



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport

Hoge Resolutie Typering van *Coxiella burnetii*

Definitieve versie

RIVM briefrapport 330302001/2011

Ingmar Janse | Alex Bossers | Hendrik-Jan Roest |
Bart van Rotterdam



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

Hoge Resolutie Typering van *Coxiella burnetii*

definitieve versie

RIVM Briefrapport 330302001/2011

Colofon

© RIVM 2011

Delen uit deze publicatie mogen worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: 'Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), de titel van de publicatie en het jaar van uitgave'.

Ingmar Janse (senior onderzoeker), RIVM
Alex Bossers (senior onderzoeker), CVI
Hendrik-Jan Roest (projectleider Q-koorts), CVI
Bart van Rotterdam (projectleider Q-koorts), RIVM

Contact:
Ingmar Janse
LZO
Ingmar.Janse@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van Ministerie VWS, in het kader van onderzoek Q-koorts

Rapport in het kort

Hoge Resolutie Typering van *Coxiella burnetii*

Coxiella burnetii is een intracellulaire bacterie die Q-koorts veroorzaakt. De genomesequenties van een aantal isolaten die verkregen werden tijdens de Nederlandse Q-koorts uitbraak werden opgehelderd. Deze genomesequenties dienen als basis voor verbeterde typeringsmethodes die nauwkeurigere bronopsporing en epidemiologische studies mogelijk maken. Daarnaast zijn de sequenties uiterst waardevol voor allerlei overig onderzoek, zoals naar de samenhang tussen de Nederlandse uitbraken en veranderde virulentiekenmerken.

Als resultaat van dit project zijn er nu 19 *C. burnetii* isolaten van de Nederlandse uitbraak in kweek. Deze isolaten zijn voornamelijk afkomstig van veterinaire bronnen, maar er zijn ook enkele stammen van humane en omgevingsbronnen verkregen. De genomen van 3 isolaten zijn grotendeels opgehelderd en enkele voorlopige analyses zijn erop uitgevoerd. De ruwe sequentiedata van nog 4 isolaten komen binnenkort beschikbaar. De isolaten en genomesequenties spelen een essentiële rol spelen in meerdere vervolgprojecten van de deelnemende onderzoeksgroepen. De ervaring die opgedaan is met het opwerken en sequencen van de *C. burnetii* genomen is van grote waarde voor lopend en toekomstig onderzoek naar *C. burnetii* en andere intracellulaire micro-organismen.

Trefwoorden:

genoom sequencing, *Coxiella burnetii*, typeren, kweek, Q-koorts

Abstract

High Resolution Typing of *Coxiella burnetii*

Coxiella burnetii is an intracellular bacterium which causes Q-fever. The genomes from a number of isolates obtained from the Dutch outbreak, were sequenced. These genome sequences form the basis for improved typing methods, enabling more accurate source finding and epidemiological studies. In addition, the genome sequences are highly valuable for other research, for instance of the relation between the Dutch outbreak and altered virulence properties.

As a result of this project, 19 isolates from the Dutch outbreak have been cultivated. These isolates were primarily obtained from veterinary sources, but a few were acquired from human or environmental sources. The genomes of 3 isolates have been almost completely sequenced and some preliminary analyses were performed. Raw sequences from 4 additional isolates will be available soon. The bacterial isolates and genome sequences play important roles in several ongoing projects from the research partners. The experience that was acquired with harvesting and sequencing *C. burnetii* genomes is highly valuable for current and future research of *C. burnetii* and other intracellular pathogens.

Keywords:

genome sequencing, *Coxiella burnetii*, typing, cultivation, Q-fever

Inhoud

Samenvatting—7

1 Inleiding—8

2 Resultaten en Discussie—10

- 2.1 Algemeen—10
- 2.2 Bronmateriaal—11
 - 2.2.1 Herkomst—11
 - 2.2.2 Opwerking—11
- 2.3 Isolatie en vermeerdering—13
 - 2.3.1 Algemene procedures—13
 - 2.3.2 Isolatie—13
 - 2.3.3 Vermeerdering—14
 - 2.3.4 Muizenpassage—14
- 2.4 DNA extractie en zuivering—15
 - 2.4.1 Verwijderen gastheer DNA/RNA—15
 - 2.4.2 DNA isolatie *C. burnetii*—16
- 2.5 Genoomsequencing—16
 - 2.5.1 Isolaten opgewerkt voor sequencing—16
 - 2.5.2 Sequentieanalyse—17

3 PRODUCTEN EN VERVOLGACTIVITEITEN—20

- 3.1 Producten—20
- 3.2 Gebruik van producten in lopende projecten—21

4 CONCLUSIE—24

dankwoord—27

REFERENTIES—29

BIJLAGE—31

Samenvatting

Dit rapport beschrijft het onderzoek wat uitgevoerd is in het kader van het project 'Hoge Resolutie Typering *Coxiella burnetii*'. Het doel van dit project was om de genomsequenties van een aantal Nederlandse isolaten van de bacterie *Coxiella burnetii*, de veroorzaker van Q-koorts, in kaart te brengen om hiermee de ontwikkeling van verbeterde typeringsmethodes mogelijk te maken. Op basis van genomsequenties kan onderzocht worden of de Nederlandse uitbraken bijvoorbeeld samenhangen met veranderde virulentiekenmerken. Genoom informatie is ook essentieel om een verbeterde, op de Nederlandse situatie toegespitste typering mogelijk te maken. Nauwkeurige typering van *C. burnetii* in klinische, veterinaire en omgevingsmonsters is noodzakelijk voor goed toezicht op de Q-koorts epidemie, voor betrouwbare bronopsporing en het leggen van epidemiologische verbanden.

Om van monsters vanuit humane, veterinaire en omgevingsbronnen te komen tot genomsequenties zijn de volgende stappen nodig: selectie en opwerking van bronmateriaal, isolatie en kweek, DNA extractie en zuivering, en genomsequencing. Nog meer dan al voorzien was bleek het isoleren van *C. burnetii* vanuit klinisch materiaal en vanuit de omgeving, en het produceren van voldoende DNA van hoge kwaliteit, uiterst complex. Hieraan is dan ook het overgrote deel van de onderzoeksinspanningen besteed.

Als resultaat van dit project zijn er nu 19 *C. burnetii* isolaten van de Nederlandse uitbraak in kweek. Deze isolaten zijn voornamelijk afkomstig van veterinaire bronnen, maar daarnaast zijn er 2 stammen vanuit humaan materiaal gekweekt en 4 vanuit verschillende omgevingsmonsters (rattenmilten, melkfilter, mest). Er is ruime ervaring opgedaan met het isoleren en kweken van *C. burnetii* vanuit diverse bronnen, en kweekervaringen zijn overgedragen tussen medewerkers en beide instituten. De genomen van 3 isolaten zijn grotendeels opgehelderd en de ruwe sequentiedata van nog 4 isolaten komen binnen 3 maanden beschikbaar. Doordat de genomsequenties een essentiële rol spelen in een aantal vervolprojecten van beide deelnemende onderzoeksgroepen, is de verdere verwerking en publicatie van deze sequenties gewaarborgd. De ervaring die opgedaan is met het opwerken en sequencen van de *C. burnetii* genomen is van grote waarde voor lopend en toekomstig onderzoek naar *C. burnetii* en andere intracellulaire micro-organismen.

De eerste analyses van de verkregen Nederlandse isolaten laten zien dat er voldoende sequentie en structurele variaties in de genomen zit om verbeterde typering mogelijk te maken. Hierbij wordt vooral gedacht aan verbetering van single-nucleotide polymorphism (SNP) detectie, die een hogere resolutie van deze robuuste methode mogelijk maakt. Hiermee komen de vele monsters die nu niet getypeerd kunnen worden vanwege een te lage hoeveelheid DNA wel beschikbaar voor PCR-gebaseerde typering, hetgeen een sterke verbetering kan betekenen voor opsporing van bronnen en identificeren van verspreidingsroutes. In de loop van het onderzoek is een nieuwe typeringsmethode voor het onderscheiden van isolaten ontwikkeld. Overige producten van het project, met name de verkregen isolaten, worden gebruikt in een aantal lopende onderzoeksprojecten die gefinancierd worden uit verschillende bronnen. Tenslotte heeft het project ervoor gezorgd dat de samenwerking tussen 2 actieve spelers in het Nederlandse onderzoek naar Q-koorts is geïntensiveerd waarbij veel kennisuitwisseling heeft plaatsgevonden die ook voor toekomstige projecten en publicaties zeer waardevol is.

1 Inleiding

In dit rapport wordt het onderzoek beschreven wat uitgevoerd is in het kader van het project 'Hoge Resolutie Typering *Coxiella burnetii*', (project V/330302/01/QK) uitgevoerd van juli 2010 tot juli 2011 voor het ministerie van VWS. Het doel van dit project was om de genoomsequenties van een aantal Nederlandse isolaten van de bacterie *Coxiella burnetii*, de veroorzaker van Q-koorts, op te helderen om hiermee de ontwikkeling van verbeterde typeringsmethodes mogelijk te maken. De ongeëvenaarde hoeveelheid genetische informatie die beschikbaar komt door het sequencen van hele genomen vormt een onmisbare basis voor vervolgonderzoek.

Zulk onderzoek kan ophelderen of de Nederlandse uitbraken samenhangen met veranderde virulentiekenmerken. Maar ook is genoom informatie nodig om te komen tot een verbeterde, op de Nederlandse situatie toegespitste typering. Nauwkeurige typering van *C. burnetii* in klinische, veterinaire en omgevingsmonsters is noodzakelijk voor goed toezicht op de Q-koorts epidemie, voor betrouwbare bronopsporing en het leggen van epidemiologische verbanden. Zo is het wenselijk dat de epidemiologische link tussen Nederlandse geitenhouderijen en de humane Q-koorts uitbraken sinds 2007 microbiologisch bevestigd wordt. Ook kunnen nauwkeurig getypeerde monsters inzicht geven in de rol van andere reservoirs zoals schapen en runderen, en van de rol van overdracht via het milieu of vectoren zoals ratten.

