



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"

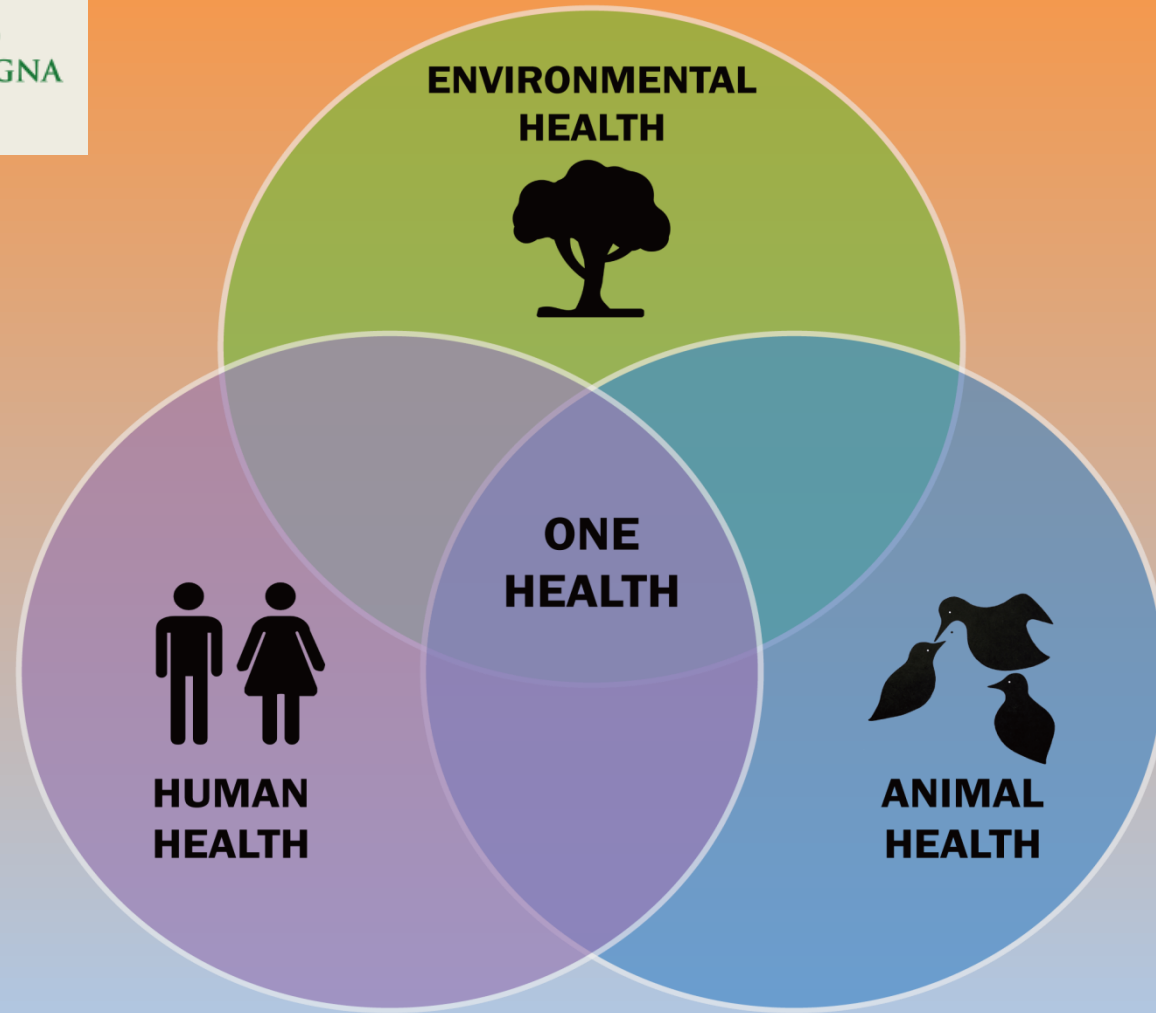
Identificazione e caratterizzazione degli *Streptococchi* isolati da mastite ovina

Sebastiana Tola

sebastiana.tola@izs-sardegna.it



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



La visione olistica *One Health*, si basa sul riconoscimento che la salute umana, la salute animale e la salute dell'ecosistema siano legate indissolubilmente.



