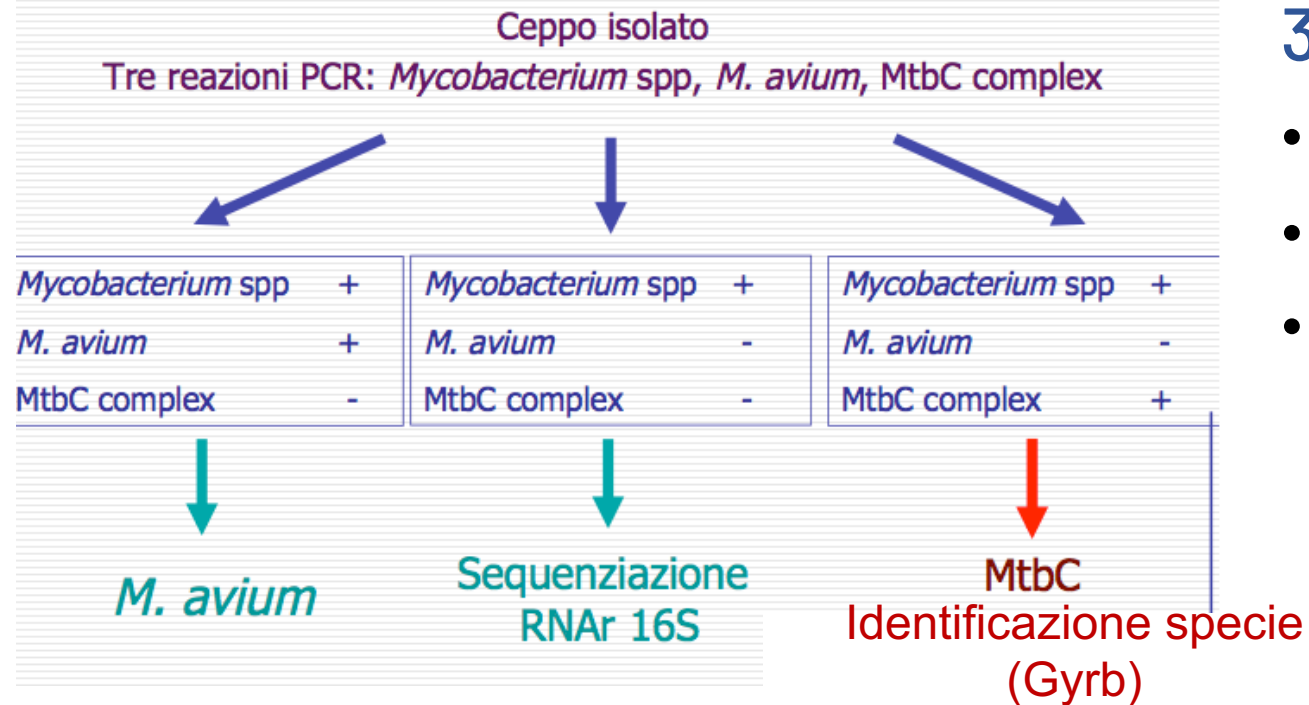


Contenuti

- Identificazione molecolare dell'isolato
- Genotipizzazione /WGS
- Rilevamento e identificazione da campione biologico
- Identificazione ceppi MOTT

Identificazione molecolare ceppi MTBC

SCHEMA IDENTIFICAZIONE CON METODI MOLECOLARI



- PCR end-point (Kulski):

3 target:

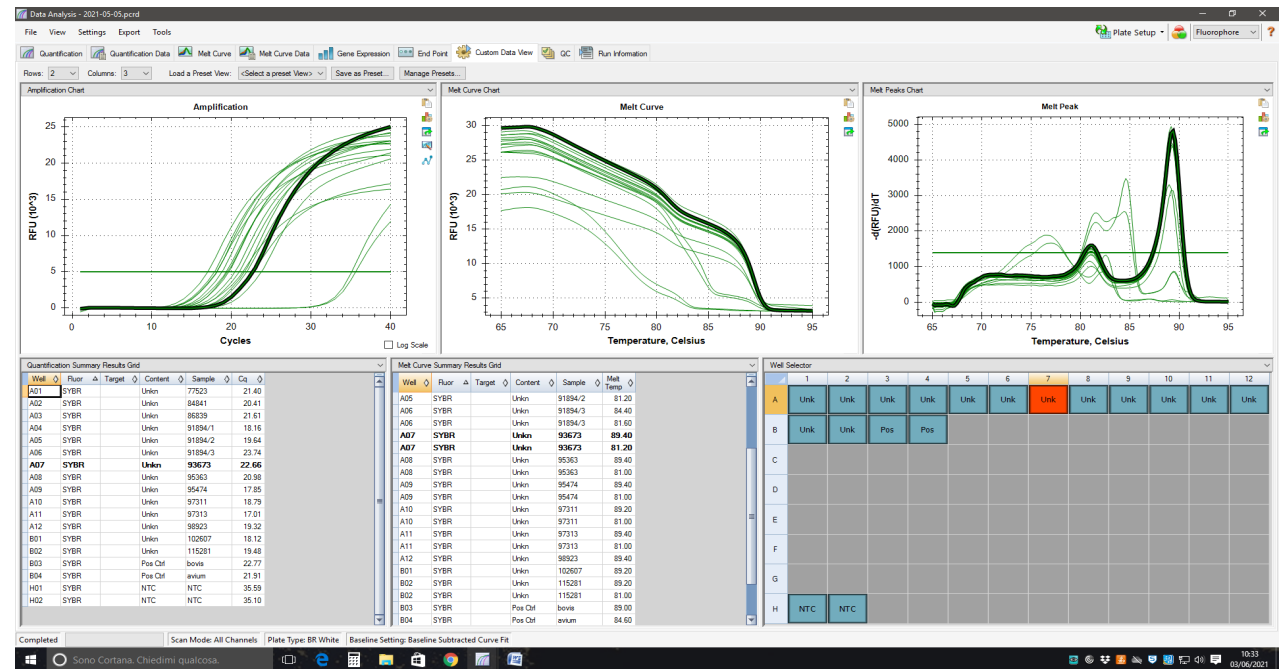
- 16S RNA gene: *Mycobacterium* genere
- 16S RNA gene: *M. avium avium*
- MPB70 gene: MTBC