Zoals beschreven in het onderzoeksvoorstel voor dit project, worden voor het routinematig genotypen van *C. burnetii* momenteel twee technieken gebruikt die een hoge resolutie onderscheid mogelijk maken tegen relatief beperkte inspanning en kosten: MLVA (Multi Locus Variable number tandem repeat Analysis) (Svraka *et al.*, 2006, Arricau-Bouverie *et al.*, 2006) en MST (Multispacer Sequence Typing) (Glazunova *et al.*, 2005). Beide technieken maken gebruik van DNA amplificatie, zodat isolatie en kweek van *C. burnetii* niet noodzakelijk is. Hierdoor zijn alle monsters waarin voldoende *C. burnetii* DNA aanwezig is (zowel dode als levende bacteriën) in principe geschikt voor typering. In de studies die tot dusverre gedaan zijn in Nederland is vooral MLVA gebruikt (Roest *et al.*, 2011, Klaassen *et al.*, 2010, Tilburg *et al.*, 2011, de Bruin *et al.*, 2011). MST is gebruikt voor het typeren van klinische monsters bij het Jeroen Bosch Ziekenhuis (van Alphen *et al.*, 2011). Op basis van MST sequentiegegevens is recentelijk ook een Single Nucleotide Polymorphism (SNP) typering assay opgezet (Huijsmans *et al.*, 2011). MST en SNP typering zorgen voor meer robuuste en beter vergelijkbare gegevens, maar de resolutie is nog relatief laag. Voor al deze methodes geldt dat ze ontwikkeld zijn op basis van een aantal diverse, wereldwijd voorkomende stammen van *C. burnetii*. Genoomsequenties van Nederlandse isolaten kunnen ervoor zorgen dat de typeringsmethodes veel meer toegespitst worden op de Nederlandse situatie, zodat binnen deze uitbraken genotypes onderscheiden kunnen worden. Verschillende genotypen kunnen geassocieerd zijn met verschillen in virulentie en verspreidingsprofielen, het zou zelfs mogelijk kunnen zijn dat de interventiemethode afgestemd moet worden op het aangetroffen genotype.

2 Resultaten en Discussie

2.1 Algemeen

Voor het verkrijgen van de *C. burnetii* genomesequenties was het produceren van genomisch DNA van verschillende *C. burnetii* stammen een essentieel onderdeel. Om van monsters vanuit humane, veterinaire en omgevingsbronnen te komen tot genomesequenties zijn in hoofdlijnen de volgende stappen nodig:

1. Selectie en opwerking van **bronmateriaal**. Dit materiaal was van verschillende oorsprong en bevatte zeer verschillende hoeveelheden *C. burnetii*, overige bacteriën en matrix (biotisch en abiotisch).
2. **Isolatie en kweek** van *C. burnetii*. Kweek van *C. burnetii* in gastheercellen in het BSL3 laboratorium waarbij voldoende bacteriën geproduceerd worden voor genomsequencing
3. Oogsten van deze cellen en **DNA extractie en zuivering** tot DNA van voldoende hoeveelheid en kwaliteit.
4. **Genomsequencing** en basale annotatie van de verkregen sequenties

Nog meer dan al voorzien was, bleek het isoleren van *C. burnetii* uit klinisch en omgevingsmateriaal en het produceren van voldoende DNA van hoge kwaliteit uiterst complex. Hieraan is dan ook het overgrote deel van de onderzoeksinspanningen besteed. Het verkrijgen van geschikt entmateriaal was voor een aantal van de beoogde bronnen (t.w. humaan, veterinair en milieu) erg moeilijk. Vooral het aanbod van voldoende geïnfecteerd humaan materiaal was erg laag. Daarnaast bleken de meeste Nederlandse isolaten eenmaal in kweek een lage opbrengst aan *C. burnetii* cellen te hebben (zeker in vergelijking met de referentiestam Nine Mile). Desondanks zijn we er in geslaagd van een aantal Nederlandse isolaten voldoende materiaal te verkrijgen voor het grotendeels sequencen van het genoom (zie hoofdstuk 3).

Om aan geschikt bronmateriaal te komen werd nauw samengewerkt met o.m. het Jeroen Bosch Ziekenhuis (JBZ), de nieuwe Voedsel en Waren Autoriteit (nVWA), en de Gezondheidsdienst voor Dieren (GD). Om de kweek van het hoog-pathogene en intracellulair groeiende *C. burnetii* op te zetten werd nauw samengewerkt tussen de projectpartners van de afdeling Milieu van het Laboratorium voor Zoönosen en Omgevingsmicrobiologie (LZO Milieu), Centrum voor Infectieziektebestrijding (CIb), Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) en de afdeling Bacteriologie en TSE's en de afdeling Infectiebiologie van het Centraal Veterinair Instituut (CVI). Isolaties werden parallel uitgevoerd bij het RIVM en het CVI. Op deze manier konden beide instituten de infrastructuur voor kweek opbouwen, waarbij de specifieke expertise (RIVM milieumonsters, CVI veterinair) van beide groepen beter benut kon worden. Daarbij hadden beide toegang tot verschillende bronmaterialen en werden op deze manier de risico's gespreid. Hoewel de scheiding niet strikt was, lag het zwaartepunt bij het CVI op isolatiepogingen uit veterinaire bronnen en bij het RIVM op isolaties uit humane materialen en omgevingsmonsters.

2.2 Bronmateriaal

2.2.1 *Herkomst*

Vanwege de beschikbaarheid van diverse gegevens en het belang van de bronopsporing werden twee patientenclusters geselecteerd in de omgeving van Helmond en Landerd. Voor humane monsters werd contact gezocht met het Jeroen Bosch ziekenhuis in Den Bosch en het PAMM laboratorium in Veldhoven zodat monsters van met *C. burnetii* besmette patiënten zouden worden doorgestuurd. Voor het verkrijgen van veterinaire- en omgevingsmonsters nabij de clusters werd aangesloten bij de monsternamen in het kader van bronopsporing door de nVWA in 2009 en 2010. Van drie positieve geitenbedrijven werden van 20 geiten per bedrijf bloedmonsters (EDTA bloed) genomen. De stammencollectie van het CVI werd aangesproken om veterinaire monsters uit hetzelfde gebied aan de humane/omgevingstammen te koppelen. Milieumonsters van stof en mest in de stallen en van de lucht (door filtratie) werden genomen op de eerder genoemde geitenbedrijven nabij Helmond en Landerd. Bodem en luchtmonsters werden ook genomen in een straal van 500m rond het bedrijf. Melk en melkfilters van besmette bedrijven werden verkregen via de nVWA. Daarnaast werd de milt van een aantal in het wild gevangen ratten gebruikt. Deze ratten werden gevangen in 2008 en 2010, nabij geitenboerderijen in de omgeving van Weert (Noord-Limburg).

Na een aantal isolatiepogingen bleek (zoals hieronder beschreven) dat kweek alleen succesvol was als er relatief hoge hoeveelheden *C. burnetii* in de monsters aanwezig zijn. Alleen monsters waarin met qPCR een Cq lager dan 30 gemeten werd voor het multicopy target IS1111, konden dienen als inoculum voor een succesvolle kweek. De hoeveelheid potentieel bruikbare monsters uit de omgeving van de beoogde clusters bleek daarmee zeer beperkt. Daarom werden uiteindelijk alle monsters met voldoende *C. burnetii* DNA gebruikt voor kweekpogingen, ook wanneer deze van buiten de voorkeurslocaties kwamen. De overweging hiervoor was dat het belangrijkste criterium voor de te verkrijgen genoomsequenties was dat deze genetisch verschillen om zodoende betekenisvolle informatie te verkrijgen. De herkomst vanuit de geselecteerde clusters was daarbij van secundair belang.

2.2.2 *Opwerking*

Met materiaal afkomstig van verschillende bronnen zijn isolatiepogingen ondernomen. De voorbehandeling verschilde per monster. Doel van de voorbehandeling was om *C. burnetii* cellen vrij te maken uit de matrix en om de groei van niet- *C. burnetii* bacteriën te verhinderen.

Om cellen vrij te maken uit de matrix werd het gebruik van de FastPrep methode onderzocht. Met deze methode wordt de matrix mechanisch afgebroken door heftige bewegingen in aanwezigheid van kleine balletjes. Bij deze voorbewerking is het natuurlijk essentieel dat de *C. burnetii* cellen niet te veel beschadigen en kweekbaar blijven. De mechanische disruptie met de FastPrep methode wordt ook gebruikt om bacteriële cellen te lysisen. Het is daarom belangrijk een protocol te gebruiken dat geschikt is om de matrix kapot te maken zonder *C. burnetii* teveel te beschadigen. Een te lange of heftige FastPrep behandeling kan resulteren in lysis van alle *C. burnetii* cellen. Blootstelling van *C. burnetii* referentiestam Nine Mile (NM) aan het FastPrep protocol liet zien dat deze behandeling schade aan de cultures aanricht. Na enige dagen was sprake van een tot 50-voudige reductie in *C. burnetii* DNA in de behandelde cultures wanneer vergeleken met de onbehandelde controle. De

groei herstelde zich wel en na 2 weken hadden cultures met en zonder Fastpreppen weer dezelfde hoeveelheid DNA. Fastpreppen gedurende 20 of 40 seconden maakte daarbij geen verschil. Het is belangrijk te realiseren dat het fastpreppen gebeurde op celcultures en dat de directe schade aan *C. burnetii* cellen daarmee waarschijnlijk aanzienlijk groter was dan wanneer *C. burnetii* behandeld wordt als het in weefsels of andere matrixen ingenesteld is. De methode is onvermijdelijk om 'stugge' materialen te kunnen verwerken, maar moet dus terughoudend toegepast worden en vermeden wanneer het type monster dit toelaat.

Voor het verhinderen van de groei van secundaire bacteriën werd het gebruik van filtratie, van antibiotica (penicilline / streptomycine) en van verhitting onderzocht. Deze mogelijkheden voor selectieve remming van secundaire bacteriën zijn gebaseerd op onderscheidende kenmerken van de spore-achtige vorm van *C. Burnetii* (de small cell variant, SCV) namelijk de in vergelijking met veel andere bacteriën geringe grootte (minimale doorsnede van 0,3 µm) en resistentie tegen verhitting en chemicaliën. De mate van selectiviteit en dus de mate waarin *C. burnetii* geremd wordt verschilt per behandeling. Om inzicht te krijgen in de bruikbaarheid van de verschillende methodes werden een aantal experimenten uitgevoerd.

Om te onderzoeken welke filtratie gebruikt kan worden zonder teveel verlies van *C. burnetii* cellen, werd van verschillende materialen met *C. burnetii* cellen het verschil gemeten tussen de Cqs voor en na filtratie. *C. burnetii* cultures gegroeid op gastheercellen werden gefilterd met 0,8 en 0,45 µm filters. Placentamateriaal werd na fastpreppen gefilterd met 20, 5, 0,8 en 0,45 µm filters. Filtratie met filters van 0,8 µm of groter lieten geen verlies van *C. burnetii* zien. Echter, filtratie met 0,45 µm resulteerde in een verlies van rond de 90%. Dit is een aanzienlijk verlies, vooral wanneer het bronmateriaal geen hoge concentratie aan *C. burnetii* bevat. Filtratie met 0,45 µm werd daarom bij voorkeur vermeden. Echter, bij een aantal monstertypes met hoge concentraties aan bacteriën (zoals mest) was 0,45 µm filtratie onvermijdelijk. De consequentie van het niet afdoende verwijderen van overige bacteriën was namelijk infectie en afsterven van de gastheercellen, hetgeen een zeker einde van de kweek betekent. Een vergelijking van de groei van *C. burnetii* NM stam met en zonder penstrep (penicilline + streptomycine) in het medium liet zien dat penstrep de groei van *C. burnetii* remt (Figuur 3). Maar, toevoeging van penstrep had ook als resultaat dat infectie van het celdek van de gastheer voorkomen werd en is daarom aan te raden bij monsters die niet steriel afgenomen zijn. Bijvoorbeeld, bij het gebruik van placenta's als bronmateriaal had het celdek bij een isolatiepoging na 3 tot 10 dagen losgelaten. Penstrep voorkwam deze infectie en *C. burnetii* kon succesvol geïsoleerd worden.