Consiglio
dell'Unione europea

Bruxelles, 1° giugno 2023
(OR. en)

9581/23

Fascicolo interistituzionale:
2023/0125(NLE)

SAN 250
PHARM 90
VETER 61
ENV 509
PHYTOSAN 32
RECH 186

NOTA

Origine:	Segretariato generale del Consiglio
Destinatario:	Consiglio
Oggetto:	Raccomandazione del Consiglio sul potenziamento delle azioni dell'UE per combattere la resistenza antimicrobica con un approccio "One Health" (base giuridica proposta dalla Commissione: articolo 168, paragrafo 6, TFUE) <i>- Adozione</i>

adottare misure per migliorare la salute e il benessere degli animali destinati alla produzione di alimenti al fine di ridurre l'insorgenza e la diffusione di malattie infettive negli allevamenti e, di conseguenza, la necessità dell'uso di antimicrobici, in particolare:

- a. incoraggiando i veterinari e gli altri attori pertinenti a consigliare gli allevatori riguardo alle misure di prevenzione e controllo delle malattie infettive;
- b. incoraggiando l'adozione negli allevamenti di misure di biosicurezza e di prevenzione e controllo delle infezioni;

Punto 29

Le azioni in materia di ricerca e innovazione sostenute dai programmi Orizzonte 2020 e Orizzonte Europa sono essenziali per l'elaborazione, la valutazione e l'attuazione di misure contro la resistenza antimicrobica. È opportuno garantire un sostegno e una collaborazione costanti, che restano fondamentali per rafforzare l'impatto della ricerca e dell'innovazione ai fini dell'individuazione, della prevenzione e del trattamento delle infezioni causate da agenti patogeni resistenti.

Punto 30

I vaccini sono strumenti potenti ed efficaci in termini di costi per prevenire le malattie trasmissibili negli esseri umani e negli animali e possono quindi frenare la diffusione delle infezioni connesse alla resistenza antimicrobica e ridurre l'uso degli antimicrobici. È pertanto necessario promuovere il ricorso alla vaccinazione come pure lo sviluppo e la disponibilità dei vaccini e l'accesso agli stessi.

Vaccini stabulogeni e autovaccini

- Ministero della Sanità



Decreto 17 marzo 1994 , n. 287

Regolamento recante norme sulla produzione, l'impiego ed il controllo dei medicinali veterinari immunologici inattivati, aventi caratteristiche di vaccini stabulogeni ed autovaccini.

Gran parte dei vaccini stabulogeni prodotti dall'IZS della Sardegna sono composti da colture batteriche, inattivate con **formalina** (con **fenolo** per l'agalassia contagiosa) e adiuvata con **idrossido di alluminio**

Vaccino Stabulogeno

Il **vaccino stabulogeno** è un medicinale ad azione immunizzante preparato con microrganismi patogeni e/o antigeni isolati da animali colpiti dalla forma infettiva dominante in quel determinato allevamento.

Sono impiegati per vaccinare gli animali di tale allevamento e/o animali di allevamenti dello stesso territorio, qualora ritenuto opportuno per documentati motivi epidemiologici

Differenza tra vaccino e stabulogeno

- Vaccino

Medicinale veterinario ad azione immunologica: somministrato agli animali allo scopo di indurre una immunità attiva o passiva

Regolamento UE 2019/6

Art.5: *Nessun medicinale veterinario può essere messo in commercio senza aver ottenuto l'AIC dal Ministero della Salute*



Prevenzione

- Stabulogeno

D.M. 287 del 17/3/1994

Vantaggi:

- ❖ Limitare la diffusione della malattia nell'allevamento

Solo gli articoli 94, 105, 108, 117, 120, 123 e 134 del regolamento (UE) 2019/6 si applicano ai vaccini stabulogeni veterinari.

Dal 1994 la ricerca ha fatto passi da gigante

Vaccini

- Applicazione di tecniche genomiche, proteomiche, di DNA ricombinante, mRNA
- Un notevole aumento dei vaccini registrati (lista AIC)

Stabulogeni

- Specificità ceppi/antigeni
- Economicità



Nota del Ministero della Salute del 2015

DGSAF 0015165-P-08/06/2015

- Priorità ai presidi immunizzanti regolarmente autorizzati con procedure nazionali o comunitarie e disponibili per le varie esigenze del territorio.
- La produzione di stabulogeni, in presenza di vaccini commerciali, può essere giustificata dall' unicità degli isolati ottenuta mediante la loro tipizzazione

In presenza di vaccini registrati occorre tipizzare gli isolati utilizzati per la produzione degli stabulogeni

Patrimonio zootecnico della Sardegna

- Pecore di razza *sarda**

3.019.108

- Capre*

281.569

- Bovini da latte*

48.944

In Sardegna viene raccolto il **68,92%** del latte ovino ed il **57,30%** del latte caprino prodotto in Italia.