Identificazione molecolare ceppi MTBC

PCR-Real Time

- PCR end-point (Kulski):
- 3 target:
- 16S RNA gene: Mycobacterium genere
 - XXX???: M.avium
 - MPB70: MTBC



- 16S RNA gene: Mycobacterium genere
- ITS (Internal transcribed sequence): M. avium complex
- IS8110: MTBC



Identificazione molecolare ceppi MTBC

- Validazione PCR Real Time (in corso)

Dati preliminari

Test		PCR REAL-TIME		TOT
		+	-	
PCR END-POINT	+	579	31	610
	-	1	0	
TOT		580	31	611

- Specificità 100%
- 22 ceppi batterici \neq micobatteri
tutti negativi



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO

Identificazione molecolare specie *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.caprae*, *M.microti*

• Gyrb-High Resolution Melting 1° Reazione

CONTROLLI	VALORE ATTESO
NTC	Assenza Ct o ≥ 37 e Tm negativa
<i>M. bovis</i> / <i>M. caprae</i>	Tm=86,2-86,6
<i>M. tuberculosis</i>	Tm=86,6-87,4
<i>M. microti</i>	Tm=86,2-87

2° Reazione

CONTROLLI	VALORE ATTESO
NTC	Assenza Ct o ≥ 37 e Tm negativa
<i>M. bovis</i>	Tm=85,2-86,2
<i>M. caprae</i>	Tm=85,6-86,6

RE:

The MTBC species are clearly distinguished in both reactions (Figure 2) and all the samples were classed correctly by the HRM analysis.

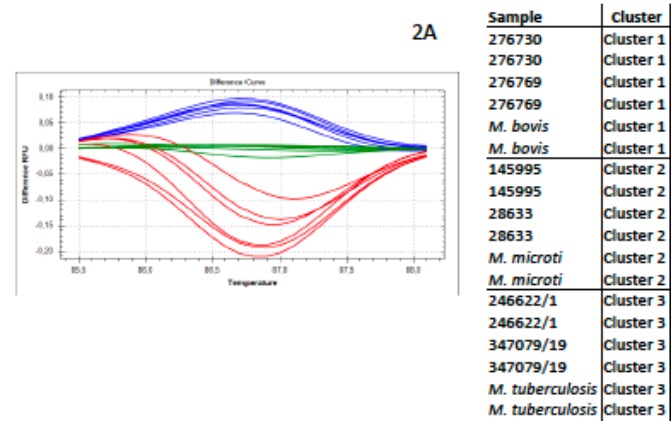


Table 2: Atypical mycobacteria analyzed to determine the specificity.

Atypical mycobacteria	N° of samples tested
<i>M. spp</i>	1
<i>M. peregrinum</i>	1
<i>M. vaccae</i>	1
<i>M. holsaticum</i>	1
<i>M. diernhoferi</i>	1
<i>M. vanbaalenii</i>	1
<i>M. triviale</i>	1
<i>M. terrae</i>	4
<i>M. nonchromogenicum</i>	15
<i>M. thermoresistibile</i>	1
<i>M. holsaticum</i>	1
<i>M. alvei</i>	1
<i>M. phlei</i>	1
<i>M. chitae</i>	1
<i>M. spp</i>	3
<i>M. tusciae</i>	1
<i>M. chelonae</i>	2
<i>M. duvalii</i>	1
<i>M. hiberniae</i>	2
<i>M. elephantis</i>	2
<i>M. diernhoferi</i>	1
<i>M. gordonae</i>	2
<i>M. marinum</i>	1
<i>M. abscessus</i>	1
<i>M. scrofulaceum</i>	1
<i>M. smegmatis</i>	1
<i>M. avium complex</i>	2
<i>M. terrae complex</i>	1
<i>M. kansasii</i>	1

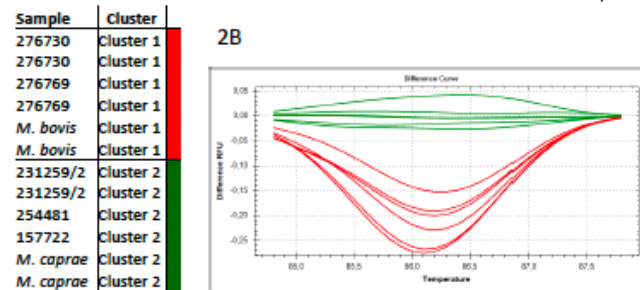


Figure 2: Graphs indicate the difference curves of MTBC species in four reference strains and eight field samples by HRM analysis. HRM generated clusters are indicated with a different color. Figure 2A and 2B correspond to the first and second reaction respectively.