Om verhitting te kunnen gebruiken voor inactivatie van secundaire bacteriën in monsters moest uitgezocht worden welke blootstelling aan verhoogde temperatuur *C. burnetii* cellen nog kunnen overleven. Hiertoe werden *C. burnetii* NM cellen geïncubeerd bij verschillende temperaturen (55°C, 60°C, 65°C en 70°C) en gedurende verschillende tijden (1, 5 en 10 minuten). Verhitting tot 70°C gedurende 5 of 10 minuten en tot 65°C gedurende 10 minuten zorgde voor complete remming van de *C. burnetii* groei (Figuur 2). De overige tijden en temperaturen hadden geen of matige invloed op de groei van *C. burnetii*. Er werd gekozen voor een incubatie bij 60°C gedurende 10 minuten. Of deze verhitting voldoende is de groei van overige micro-organismen te onderdrukken kan niet onderzocht worden omdat in de verschillende monsters verschillende en veelal onbekende bacteriën aanwezig zullen zijn. Ook is het onbekend of de Nederlandse stam een vergelijkbare hitte-resistentie heeft als de gebruikte NM referentiestam.

Met gebruik van de verkregen resultaten werden protocollen voor het voorbehandeling van de monsters en de kweek opgesteld. Kweekpogingen werden ondernomen vanuit de volgende bronmaterialen:

<i>Humaan</i>	<i>Omgeving</i>	<i>Veterinair</i>
Thrombus	Melkfilter (geitenboerderij)	Placenta (schaap)
Aortawand	Melk (geit)	Placenta (geit)
Bloed	Mest (geitenboerderij)	
Van 1 patient:	Stofswab (geitenboerderij)	
- Longweefsel	Luchtfilter (geitenboerderij)	
- Hersenweefsel	Rattenmilt (wilde ratten gevangen rondom geitenboerderijen)	
- Milt		
- Lever		
- Aortaklep		
- Semen		

2.3 Isolatie en vermeerdering

2.3.1 Algemene procedures

C. burnetii is geclassificeerd als BSL-3 organisme vanwege de lage infectieuze dosis en de ernstige infecties die het kan veroorzaken. Het is daarom van groot belang dat een effectieve inactivatieprocedure wordt gebruikt voordat potentieel gecontamineerd materiaal uitgevoerd kan worden naar een lager inperkingsniveau.

Voor chemische decontaminatie van gebruikte materialen werd op het RIVM gekozen voor het gebruik van Virkon S, gevolgd door afspoelen met 70% ethanol om het corrosieve middel te verwijderen. Deze keuze was gebaseerd op literatuurgegevens en praktische overwegingen. Omdat onduidelijkheid bestond over de noodzakelijke inwerktijd van Virkon S, een mogelijk gebruik van alleen ethanol, en om de procedure te valideren voor het RIVM laboratorium, werden decontaminatie-experimenten uitgevoerd. Hieruit werd geconcludeerd dat 2 minuten inwerktijd voor Virkon S voldoende was, en dat gebruik van alleen ethanol *C. burnetii* wel remt maar niet doodt. Voor hitte-inactivatie werden monsters geïncubeerd bij 100°C gedurende 30 minuten. Deze procedure werd uitgetest op het RIVM en bleek effectief (Figuur 3).

2.3.2 Isolatie

Het kweken op cellijnen was geen probleem voor de referentiestam NM. Deze stam is echter in tientallen jaren aangepast aan laboratoriumomstandigheden en groeit dus optimaal op cellijnen. Omdat we in dit project op zoek waren naar nieuwe isolaten die mogelijk verschillende groeiomstandigheden vergen, werden ook de kweekomstandigheden gevarieerd.

Door gebruik van verschillende gastheer-cellijnen werd een poging gedaan potentieel afwijkende infectiviteit voor verschillende gastheercellen te ondervangen. Als gastheercellen zijn getest de cellijnen Vero (Humane niercellijn), BGM (Green Monkey niercellijn), A549 (Humane longcellijn), RAW (Humane macrofagen cellijn). Daarnaast werd getest of de protozo *Acanthamoeba polyphaga* als gastheer voor de kweek kunnen dienen. Kweek op al deze cellijnen behalve de protozoën was mogelijk, maar de Vero cellijn gaf de beste resultaten.

Er werd uitgezocht of het centrifugeren van monstermateriaal op de gastheercellen (om deze beter in contact te brengen) de kans op succesvolle kweek kon vergroten. Er bleek meteen na de infectie een iets lagere Cq gemeten te worden, hetgeen een efficiëntere infectie suggereert. Maar al na een week was het verschil niet meer waarneembaar. Er werd dan ook besloten deze arbeidsintensieve procedure niet te gebruiken.

Om langzaam groeiende *C. burnetii* niet kwijt te raken tijdens het doorzetten van het medium werd gevarieerd met de manier waarop medium en cellen doorgezet werden (volume, frequentie en methode), en met de periode waarin de groei geobserveerd werd. Variatie van de hoeveelheid medium die ververst wordt (alles of de helft) en de frequentie van verversing (om de 3 dagen of om de 7 dagen) bleek geen verschil te maken bij de NM stam waarmee dit getest werd (Figuur 4A). Om het effect op een minder aan het lab aangepaste stam te onderzoeken werd hetzelfde getest met verdund en onverdund placentamateriaal als inoculum. (Figuur 4B). Het al dan niet slagen van de kweek was minder duidelijk bij dit experiment, maar wel duidelijk was dat een minder frequente verversing van het medium geen positief effect op het slagen van de kweek had. Het is natuurlijk mogelijk dat het bij een andere, langzamer groeiende stam wel een verschil zou maken, maar dit werd niet onderzocht.

2.3.3 Vermeerdering

Voor het uitvoeren van een geslaagde NGS (Next Generation Sequencing) run was productie van 1-10 µg DNA van hoge kwaliteit nodig dat zo min mogelijk van het contaminerende gastheercellen DNA bevat. De potentiële opbrengst van een bepaald volume kweekmateriaal kan geschat worden aan de hand van de gemeten Cq van *C. burnetii* DNA. Bij de kweek van de meeste isolaten daalde de Cq's voor het single-copy target ComI niet beneden 25 (voor multicopy target IS1111 beneden 20) (Figuur 5). Dit had als consequentie dat voor de meeste stammen aanzienlijke hoeveelheden kweeksupernatant geproduceerd, geogost en opgewerkt moesten worden. Dergelijke productie van honderden milliliters kweeksupernatant vereist een significante opschaling van kweekvolume en -duur. Om aan voldoende DNA voor sequencing te komen is het daarom zeer wenselijk om de concentratie van *C. burnetii* in de stammen die in kweek zijn omhoog te krijgen (= Cq omlaag). Variatie in de hoeveelheid en frequentie van het vervangen van medium had geen effect op de opbrengst (zie boven). Een vergelijking tussen het gebruik van een confluent (cellen 4 dagen oud) dan wel niet-confluent (1 dag oude cellen) celdek op de kweekopbrengst liet een iets hogere opbrengst voor de niet-confluente cellen zien. Ook werd geprobeerd om de *C. burnetii* opbrengst te verhogen door gevriesdood kweekmateriaal opnieuw op te brengen op gastheercellen. Een verlaging van de Cq werd inderdaad bereikt voor de NM controle cellen, maar voor monstermateriaal lukte dit niet gedurende de 2,5 weken waarin het experiment gevolgd werd. Bij latere experimenten bleek dat een duidelijk lagere Cq ook voor een aantal Nederlandse stammen bereikt kon worden, als de cultures maar langere tijd aangehouden werden (Figuur 5). Helaas werd dit voor slechts een klein aantal stammen bereikt. Met de verkregen gegevens werden de condities geoptimaliseerd voor vermeerdering van de Nederlandse isolaten. Figuur 5B geeft de Cq waarden voor de kweek van een aantal van deze stammen waarbij de kweek gestart werd met gevriesdood materiaal van een eerdere isolatie.

2.3.4 Muizenpassage

Volgens de literatuur wordt de kans op een succesvolle isolatie van *C. burnetii* vergroot door het inoculum te laten passeren door een muis. Na insputting in de buikholte werkt de muis als een soort biologische filter waarbij de meeste

bacteriën door het afweersysteem opgeruimd worden, terwijl *C. burnetii* zich nestelt in de milt en zich daarin vermenigvuldigd. Gebruik van deze geïnfecteerde milt als inoculum voor celkweek vergroot de kans op een succesvolle isolatie aanzienlijk.

Bij het CVI kan een dergelijke muizenpassage onder BSL3 condities uitgevoerd worden. Er werd besloten om deze proef uit te voeren met in totaal 16 monsters van het CVI en RIVM die vanwege de herkomst potentieel interessant waren, maar waarbij rechtstreekse kweekpogingen niet gelukt waren. Het ging in de meeste gevallen om inocula die eerder geen *C. burnetii* groei hadden laten zien. In een enkel geval was wel groei te zien geweest, maar werd onderzocht of door de muizenpassage de productie omhoog kon (Cq omlaag). De muisisolatie bestond uit een primaire passage en een secundaire passage. Bij de primaire passage werden de muizen (OF1 vrouwelijke muizen) 21 dagen aangehouden; bij de secundaire passage 7 dagen om een extra groeistimulatie te bewerkstelligen. Deze secundaire passage was slechts voor een beperkt aantal isolaten succesvol; de primaire isolatie leverde een beter resultaat op. Muizenpassage leverde succesvolle kweken op van de thrombus, mest en melkfilter monsters, waarbij de laatste ook een aanzienlijke daling van Cq (en dus goede groei) liet zien. Voor deze drie monsters waren de rechtstreekse kweekpogingen niet gelukt. Voor de rattenmilt monsters toonde de muizenpassage geen verbetering en voor een ervan was de rechtstreekse kweek succesvoller geweest. Voor de melk en stof monsters zorgde ook de muizenpassage niet voor groei. Figuur 5B. Helaas moest later geconcludeerd worden dat het melkfilter isolaat een besmetting met de positieve controle betrof. Het type kwam namelijk overeen met dat van de positieve controle (NMS) stam, en dit type is nooit aangetroffen in de Nederlandse uitbraak. Daarbij komt dat Cq waardes van 14 bereikt werden die eerder alleen bij de positieve controle gemeten waren, en dat een duplo muizenpassage helemaal geen groei liet zien. Deze resultaten laten zien dat je altijd bewust moet zijn van de mogelijkheid van kruiscontaminatie bij dit soort complexe en langdurige experimenten.