*Sardegna Agricoltura, 2019.

<https://www.sardegnaagricoltura.it/index.php?xsl=443&s=413001&v=2&c=6039&vd=1>

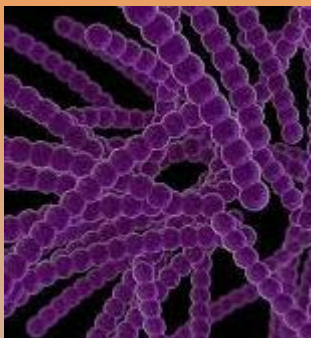




ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



Negli ovini, diverse sono le specie batteriche responsabili delle patologie che colpiscono la mammella; fra queste un ruolo importante è svolto dagli **Stafilococchi** e **Streptococchi** (Bergonier et al., 2003; Contreras et al., 2007, Marogna et al., 2010, 2012; Dore et al., 2016).



Streptococchi: cocchi Gram+

L'aumento delle mastite infettive correlate agli streptococchi è senz'altro da mettere in correlazione con la meccanizzazione della mungitura e con il graduale passaggio da un allevamento tradizionale di tipo estensivo verso forme con stabulazione più o meno intensiva.



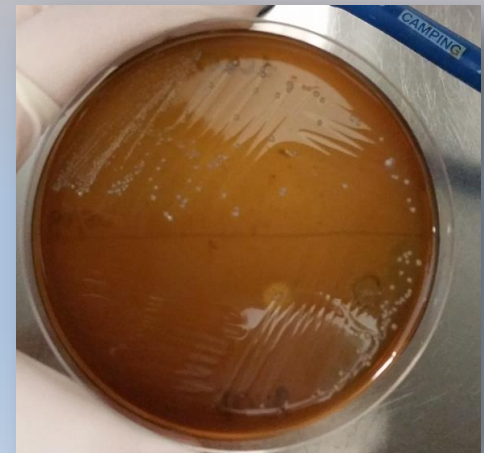
In commercio non esistono vaccini contro le mastopatie dei piccoli ruminanti da streptococchi. Nel 2015, l'IZS della Sardegna ha inoltrato al Ministero della Salute (**Richiesta N° 2514 del 06-03-2015**) il protocollo per la relativa autorizzazione alla fabbricazione, controllo e impiego di un vaccino stabulogeno per la mastite ovina e caprina da ***Streptococcus spp.***; ai sensi del D.M. n° 287 del 17 marzo 1994. **L'autorizzazione è stata concessa il 28-05-2015 con prot. n° 14413.**



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"

In questa ricerca sono stati analizzati **195** ceppi di ***Streptococcus spp.*** isolati da mastite ovina e caprina in varie province della Sardegna nel periodo **2011-2017**. I ceppi sono stati inviati al laboratorio Vaccini dalla sede centrale e territoriali dell'IZS Sardegna.

Gli streptococchi sono stati identificati a livello di genere mediante la colorazione di Gram e i tests CAMP e bile-esculina





ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"

Identificare gli streptococchi

Comparare l'accuratezza di tre differenti metodi di identificazione degli streptococchi:
API[®] 20 Strep, PCR-RFLP e MALDI-TOF MS



Identificazione fenotipica mediante test biochimici

L'identificazione a livello di specie è stata effettuata inizialmente mediante l'utilizzo dell' **API® 20 Strep** (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) seguendo le istruzioni del produttore e la decodifica APIweb <http://www.apiweb.biomerieux.com>. I risultati sono stati espressi come percentuale di identificazione (%ID) che rappresenta la vicinanza relativa del profilo ottenuto per il taxon a quelli di tutti gli altri taxa, per la stessa specie, nel database.

The API system

The most used API system...