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO

Genotipizzazione specie *M.bovis* e *M.caprae*

- Genotipizzazione: Spoligotyping + MLVA (12 marcatori)



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO

Sequenziamento genomico specie *M.bovis* e *M.caprae*

Sequenziamento genomico specie *M.bovis* e *M.caprae*

- WGS ceppi SB0120/4553310444365

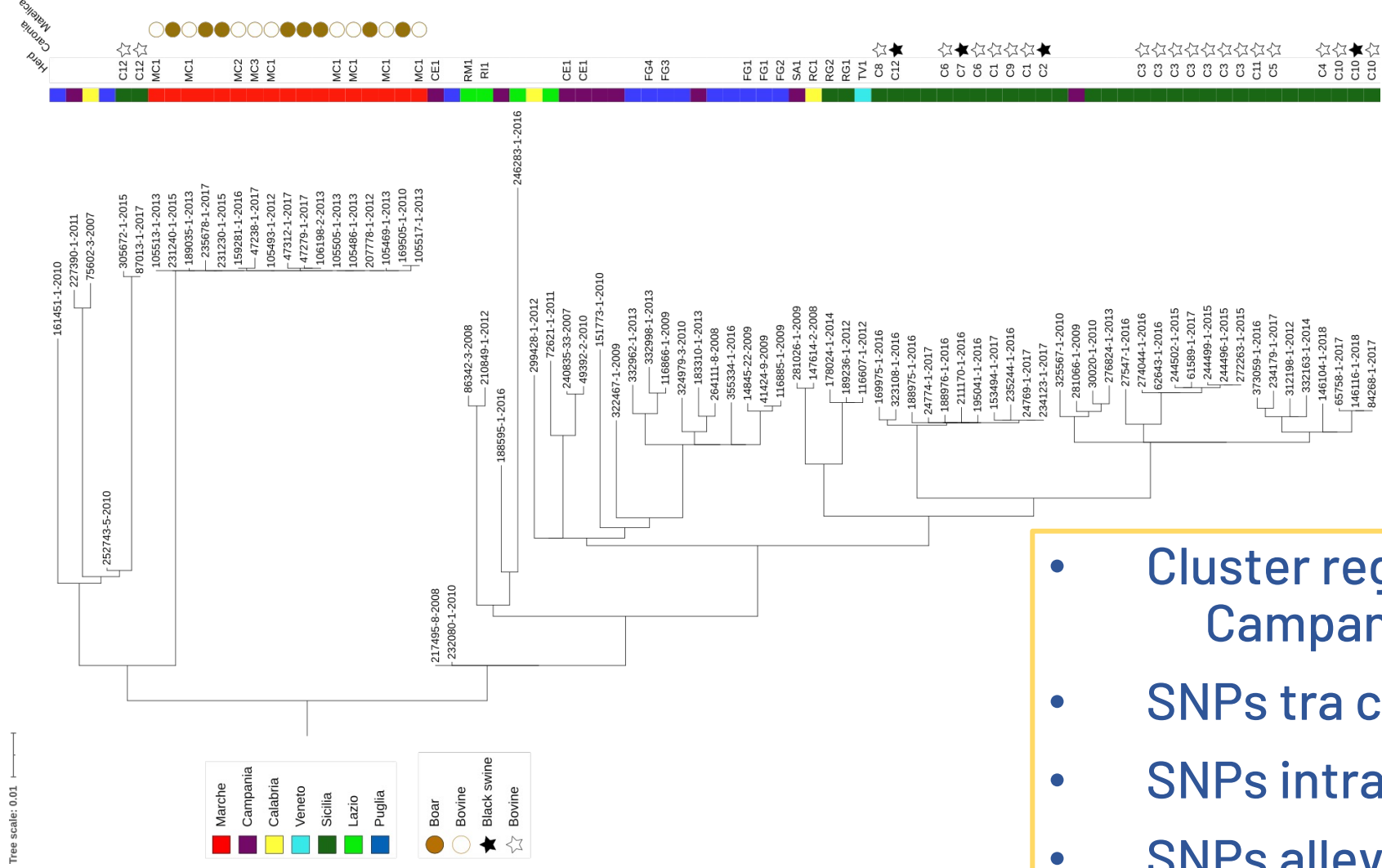


■ **Ceppi italiani**
Appartengono tutti a sub-lineage La1.2

Analisi Core SNPs
Algoritmo Maximun Likelihood Algorithm



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO



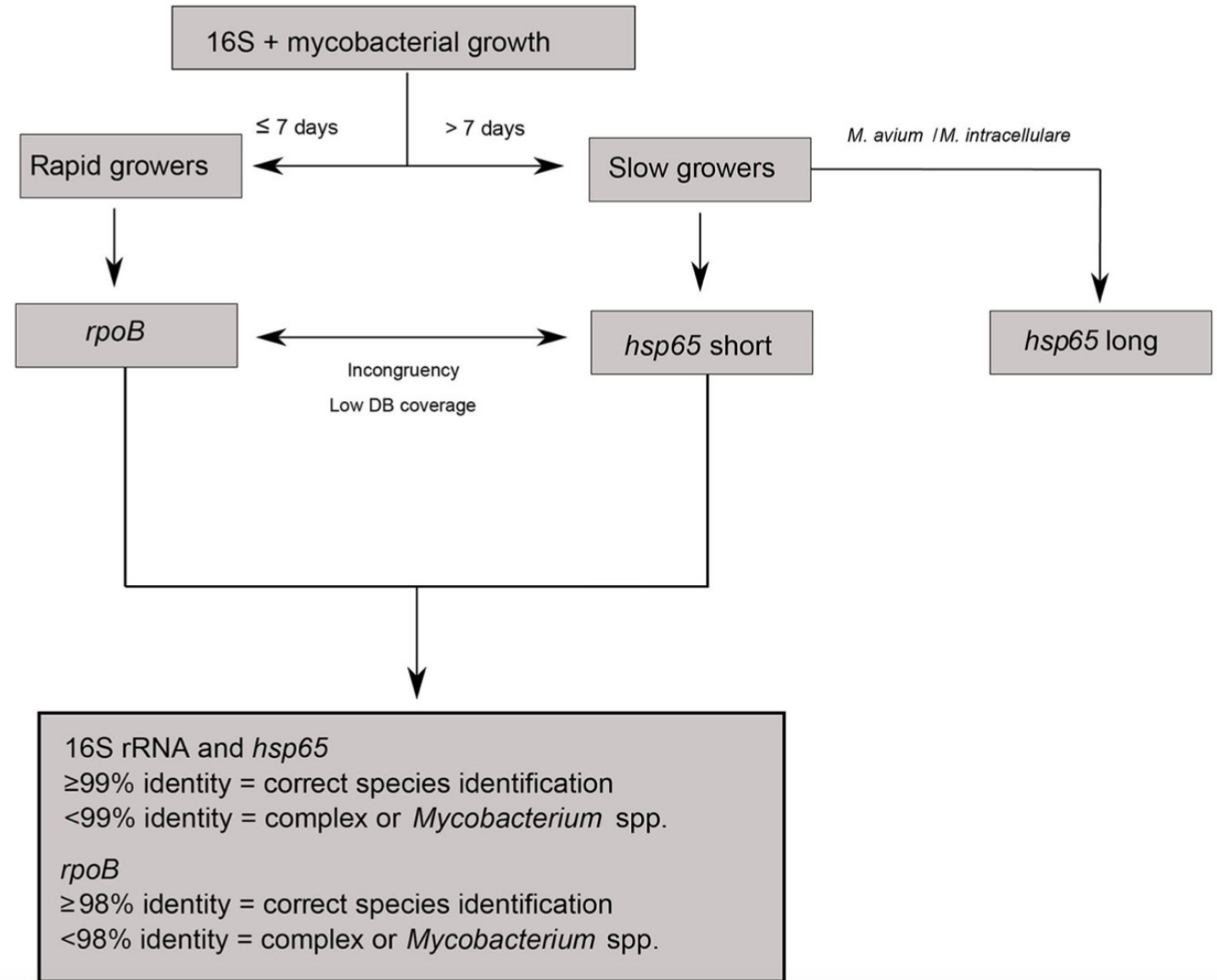
- Cluster regionali: Sicilia, Puglia Campania