2.4 DNA extractie en zuivering

Voor het in handen krijgen van voldoende materiaal van voldoende kwaliteit voor Next Generation Sequencing (NGS) uit de kweek is het nodig om zoveel mogelijk gastheer DNA (de eukaryote celkweek die benodigd is voor de groei van *Cb*) te verwijderen en vervolgens vanuit de nog intacte *C. burnetii* cellen DNA te extraheren en zuiveren.

2.4.1 Verwijderen gastheer DNA/RNA

Aanwezigheid van gastheer DNA zal de NGS (nieuwe generatie sequencing) nadelig beïnvloeden. De sequenties kunnen er achteraf wel uitgefilterd worden met behulp van bioinformatica software, maar dit gaat ten koste van de kwaliteit en kwantiteit van het aflezen van *C. burnetii* sequenties, geeft extra werk, en als het aandeel gastheer DNA te groot wordt komt het aflezen van *C. burnetii* sequenties in het gedrang. De volgende stappen worden genomen om zoveel mogelijk gastheer DNA kwijt te raken. Allereerst wordt uit de kweekflessen het supernatant geogst in plaats van getrypsiniseerd celmateriaal, omdat dit relatief verrijkt is in *C. burnetii* cellen. Het vrijmaken van *C. burnetii* cellen uit intacte cellen of celresten wordt gestimuleerd door toevoegen van een milde concentratie Triton (0,05%) om gastheer celmembranen op te lossen. Filtratie door een 0,8 µm filter wordt uitgevoerd om zoveel mogelijk grotere celresten te

verwijderen. Na concentratie van de *C. burnetii* cellen wordt vervolgens extracellulair DNA en RNA (voornamelijk afkomstig van gelyseerde gastheercellen) afgebroken met DNase en RNase. Met behulp van ontwikkelde amplificatie methoden werd de contaminatie graad van gastheercellen (op een genomisch gen en een mitochondriaal gen) in de gaten gehouden. De methode met de laagste contaminatie graad maar met voldoende Coxiella DNA werd gebruikt voor de grootschalige vermeerdering.

2.4.2 DNA isolatie *C. burnetii*

Van de geconcentreerde en met nucleases behandelde *C. burnetii* cellen moet het DNA geïsoleerd worden. Belangrijk hierbij is dat eventueel overgebleven intacte cellen in het DNA extract effectief geïnactiveerd moeten worden vanwege de hoge pathogeniciteit van *C. burnetii*. Vanwege de beperkingen van het werken onder BSL3 condities is het van belang om zo vroeg mogelijk in de extractie en zuivering het materiaal te inactiveren zodat het verder onder normale laboratoriumcondities behandeld kan worden. De gekozen inactivatie-procedure en DNA extractiemethode zullen beide effect hebben op de opbrengst en kwaliteit van het DNA.

Bij het RIVM is geprobeerd om *C. burnetii* cellen na concentratie en DNase-behandeling te inactiveren met de eerder gevalideerde (zie boven en Figuur 3) incubatie bij 100°C gedurende 30 minuten, gevolgd door DNA extractie met de Nuclisens Magnetic Beads nucleic acid extraction kit. Deze aanpak bleek DNA van onvoldoende kwaliteit op te leveren. Daarom werd de procedure overgenomen die bij het CVI ontwikkeld werd voor de extractie en zuivering van *C. burnetii* DNA. Een belangrijk verschil is een veel mildere inactivatiestap (70°C gedurende 10 minuten) die voorafgegaan wordt door een langdurige protease-digestie (uit de Qiagen blood and tissue kit). Deze procedure zorgt voor voldoende inactivatie van *C. burnetii* cellen, zoals experimenteel gevalideerd werd. Uit de geïnactiveerde *C. burnetii* cellen wordt vervolgens DNA geëxtraheerd met behulp van de phenol/ chloroform extractie welke zorgt voor DNA van hoge kwaliteit (zuiver en niet gefragmenteerd).

2.5 Genoomsequencing

2.5.1 Isolaten opgewerkt voor sequencing

Een aantal isolaten is geselecteerd op grond van herkomst (veterinair en milieu), MLVA type (verschillende types) en DNA opbrengst in kweek (zo hoog mogelijk) om DNA van te isoleren. Het gaat om de volgende isolaten:

Isolaat	bronmateriaal	Locatie	MLVA type	Sequencing stadium
CVI 1_14160-02	Geitenplacenta	Alphen (NB)	CbNL01	Draft genome sequence
CVI 2_18430-02*	Schapeplacenta	Vorstenbosch (NB)	CbNL01	Draft genome sequence
CVI3_NMref	Referentiestam NM (teek)	USA	NM	Draft genome sequence
Placenta 1050	Geitenplacenta	Noord-Limburg	A	DNA in sequencer wachtrij
Melkfilter ^a	Melkfilter geitenbedrijf		A	DNA in sequencer wachtrij

Rattenmilt 10-1025	Bruine rat gevangen op melkvee bedrijf	Noord-Limburg	E	DNA in sequencer wachtrij
Placenta UK	Geitenplacenta		E	DNA in sequencer wachtrij
AmplifiedCb ^b	Een geamplificeerd isolaat			

^a Van dit monster werd later geconcludeerd dat het een besmetting met de positieve controle betrof, zie pagina 9.

^b *Coxiella burnetii* genomisch materiaal in vitro vermeerderd .

Een afwijkend monster was 'AmplifiedCb'. Dit betrof een eerder gekweekt isolaat waarvan de sequence opgehelderd was, dat daarna middels genoomamplificatie (in vitro) vermeerderd en gesequenced werd. Vergelijk van de verkregen sequenties moet uitwijzen of deze aanpak sequenties oplevert die voldoende representatief zijn (bias-vrij). Omdat voor sequencing en hoge-resolutie typering relatief veel DNA nodig is en deze technieken daarmee gebonden zijn aan vermeerdering met kweek, zou een methode waarbij DNA representatief wordt vermeerderd zonder kweek, welkom zijn. Daarmee kan deze aanpak geïmplementeerd worden in toekomstig onderzoek, hetgeen vooral interessant is voor niet-kweekbare of dode bacteriën om deze zo natief mogelijk te kunnen bestuderen.

Het CVI heeft samenwerkingsverbanden met universitaire sequencing centers. Momenteel worden bepaalde typen genomische sequencing bij een commerciële instelling (BaseClear, Leiden) uitbesteed, hierbij wordt NGS uitgevoerd met de Illumina technologie. In het kader van aanpalende projecten wordt het genoom van een Nederlandse *C. burnetii* stam *de novo* gesequenced. Hiervoor worden 2 NGS technologieën gebruikt, namelijk 454 sequencing (lange sequentiereads, Roche) en Illumina (korte sequentiereads). Voor dit project is NGS uitgevoerd met de Illumina zogenaamde resequencing techniek waarbij zeer veel, maar korte sequenties worden gegenereerd die middels een referentiegenoom kunnen worden vergeleken. Aan deze gemapte sequentie kunnen allerlei analyses worden gedaan inclusief het opzoeken van genetische variatie (puntmutaties en structurele varianten), belangrijk voor de verfijning van bestaande naar hogere-resolutie typeringsmethoden.

2.5.2 Sequentieanalyse

Een allereerste sequentie analyse van de drie bovengenoemde stammen laat zien dat de genomen grofstoffelijk wel lijken op bijvoorbeeld de NM referentiestam waarvan de genoomsequentie publiekelijk beschikbaar is. De voor dit onderzoek gebruikte en ook gesequenste NM referentiestam heeft een paar kleine afwijkingen tov de gepubliceerde genoomsequentie, hetgeen niet verwonderlijk is voor een evoluerende en veelvuldig rondgestuurde laboratoriumstam. De verschillen met de Nederlandse geiten- en schapenstammen waren veel groter.

In eerste instantie is geprobeerd de resultaten van de MLVA typering zoals die bekend was van die isolaten te reproduceren *in silico*. Genomische sequenties zijn daarom na filteren van contaminant (gastheercellen) sequenties geassembleerd tot een artificieel chromosoom. Op dit chromosoom kan *in silico* een PCR worden uitgevoerd door de primers te mappen tegen de genomen en de virtuele amplicons te analyseren. Zoals tabel 1 in de bijlage laat zien, zijn op de vermelde 9 loci van de Europese MLVA database duidelijk verschillen te zien tussen NM en de andere isolaten. De genomen reproduceren *in silico* daarmee

het op het lab bepaalde MLVA patroon. Zoals echter al blijkt uit o.a. figuur 6 in de bijlage zijn de genomen op veel meer verschillende plaatsen structureel gevarieerd. Afwijkingen aan de rode 45° lijn laten zien dat er wel sequentiehomologie is (rood of blauw) maar dat de genomen structureel anders zijn ingedeeld. Deze structurele variaties dienen bij uitstek voor de ontwikkeling van high resolution typeringsmethoden.

3 PRODUCTEN EN VERVOLGACTIVITEITEN

3.1 Producten

Isolaten *C. burnetii*

Als resultaat van dit project zijn er nu 19 *C. burnetii* isolaten van de Nederlandse uitbraak in kweek, 9 bij het RIVM en 10 bij het CVI. Deze isolaten zijn voornamelijk afkomstig van veterinaire bronnen, maar daarnaast zijn er 2 stammen vanuit humaan materiaal gekweekt en 4 vanuit verschillende omgevingsmonsters (rattenmilten, melkfilter, mest). Voor zover getypeerd behoren deze isolaten tot 2 verschillende MLVA types. In Nederlandse monsters hebben we op het RIVM inmiddels 6 types kunnen onderscheiden, maar hierbij is 1 type veruit dominant. De genomesequenzen zullen verder moeten uitwijzen in welke mate de verschillende MLVA types op detailniveau verschillen, en of er nog grote verschillen zijn binnen 1 MLVA type.

Deze Nederlandse isolaten zijn beschikbaar voor diverse studies. Ze worden op het moment gebruikt in verschillende onderzoeksprojecten (zie 4.1) naar verbeterde typeringsmethodes, verschillen tussen het verloop van acute en chronische Qkoorts, bemonstering van aerosolen en transmissie via de lucht, de rol van verschillende dieren (wilde ratten, runderen, schapen) als reservoir en vaccinkandidaatstudies.

Kweekfaciliteiten en -ervaring

Er is ruime ervaring opgedaan met het isoleren en kweken van *C. burnetii* vanuit diverse bronnen. Laboratoria zijn ingericht, procedures en protocollen toegespitst op het kweken van dit hoog-pathogene organisme zijn opgezet en geïmplementeerd, en de kweekervaringen zijn overgedragen tussen medewerkers en beide instituten.