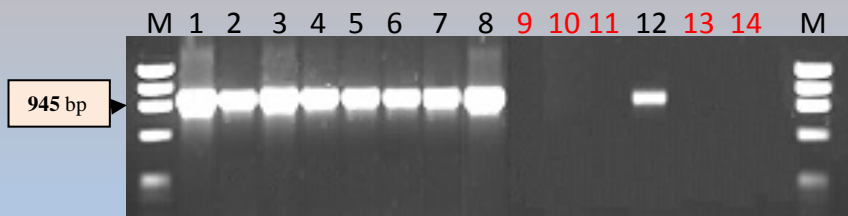
API Strep
→ Identification of
Streptococcus species



Identificazione genotipica

Le sequenze geniche della **gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (*gap*)** dello *S. uberis* (NCBI, nucleotide ID WP_015911929.1), dello *S. agalactiae* (NCBI, nucleotide ID AKI95248) e dello *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (NCBI, nucleotide ID BAN93906.1) sono state allineate usando l'algoritmo di allineamento a coppie EMBOSS (<http://www.ebi.ac.uk/tools/emboss>).

Nell'ambito delle tre specie di *Streptococcus* analizzate, abbiamo selezionato i primers **Strept-gap-F** (5'-ACTCAAGTGTACGAACAAGT-3') e **Strept-gap-R** (5'-GTCTTGCAATCCGTCGTAT-3')



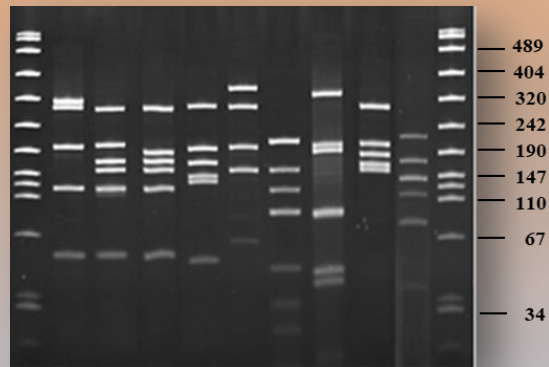
Elettroforesi su gel di agarosio degli ampliconi del gene *gap* di quattordici ceppi di riferimento (RS). Linea 1, *Streptococcus* (*S.*) *uberis* ATCC 700407; linea 2, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* ATCC 43078; linea 3, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* DSM 23147; linea 4, *S. agalactiae* ATCC 13813; linea 5, *S. salivarius* subsp. *salivarius* ATCC 13419; linea 6, *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ATCC 49475; linea 7, *S. suis* ATCC 43765; linea 8, *S. equi* subsp. *zooepidermicus* NCTC 6180; **linea 9, *Enterococcus* (*E.*) *faecium* ATCC 35667; linea 10, *E. durans* DSM 20633; linea 11, *E. faecalis* ATCC 29212; linea 12, *Lactococcus* (*L.*) *lactis* subsp. *lactis* ATCC 13675; linea 13, *Staphylococcus* (*S.*) *aureus* ATCC 25923; linea 14, *S. epidermidis* ATCC 35984.** M, marker IX (Roche).



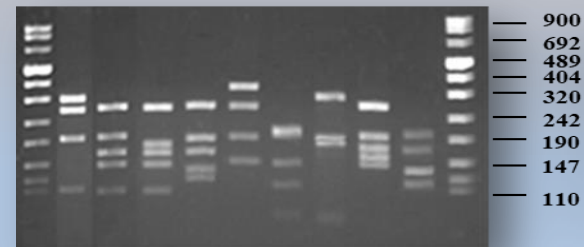
Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) degli amplificati ottenuti

1) Sequenziamento degli amplificati

2) Analisi *in silico* mediante
<http://www.restrictionmapper.org>
per individuare l'enzima di
restrizione per l'analisi RFLP: ***AluI***
(**FastDigest**, ThermoFisher: **15 min.**
a 37°C)



I frammenti sono stati separati
mediante PAGE al 12%.