- SNPs tra clusters: 250
- SNPs intra cluster: 70
- SNPs allevamenti correlati: 5



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO



Caratterizzazione ceppi MOTT

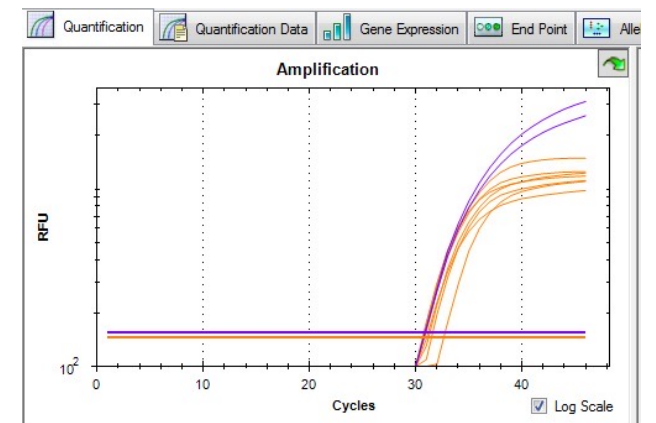




ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO

Rilevamento e identificazione molecolare MTBC

- Estrazione DNA campione biologico
- PCR Real time IS6110
- Controllo interno





ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO

Estrazione DNA da tessuto: colonnine vs biglie magnetiche





ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO

Protocollo Estrazione DNA con biglie magnetiche metodo semiautomatico King Fisher