Genomesequenties *C. burnetii*

Mede als resultaat van dit project zijn de genomen van 3 isolaten grotendeels opgehelderd en komen de ruwe sequentiedata van nog 4 isolaten binnen 3 maanden beschikbaar. Doordat het isoleren het overgrote deel van de inspanningen heeft geleverd, is de assemblage nog in een pril stadium. Voldoende voor een eerste analyse (zie 2.5.2.), maar voor volledige assemblage en het determineren van voor Nederland specifieke markers is vervolgonderzoek nodig. Hiervoor wordt het genoom van 1 dominante Nederlands isolaat gebruikt als vergelijkingsmateriaal. Doordat de genomesequenties een essentiële rol spelen in een aantal vervolgprojecten van beide deelnemende onderzoeksgroepen, is een continuerende samenwerking afgesproken en is de verdere verwerking en publicatie van deze sequenties gewaarborgd. De publicatie van het 1^e Nederlandse *Coxiella burnetii* genoom wordt verzorgd door het CVI en RIVM.

Next Generation Sequencing

De ervaring die opgedaan is met het opwerken en sequencen van de *C. burnetii* genomen is van grote waarde voor lopend en toekomstig *C. burnetii* onderzoek. Bij een aantal van de hierboven en in 4.1 genoemde projecten, bijvoorbeeld die waarin het verschil in verloop van acute en chronische Qkoorts onderzocht wordt, zal *C. burnetii* genomesequencing een voorname rol spelen. Daarnaast is

de opgedane ervaring zeer bruikbaar voor onderzoek naar andere micro-organismen. Het is te verwachten dat NGS technieken al binnen een paar jaar een groot deel van andere laboratoriumtechnieken die gebruikt worden voor typering en detectie zullen gaan vervangen of aanvullen.

Typeringsmethodes

De beschikbare genoomsequenties zullen verbeterde typering/differentiatie mogelijk maken. Na identificatie van voor Nederlandse stammen unieke 'single nucleotide polymorphisms' (SNPs), zullen assays ontwikkeld worden die deze SNPs detecteren. Hiervoor wordt door het RIVM samengewerkt met andere onderzoeksgroepen die aan SNP typering van *C. burnetii* werken. Een groep in de VS (University of Arizona) is een SNP typering aan het opzetten die op het RIVM ook getest wordt op verschillende monsters. Uitbreiding van deze assay voor subtypering van Nederlandse monsters ligt in het verschiet. Eerste analyses laten al zien dat er voldoende structurele variatie tussen de genomen zit, zie hiervoor 2.5.2. Detectie van SNPs en structurele varianten kan gebeuren met qPCR, maar ook multiplex methodes als microarrays (bijvoorbeeld comparative genome hybridisation arrays) kunnen voor moleculaire epidemiologie gebruikt gaan worden. Deze technieken kunnen een nauwkeurigere, gevoeliger en snellere typering van monsters mogelijk maken. Sommige van deze methodes kunnen ervoor zorgen dat de vele monsters die nu niet getypeerd kunnen worden vanwege een te lage hoeveelheid DNA wel beschikbaar komen typering, hetgeen een sterke verbetering betekent voor bronopsporing en identificatie van verspreidingsroutes.

Om te voorkomen dat identieke stammen voor genoomsequencing geselecteerd worden zijn deze eerst getypeerd met bestaande technieken. De meeste isolaten bleken van hetzelfde in Nederland dominante type. Om binnen dit type toch onderscheid te kunnen maken is tijdens het project een methode om stammen te kunnen onderscheiden ontwikkeld. Met deze methode wordt voor elk isolaat een uniek fragmentenpatroon gemaakt dat geanalyseerd kan worden op een standaard sequencer. Het is een relatief simpele procedure om een uniek patroon van enkele tientallen fragmenten te genereren. De methode werkt, maar moet nog geoptimaliseerd worden. Een publicatie van de resultaten is voorzien voor eind 2011.

Samenwerking

Het project heeft ervoor gezorgd dat de samenwerking tussen 2 actieve spelers in het Nederlandse onderzoek naar Qkoorts is geïntensiveerd. Dat is met name waardevol omdat het RIVM vooral vanuit het volksgezondheidsonderzoek werkt en dus een sterke band met het ministerie van VWS heeft, terwijl het CVI meer werkt vanuit het dier/zoönotisch onderzoek en het (voormalige) ministerie LNV, nu EL&I. Zoals eerder genoemd werd kennis en ervaring uitgewisseld, waarbij het RIVM heeft kunnen profiteren van de op het CVI aanwezige ervaring met kweek en genoomsequencing.

3.2 Gebruik van producten in lopende projecten

De resultaten van het onderzoek wordt gebruikt in verschillende lopende onderzoeksprojecten. Op het RIVM gaat het om de volgende projecten:

- Isolaten worden gebruikt in onderzoek waarin betrouwbare kwantificering van *C. burnetii* in aerosolen wordt opgezet en de transmissie via de lucht wordt onderzocht (Qair, ZonMW, 2011-2012, gefinancierd door ZonMW-NWO).

- Ook in onderzoek naar de rol van ratten als reservoir voor *C. burnetii* (2011-2012, gefinancierd door ZonMW) worden Nederlandse isolaten gebruikt, alsook andere materialen en procedures ontwikkeld in het huidige project.
- Genoomsequenties worden gebruikt in een onderzoeksproject naar verschillen tussen het verloop van acute en chronische Qkoorts (Sequela, 2011-2014, Strategisch Onderzoek RIVM). Hierbij zal gezocht worden naar biomarkers in *C. burnetii* en in de gastheer en zullen verbeterde typeringsmethodes ontwikkeld worden. Daarbij zal net als in het huidige project *C. burnetii* geïsoleerd worden uit humaan materiaal voor genoomsequencing en analyse.
- In samenwerking met T. Pearsson en P. Keim van de University of Arizona wordt een aldaar ontwikkelde SNP typeringsmethode gebruikt om melkmonsters te typeren. De methode wordt uitgebreid met voor Nederland relevante SNPs

Bij het CVI gaat het om de volgende projecten:

- Qgenomics, een AIO project gefinancierd binnen het WOT convenant tussen EL&I en CVI. Dit project richt zich met state-of-the-art technieken op de verschillen tussen Cb isolaten afkomstig van verschillende diersoorten.
- Qplasmids, een ZonMW 2011 project waarin als pilot wordt gekeken naar de betrokkenheid van plasmiden in spreiding en mogelijk virulentie van de Cb isolaten.
- Host and bacterial factors of Q fever in humans and goats, en dan vooral voor het onderzoek naar de expressie van de pathogen kant van de host pathogen interacties. Dit project is gefinancierd door ZonMW en wordt uitgevoerd door een AIO bij het St Radboud ziekenhuis en het CVI.

Al deze projecten profiteren sterk van de in het huidige project verkregen materialen en data, de procedures die opgesteld zijn en de ervaring en training van medewerkers.

4 CONCLUSIE

Uit dit project, aanpalende projecten en literatuur is het volgende beeld naar voren gekomen met betrekking tot verbeterde typering.

Zoals eerder aangegeven is MLVA nu de meest gangbare methode voor typering van *C. burnetii*. Deze methode is gebruikt in studies van humane en veterinaire materialen (Roest *et al.*, 2011, Klaassen *et al.*, 2010, Tilburg *et al.*, 2011, de Bruin *et al.*, 2011). De methode heeft de voordelen van een relatief hoge resolutie en lage kosten, maar in de praktijk blijkt de uitwisseling van informatie tussen verschillende laboratoria erg lastig. Dit komt voornamelijk door een subjectieve interpretatie van de fragmentdata, zowel een precieze meting van de fragmentgrootte als het toekennen van aantallen repeats aan een bepaald fragment kan per laboratorium nogal verschillen. Voor de alternatieve MST methode geldt dit niet; dit is geen fragmentanalyse en de resultaten zijn zeer goed uitwisselbaar. Maar, er is meer monstermateriaal nodig waarvan vaak erg weinig beschikbaar is. Ook is de resolutie waarschijnlijk minder (hoewel een goede vergelijking nog ontbreekt) en is de methode relatief duur.

Voor beide typeringsmethodes geldt dat de selectie van onderscheidende sequenties gebaseerd is op een collectie van diverse en wereldwijd voorkomende isolaten. Hierdoor wordt variatie binnen de Nederlandse uitbraak (mogelijk) niet opgepikt. Beide methodes kunnen met Nederlandse genoomsequenties verbeterd worden. Met behulp van de sequenties kunnen bestaande primers verbeterd worden. Bij de gebruikte protocollen is er bij sommige stammen geen amplificatie van bepaalde loci en daarmee een verlies aan informatie. Daarnaast kunnen nieuwe MLVA en MST loci geïdentificeerd worden die verschillen tussen de Nederlandse isolaten en daarmee additionele informatie opleveren. De verschillen tussen genoomsequenties van isolaten kunnen ook gebruikt worden om SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) te identificeren die onderscheidend zijn voor de Nederlandse genotypes. Het voordeel van het gebruiken van SNPs voor het onderscheiden van genotypes is dat deze makkelijk te detecteren zijn met verschillende methodes, zoals qPCR. SNP detectie is sneller, goedkoper en in de praktijk gevoeliger. Belangrijk is ook dat het onderscheid tussen genotypes duidelijker en beter uitwisselbaar is tussen laboratoria. SNP typering zijn opgezet (Huijsman *et al.*, 2011), maar net als bij eerder genoemde typeringmethodes is resolutie voor de Nederlandse uitbraak beperkt door het ontbreken van voor de Nederlandse uitbraak onderscheidende sequenties. Om de SNP typering te verbeteren is het dus noodzakelijk dat in de genoomsequenties unieke onderscheidende SNPs geïdentificeerd worden die dan onderscheiden kunnen worden met behulp van een detectiemethode naar keuze. Dit werk vormt een onderdeel van eerder genoemde projecten (3.2). De eerste analyses van de verkregen Nederlandse isolaten laten zien dat er voldoende SNPs en structurele variaties in de genomen zit om verbeterde typering mogelijk te maken.

Voor dit project was verbeterde typering het hoofddoel, maar zoals eerder aangegeven vormen genoomsequenties de basis voor veel meer onderzoek. Genoomsequencing is een uiterst waardevolle aanpak voor de studie van pathogenen, maar met name voor organismen die moeilijk te bestuderen zijn vanwege complexe groeiomstandigheden, zoals *Coxiella*. Door sequentieverschillen tussen isolaten te koppelen aan overige gegevens (herkomst, gastheer, virulentie, gevoeligheid voor antibiotica,

groeieigenschappen) kan een verband gelegd worden tussen bepaalde genen of andere gebieden in het genoom en eigenschappen van de isolaten. Hiermee kunnen mogelijk eigenschappen van *Coxiella* (zoals gastheer-specificiteit, ernst ziekteverloop, veroorzaking chronische of acute Q-koorts) verklaard worden en kan er mogelijk zelfs een marker voor geïdentificeerd worden. Ook kan onderzocht worden of Nederlandse isolaten over unieke genen of genvarianten beschikken die de epidemie helpen verklaren. Daarnaast kan door vergelijking van genomen onderzocht worden wat de mate van genuitwisseling is en welke gebieden van het genoom blootstaan aan sterke dan wel minder sterke selectiedruk. Tenslotte kan het genoom dienen als basis voor het ontwikkelen van betere vaccins en medicijnen.

dankwoord

We danken het ministerie van VWS voor financiering van dit onderzoek. Voor het aanleveren van materialen voor het inzetten van kweek worden de volgende mensen en organisaties bedankt. Peter Schneeberger van het Jeroen Bosch Ziekenhuis (JBZ) voor humaan materiaal. Roel Pauw van de nVWA voor het aanleveren van veterinaire monstermateriaal. Chantal Reusken en Rozemarijn van der Plaats voor het beschikbaar stellen van rattenmonsters. Lianne de Heer, Harold van den Berg en Frank Harders worden bedankt voor het uitvoeren en analyseren van de experimenten.

REFERENTIES

- Arricau-Bouvery N, Hauck Y, Bejaoui A, Frangoulidis D, Bodier CC, Souriau A, et al. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiol.* 2006; **6**: 38.
- Glazunova O, Roux V, Freylikman O, Sekeyova Z, Fournous G, Tyczka J, et al. *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerg Infect Dis.* 2005; **11**(8): 1211-7.
- de Bruin et al. 2011. Molecular typing of *Coxiella burnetii* from source finding samples taken in 2009. RIVM Letter report 330291006/2011
- Huijsmans CJ, Schellekens JJ, Wever PC, Toman R, Savelkoul PH, Janse I, Hermans, M. Single-Nucleotide-Polymorphism Genotyping of *Coxiella burnetii* during a Q Fever Outbreak in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol.* 2011; **77**(6): 2051-7.
- Klaassen CH, Nabuurs-Franssen MH, Tilburg JJ, Hamans MA, Horrevorts AM. Multigenotype Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2009; **15**(4): 613-4.
- Roest, H I, R C Ruuls, J J Tilburg, M H Nabuurs-Franssen, C H Klaassen, P Vellema, R van den Brom, D Dercksen, W Wouda, M A Spierenburg, A N van der Spek, R Buijs, A G de Boer, P T Willemsen, and F G van Zijderveld. 2011. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* from ruminants in Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 17:668-675.
- Svraka S, Toman R, Skultety L, Slaba K, Homan WL. Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; **254**(2): 268-74.
- Tilburg J.H.C., Rossen JWA, van Hannen E.J., Melchers W.G.J, Hermans M.H.A., van de Bovenkamp J., Roest I.J, de Bruin A, Nabuurs-Franssen M.A, Horrevorts and C.H.W. Klaassen. Genotypic diversity of *Coxiella burnetii* in the 2007-2010 Q fever outbreak episodes in The Netherlands. submitted to *Journal of Clinical Microbiology.* 2011.
- van Alphen et al. Multispacer Sequence Typing of *Coxiella* infected patients. *In voorbereiding*

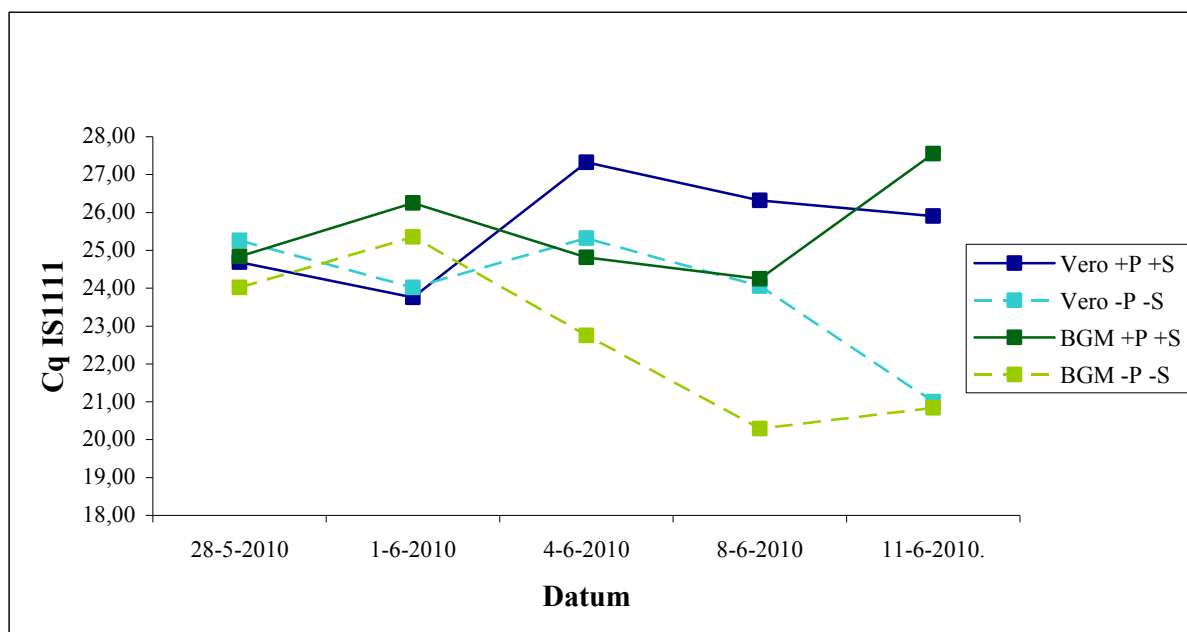
BIJLAGE

FIGUREN en TABEL

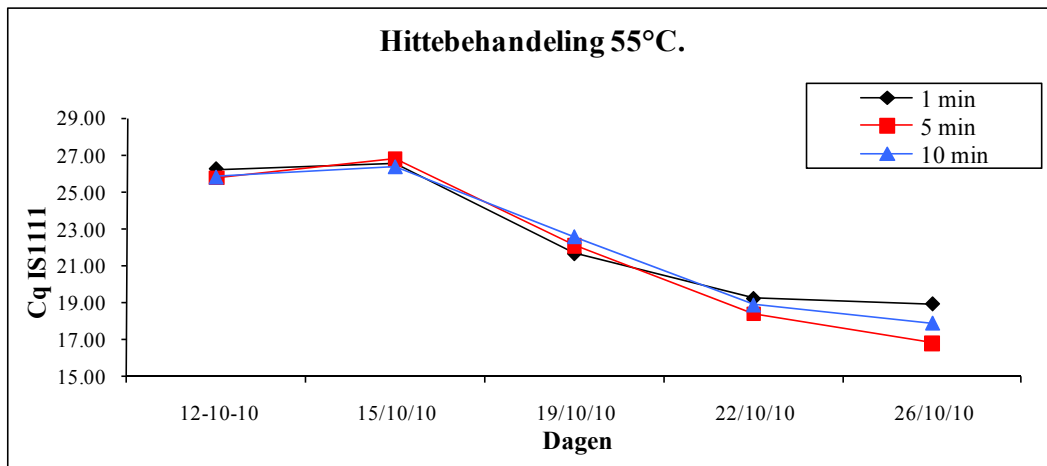
Algemeen

In deze bijlage zijn ter illustratie een aantal figuren weergegeven. Figuren 1-5 beschrijven kweekexperimenten. De X-as geeft de tijdstippen waarop monsters genomen zijn. De Y-as geeft de Cq waardes gemeten met multiplex qPCR. In de meeste gevallen is dit de Cq waarde van het multi-copy target IS1111 waarmee *C. burnetii* het gevoeligst gemeten kan worden. In sommige gevallen is daarbij ook nog de Cq van het single-copy gen ComI weergegeven. Het medium wordt standaard 2 keer per week vervangen waardoor een gelijk blijvende of dalende Cq betekent dat er groei is. Een stijging van de gemeten Cq betekent dat de groei geremd wordt, waarbij een sterkere stijging een sterkere remming aangeeft.

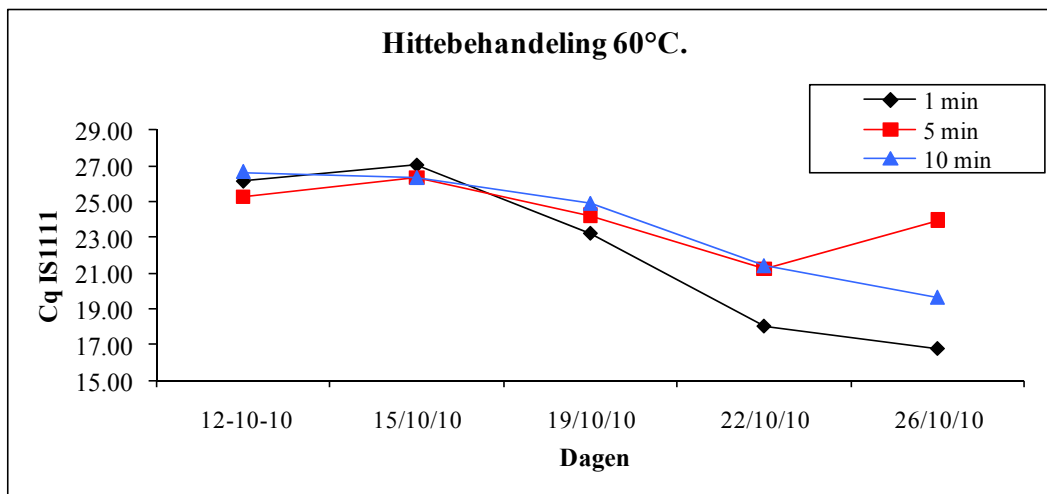
Fig. 1. Effect aanwezigheid antibiotica penicilline/ streptomycine (penstrep) in groeimedium



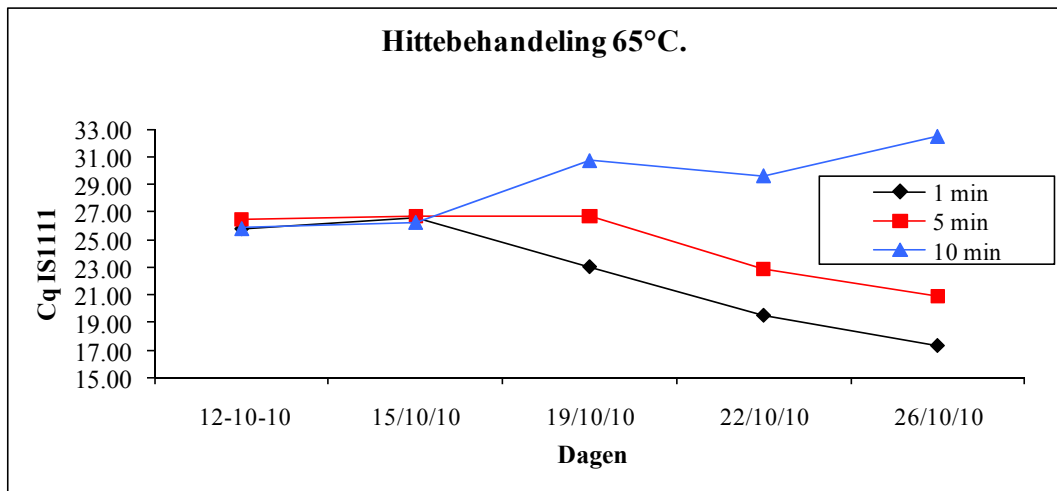
Schematische weergave van de Cp-waarden (100x verdund) voor de detectie van *C. burnetii* (target IS1111) op Vero-, en BGM-cellen. Weergegeven zijn de positieve controle (Nine Mile strain) die doorgezet is naar cellen met penicilline (P)/streptomycine (S) en cellen zonder pen/strep.