- Trasferire 300 μ L di omogenato in un tubo da 2 ml safe lock contenente circa 100 mg di biglie di vetro 150-212 μ m
- Scuotere per 5 minuti a 30 HZ in Tissue Lyser
- Trasferire 200 μ L del lisato in una piastra deep well (lisi)
- Aggiungere:
 - 200 μ L di buffer NPL1 (Buffer di Lisi)
 - 30 μ L di PK
 - 20 μ L IC DNA EGFP 10⁵ c.g./ μ L
- Incubare in agitazione in un termoblocco per piastre a 56°C O.N.
- Aggiungere:
 - 600 μ L di NPB2 (Binding Buffer)
 - 20 μ L di NucleoMag B-Beads (biglie magnetiche)
- Preparare le piastre di lavaggio ed eluizione:
 - 1° lavaggio: 600 μ L NPW3
 - 2° lavaggio: 600 μ L NPW4
 - 3° lavaggio: 600 μ L ETOH 80%
 - Piastra di eluizione: 200 μ L
- Caricare le piastre sul King Fisher, utilizzando il programma denominato Pathogen DNA_RNA 3 Wash 96 secondo l'ordine:
 - Tip-Comb
 - Eluizione
 - Etoh
 - 2° Lavaggio
 - 1° lavaggio
 - Lisi



Validazione metodo di estrazione

- 58 campioni di linfonodi bovino estratti in parallelo.
- 11 campioni positivi per entrambe i metodi (8 campioni isolati + 3 in corso)

N°	ISOLAMENTO	LESIONI	ISTOL	IS6110 KF	IS6110 Colonnina	RD4 PCR
7	P	//	//	29,55	30,2	M. caprae
14	P	//	//	33,1	33,35	M. bovis
19	P	P	1	28,68	29,67	M. caprae
21	P	P	1	24,59	24,1	M. caprae
22	In corso	N	0	38,06	37,95	M. caprae
23	P	P	1	33	31,9	M. bovis
25	P	//	1	27,65	//	M. bovis
26	P	//	//	24,36	//	M. bovis
28	P	P	1	35,13	//	M. bovis
45	In corso	//	1	29,3	38	M. bovis
54	In corso	//	2	32,5	31,72	M. bovis



Validazione metodo di estrazione

Campioni discordanti isolamento/IS6110 PCR Real-Time

N°	Anno	IS6110	Isolamento	Istologico	Ct IS6110 KF TAK	Ct IC
1	2020	N	P		37,04/NA	31,99
2	2020	N	P	2	32,85	30,76
3	2020	N	P	1	36,29	30,32
4	2020	N	P	2	N/A	33,97
5	2020	N	P	4	N/A	32,26
6	2020	N	P	2	38,39/NA	33,03
7	2020	N	P	0	35,37	31,07



PRODUZIONE IC PER ESTRAZIONE DNA

(D.B Andreychuk, Avian Pathology 08/07/2019)

IC DNA: EGPF DNA OLIGONUCLETIDE 65 bp

5'-GAACTCCAGCAGGACCATGAATGCTCAGGGCGGACTGGGTGCTAAGTGTCTGCTGGTAGTGGTC-3'

PRIMER DIR: PRIMER EGFP DIR (PER IC SINTETICO)

5'-GAA CTC CAG CAG GAC CAT G-3'

PRIMER REV: PRIMER EGFP REV (PER IC SINTETICO)

5'-GAC CAC TAC CAG CAG AAC AC3'

SONDA: PROBE EGPF (PER IC SINTETICO)

Cy5- AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A -BHQ2

PREPARAZIONE OLIGO-DNA ARMORED MW 20.193 Dalton:

Diluire in TE 1X il liofilo a 100 µM

Calcolare le copie genomiche

Diluire fino a 10⁷ copie genomiche/µL

SOLUZIONI:

- NaCl 150 mM
- Soluzione Armored

Soluzione Armored per 10 mL

REAGENTE	CONC. INIZIALE	CONC. FINALE	VOLUME
NaCl	0.5M	150 mM	3 mL
PEI 25KDa	100 nM	1nM	100 µL
H ₂ O			6.9 mL

Diluire l'oligo DNA 10⁷ a 10⁶ con NaCl 150 mM

Diluire l'oligo 10⁶ a 10⁵/10⁴ con la soluzione Armored

Incubare a T° ambiente per 10 minuti conservare a +4°C per 6 mesi

Aggiungere in fase di estrazione 0.1 µL di IC per 1 µL di eluizione

Amplificare con primer e sonda alla concentrazione finale

rispettivamente di 0.1 µM e 0.2 µM:

Aggiungere 0.8 µL/campione della Mix sotto descritta:

MIX AMPLIFICAZIONE IC PER CAMPIONE

Primer DIR+
REV

10 µM each

0.4 µL

Probe

10 µM

0.4 µL

Aggiungere 0.8 µL della Mix alla Mix di amplificazione per ogni campione



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO

- VISAVET HEALTH SURVEILLANCE CENTRE
- European Union Reference Laboratory
- for Bovine Tuberculosis
- COMPLUTENSE UNIVERSITY OF MADRID

- **Real Time PCR for the detection of Mycobacterium bovis**
- Real time PCR implemented for the detection of Mycobacterium bovis based on the deleted region of difference RD4.