Fig. 2. Effect van korte verhitting inoculum op groei *C. burnetii*

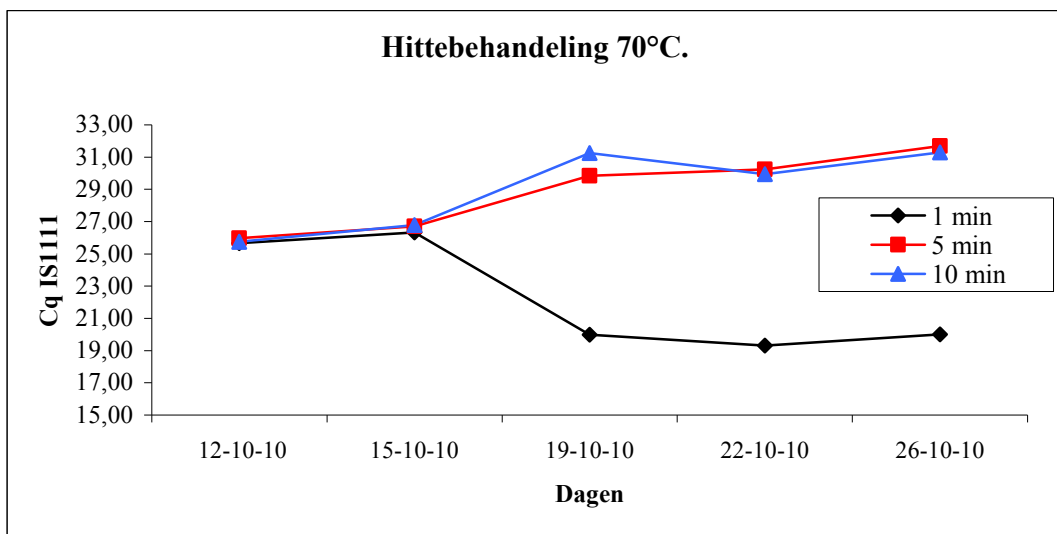
Figuur 2A. Cq-waarden van de detectie van *C. burnetii* (target *IS1111*) . Weergegeven is de positieve controle, na een hittebehandeling bij 55°C gedurende 1, 5 of 10 minuten.



Figuur 2B. Cq-waarden van de detectie van *C. burnetii* (target *IS1111*) . Weergegeven is de positieve controle, na een hittebehandeling bij 60°C gedurende 1, 5 of 10 minuten.

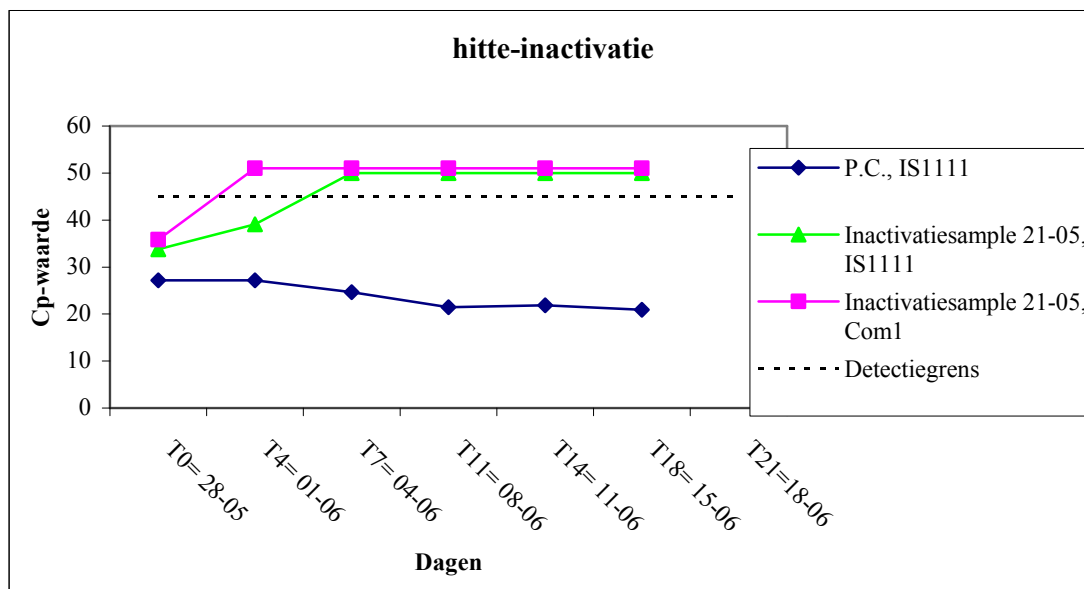


Figuur 2C. Cq-waarden van de detectie van *C. burnetii* (target *IS1111*) . Weergegeven is de positieve controle, na een hittebehandeling bij 65°C gedurende 1, 5 of 10 minuten.

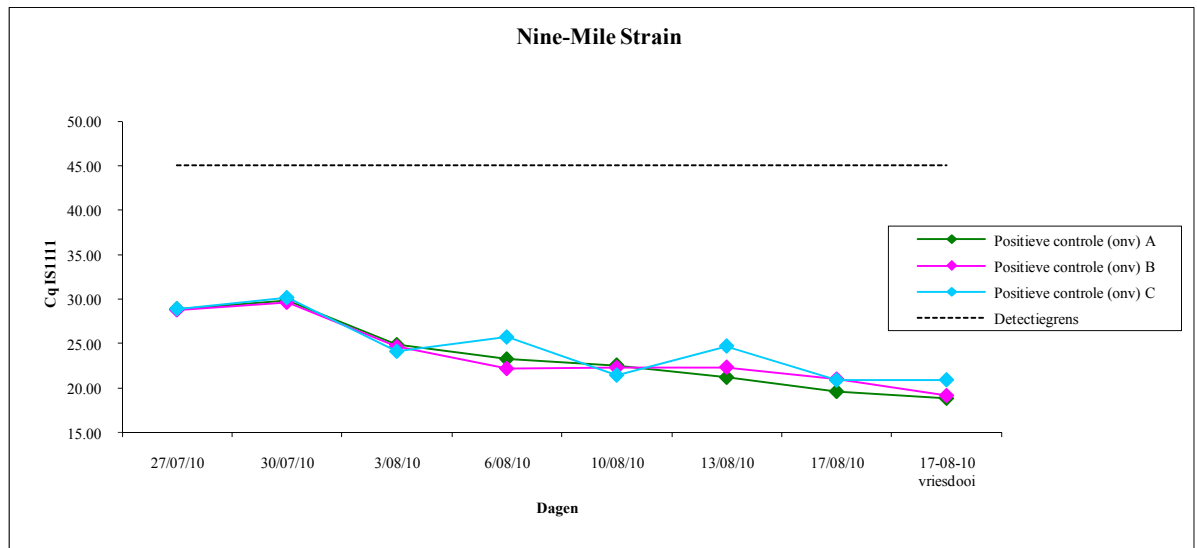


Figuur 2D. Cq-waarden van de detectie van *C. burnetii* (target *IS1111*) . Weergegeven is de positieve controle, na een hittebehandeling bij 70°C gedurende 1, 5 of 10 minuten.

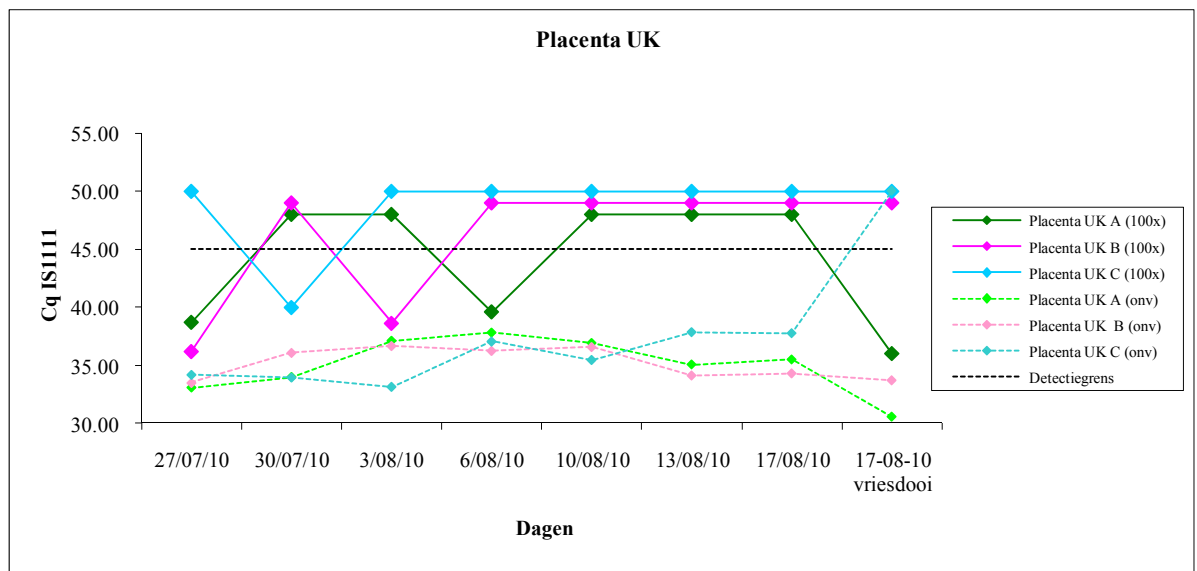
Fig. 3. Inactivatie *C. burnetii* cultures door incubatie bij 100°C gedurende 30 minuten



Cellweek geïnoculeerd met *C. burnetii* Nine-Mile strain (NMS) onbehandeld (positieve controle:PC) of na incubatie bij 100°C gedurende 30 minuten (Inactivatie sample). De Cq waarden zijn gegeven van IS1111 voor van IS1111 van de gedurende Schematische weergave van de Cp-waarden (100x verdund) van de detectie van *C. burnetii* (target *IS1111* en *Com1*) bij de BGM-cellen. De waarden boven de stippellijn (detectiegrens) zijn fictieve waarden (negatief voor *C. burnetii*).