Identificazione	Target	Primers/Probe	Sequence 5'→3'
M. bovis	RD4_del (116 bp)	Forward RD4_del-F	GCAGAAGCGCAACACTCTTG
		Reverse RD4_del-R	AAAAATGGCTATTGACCAGCTAAGAT
		Probe RD4_del-P	VIC-AGTGGCCTACAACGGCGCTCTCC-BHQ1

REAGENTI	CONCENTRAZIONE INIZIALE	CONCENTRAZIONE FINALE	VOLUME
MASTERMIX	2X	1X	12.5 µL
IC ASSAY EGFP*	//	//	0.8 µL
FOR RD4-del	10 µM	0.8 µM	2 µL
REV RD4-del	10 µM	0.8 µM	2 µL
PROBE RD4-del	10 µM	0.4 µM	1 µL
ACQUA	//	//	1.7 µL
VOLUME DI REAZIONE: 20 µL			
DNA: 5 µL			



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO

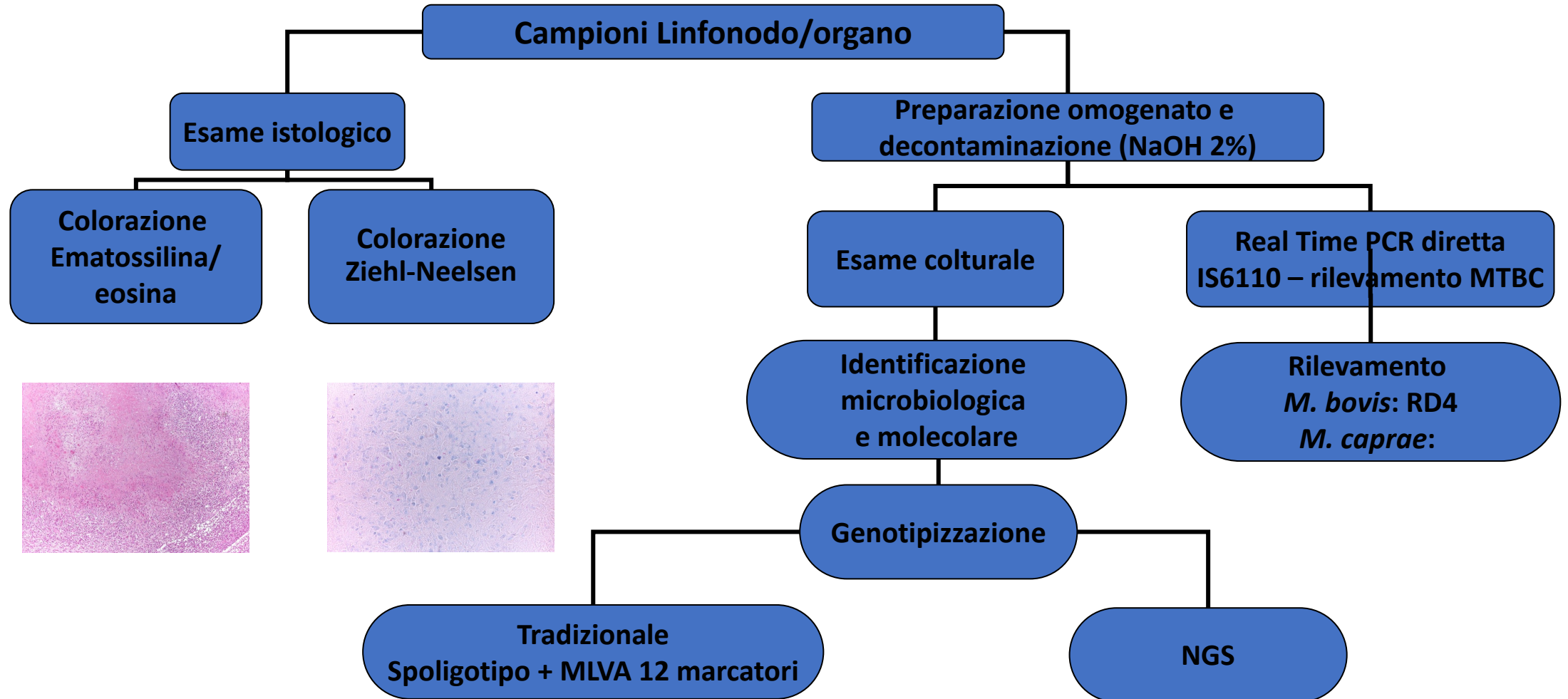
VVV

• VV

• VV

• VV

Percorso diagnostico utilizzato presso il CRN-TB - aggiornamento





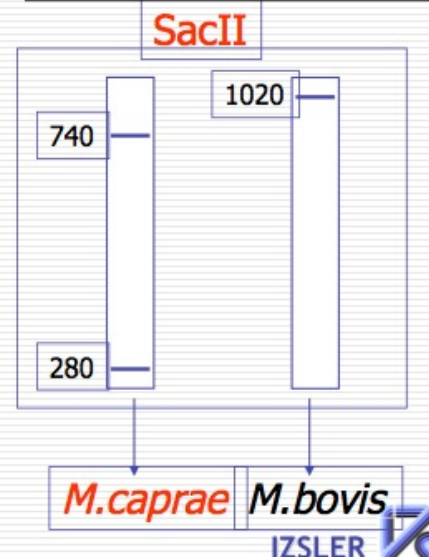
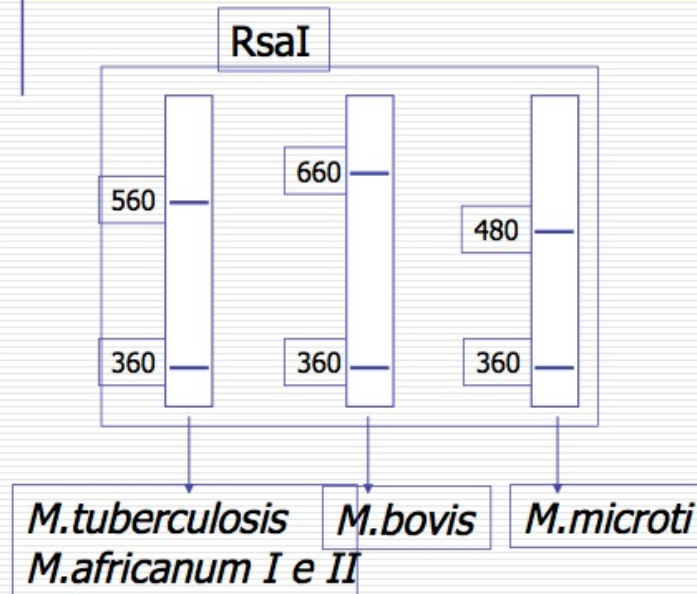
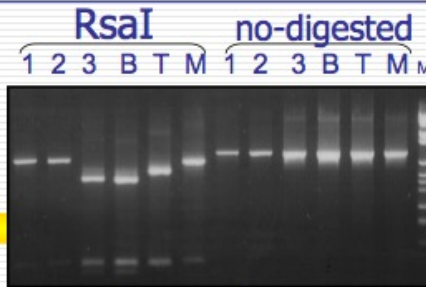
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO

Identificazione molecola

- VVV

Saggio PCR-RFLP *gyrB*

gyrB: 1020 nt

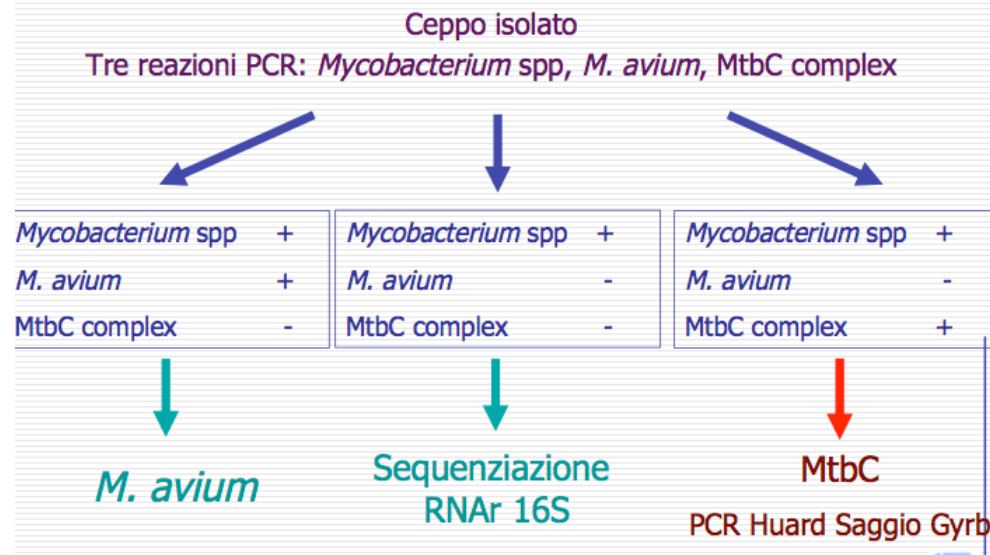




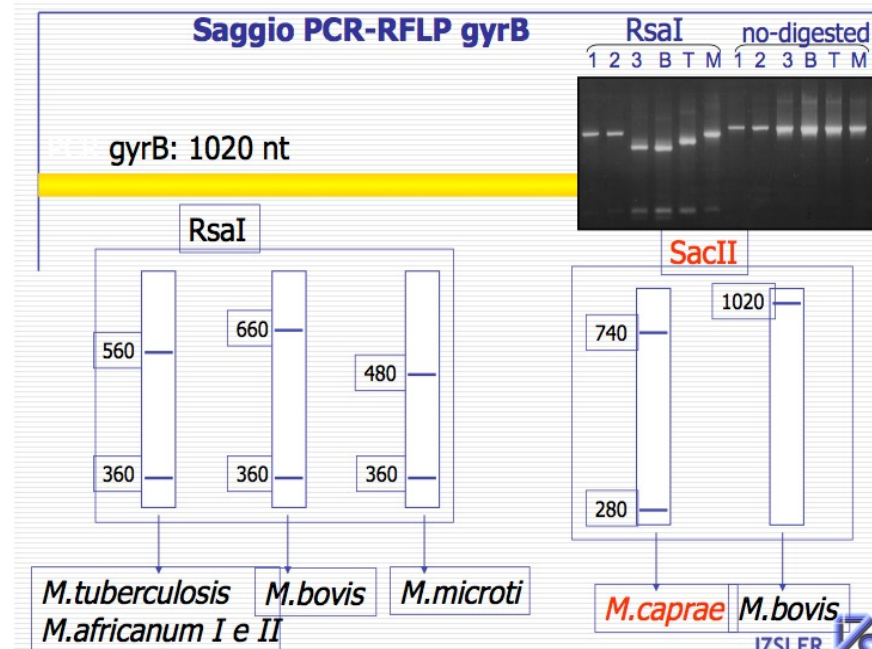
Identificazione micobatteri

Introduzione metodi molecolari: identificazione del ceppo isolato

SCHEMA IDENTIFICAZIONE CON METODI MOLECOLARI



PCR tradizionale Kulski



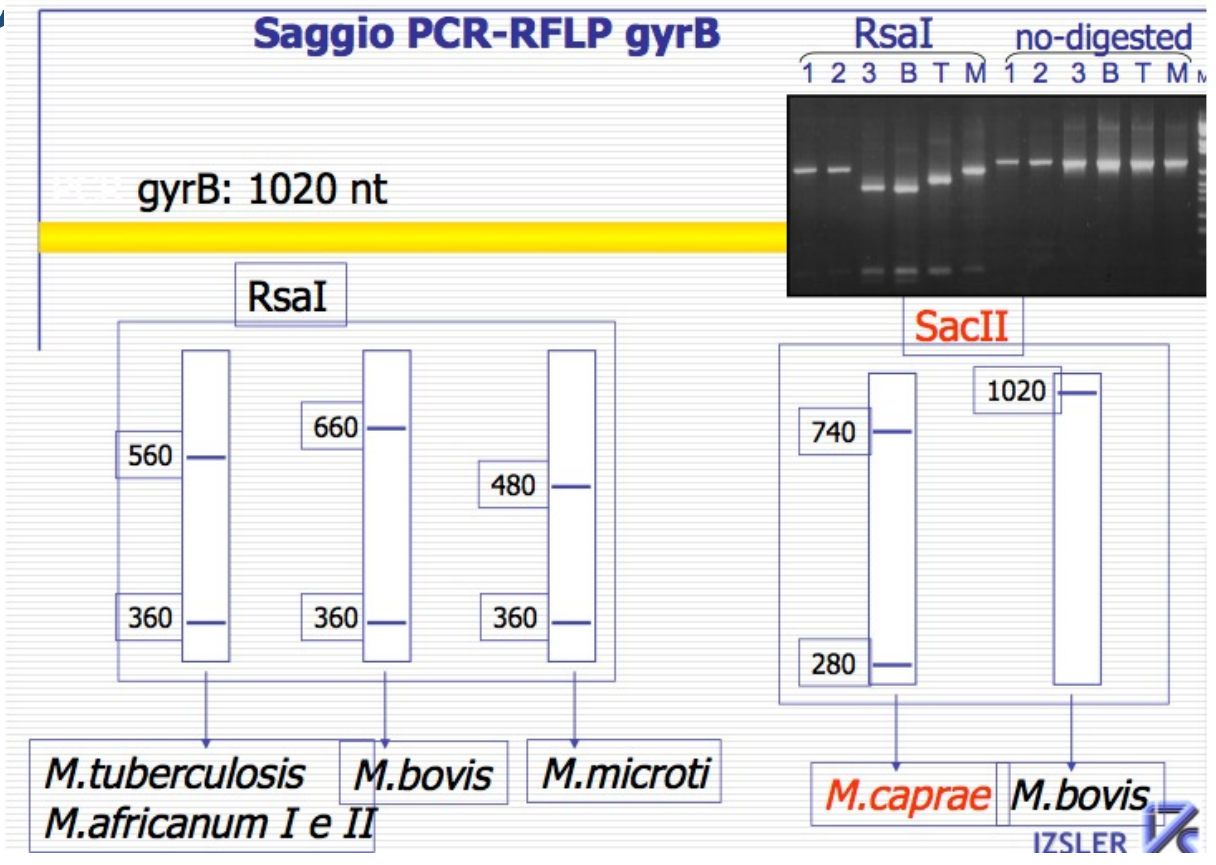
Saggio PCR/RFLP gene *gyrB*



Identificazione micobatteri



Introduzione metodi molecolari: saggio
PCR/RFLP per la differenziazione delle specie
MTBC





ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO

GERAZIE PER L'ATTENZIONE

RINGRAZIAMENTI:

METODI MOLECOLARI:

MANGELI ANNA

LODA DANIELA

ALICE PAPETTI

BATTERIOLOGIA??

RINGRAZIAMENTI:

WGS:

ERIKA SCALTRITI

STEFANO PONGOLINI