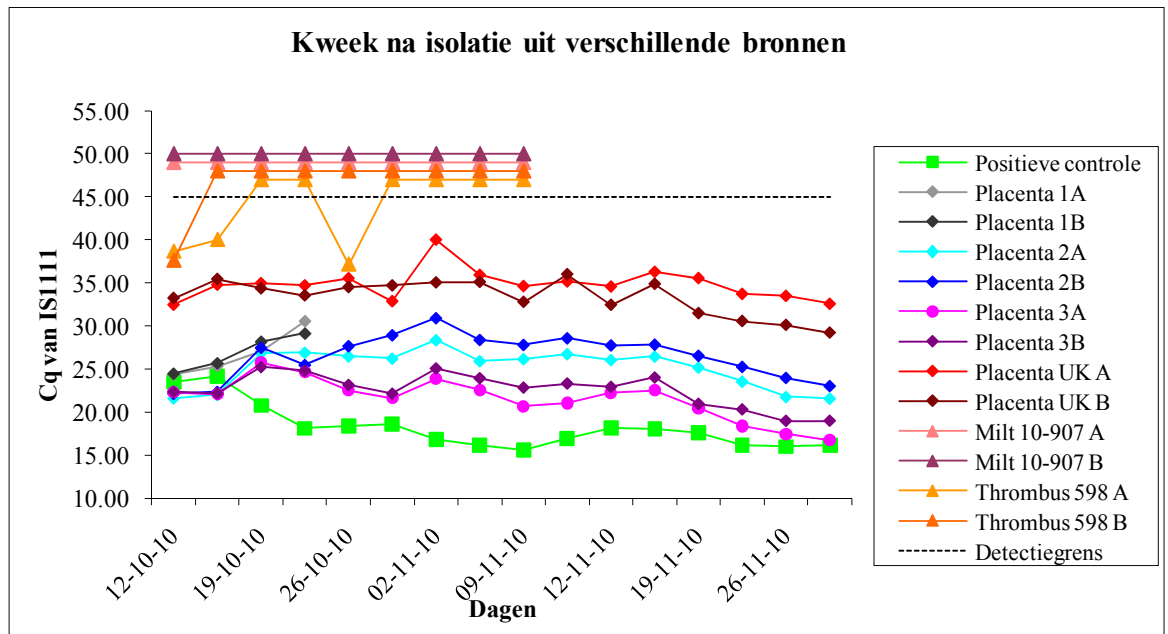
Fig. 4. Effect variatie overzetten medium op groei *C. burnetii*

Figuur 4A. Schematische weergave van de Cp-waarden (100x verdund) van de detectie van *C. burnetii* (target *IS1111*). Weergegeven is de onverdunde positieve controle (Nine Mile strain), waarbij A = medium na 3 dagen ververst; B = medium na 3 dagen voor de helft ververst; C = medium na 7 dagen ververst. De waarden boven de stippellijn (detectiegrens) zijn fictieve waarden (negatief voor *C. burnetii*).

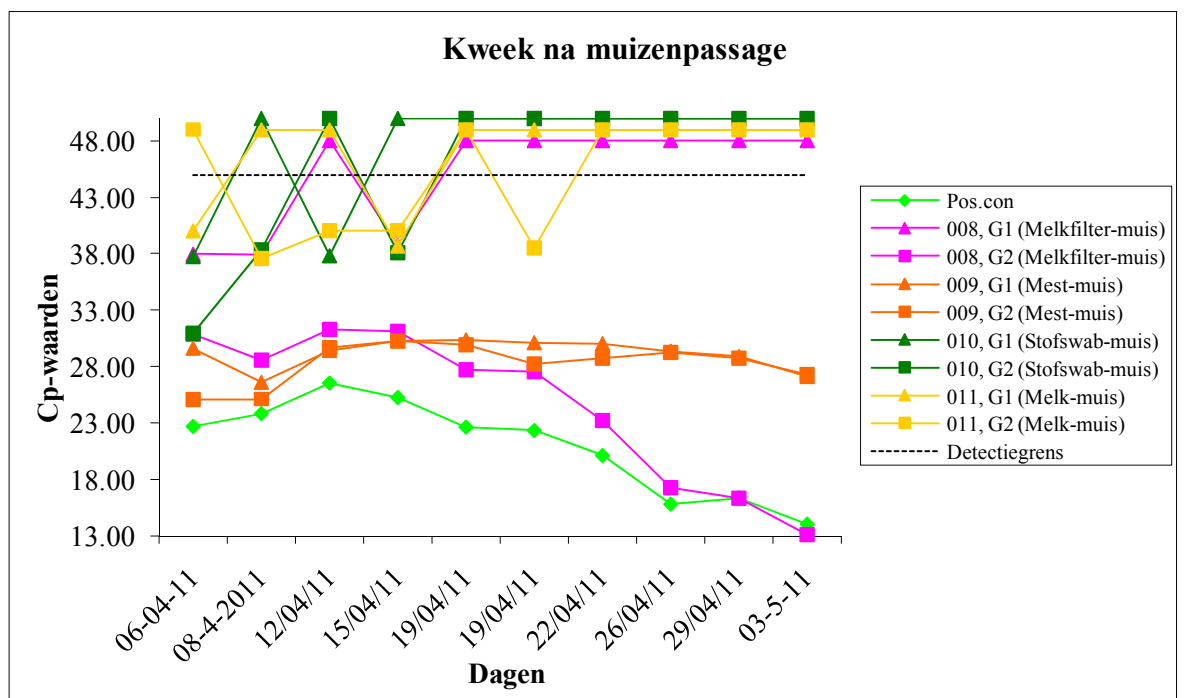


Figuur 4B. Schematische weergave van de Cp-waarden (100x verdund) van de detectie van *C. burnetii* (target *IS1111*). Weergegeven is placenta UK, waarbij A = medium na 3 dagen ververst; B = medium na 3 dagen voor de helft ververst; C = medium na 7 dagen ververst. Van placenta UK zijn ook onverdunde Cp-waarden weergegeven (met een stippellijn). De waarden boven de stippellijn (detectiegrens) zijn fictieve waarden (negatief voor *C. burnetii*).

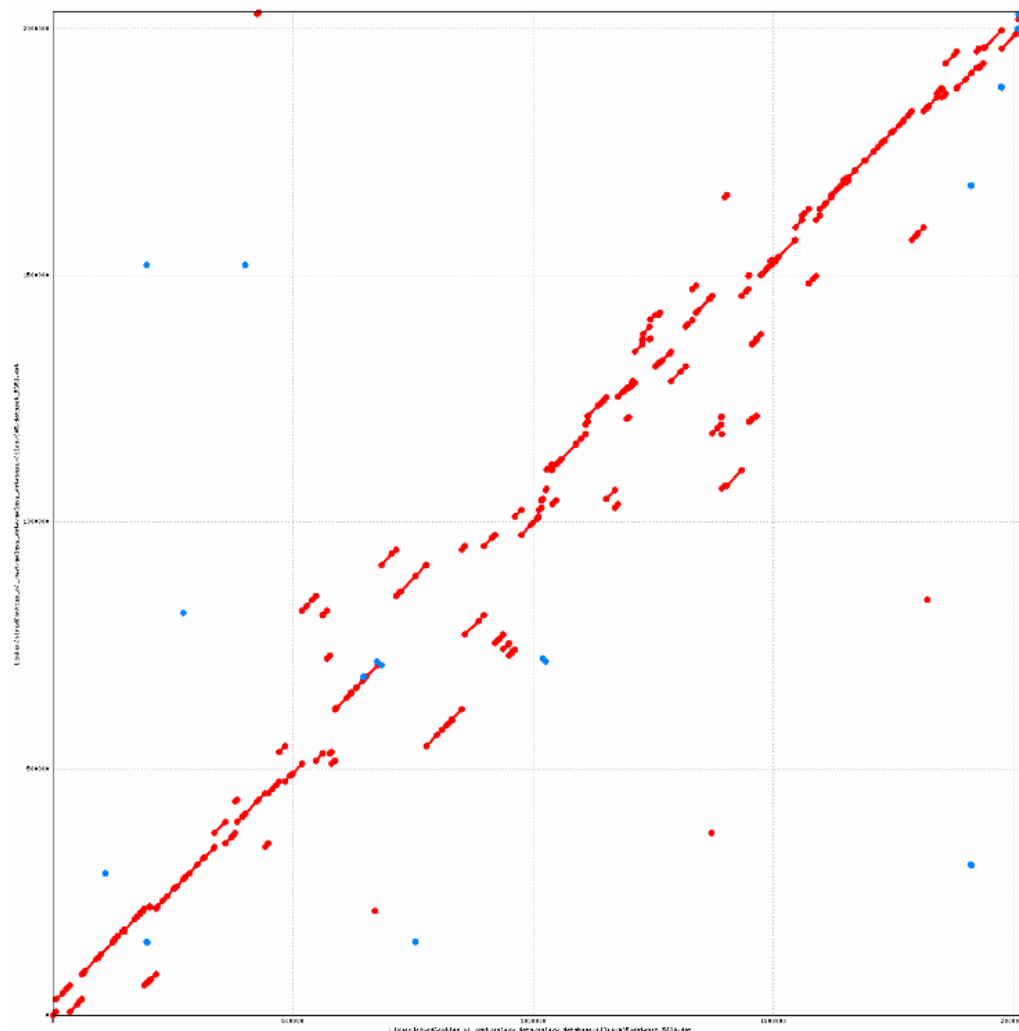
Fig. 5. Kweek verschillende isolaten voor sequencing



Figuur 5A. Cq-waarden van de detectie van *C. burnetii* (target *IS1111*). Weergegeven zijn de positieve controle (Nine Mile strain), placenta 1 (schaap), placenta 2 (geit 1040), placenta 3 (geit 1050), placenta UK, rattenmilt 10-907 en thrombus 598. Alle monster materialen zijn in duplo (A en B). De waarden boven de stippellijn (detectiegrens) zijn fictieve waarden (negatief voor *C. burnetii*).



Figuur 5B. Cp-waarden van de detectie van *C. burnetii* (target *IS1111*). Weergegeven zijn de kweken die vanuit muizenmilten opgestart zijn na muizenpassage van verschillende monsters.

Figuur 6. Genoom vergelijkingsplot.

Figuur 6. Een genoom vergelijkingsplot waarbij de in kweek zijnde referentie stam NM is vergeleken met het genoom van het CbNL01 geiten isolaat. Een schuine 45 graden lijn geeft complete homologie aan. Blauw of rode delen elders geven op die plaats sequentie homologie aan echter op een andere positie in het genoom (structurele variant). Beide genomen zijn nog een vroege draft en zeker niet compleet. Daartoe worden meerder NGS methoden ingezet ten einde dit zsm vast te stellen.

Tabel 1. *In silico* PCR/MLVA op de gereconstrueerde genomen.

Referentie NM tegen de in kweek NM. Tevens een drietal assemblage methoden van het geiten Cb genoom waarbij de laatste is verricht met alle tot nu toe bekende NGS data. Correlatie tussen MLVA typeringen zijn aangegeven.

Dit is een uitgave van:

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu**

Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven
www.rivm.nl