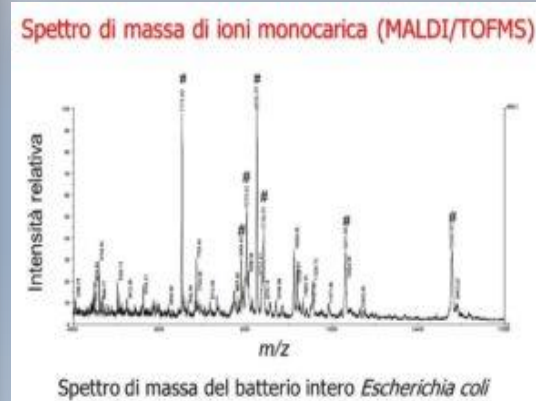
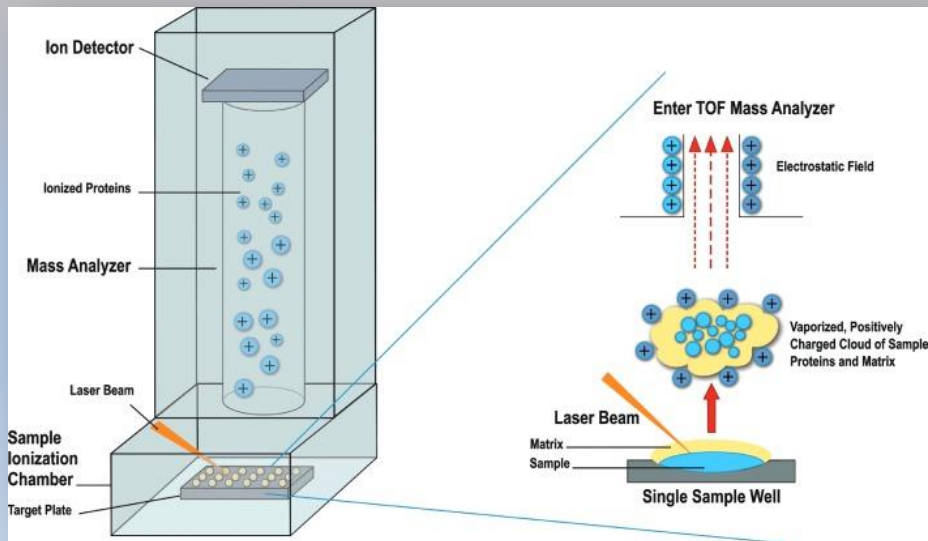
I frammenti sono stati separati
mediante agarosio high
resolution al 3%.

Il metodo PCR-RFLP è stato esteso a tutti i 195 isolati, quelli con profilo diverso rispetto ai ceppi di Referenza sono stati sequenziati



Identificazione fenotipica: MALDI-TOF MS

La spettrometria di massa con tecnologia MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight) è stata recentemente introdotta nei laboratori di microbiologia come metodo rapido (poche ore), accurato ed economico per l'identificazione di batteri, micobatteri, lieviti e funghi. Questa tecnologia costituisce un'alternativa valida e interessante ai metodi di microbiologia classica e di biologia molecolare ed è applicabile in differenti aree della diagnostica clinica e della ricerca.





Risultati

Dei **171** isolati,
il **95.9%** è stato
confermato con il
MALDI-TOF contro il
91.2% ottenuto con
API

PCR-RFLP	MALDI-TOF MS	API Strep identification
<i>S. uberis</i> (n=124)	<i>S. uberis</i> (n=124)	<i>S. uberis</i> (n=122) <i>S. suis</i> (n=1) (ID 86.3%) <i>S. dysgalactiae</i> (n=1) (ID 91.4%)
<i>S. dysgalactiae</i> (n=18)	<i>S. dysgalactiae</i> (n=15) <i>S. ovis</i> (n=2) <i>L. lactis</i> (n=1) (score 2.331)	<i>S. dysgalactiae</i> (n=12) <i>S. agalactiae</i> (n=2) <i>S. oralis</i> (n=1) (ID 59.3%) <i>S. uberis</i> (n=2) <i>S. uberis</i> (n=1) (ID 92.2%)
<i>S. suis</i> (n=14)	<i>S. suis</i> (n=10) <i>S. suis</i> (score 1.735) <i>S. spp</i> (n=3)	<i>S. suis</i> (n=10) <i>S. uberis</i> (n=1) (ID 85.5%) <i>S. uberis</i> (n=3)
<i>S. gallolyticus</i> (n=10)	<i>S. gallolyticus</i> (n=9) <i>S. spp</i> (n=1)	<i>S. gallolyticus</i> (n=8) <i>S. uberis</i> (n=1) (ID 91.5%) <i>S. bovis</i> (n=1) (ID 93.5%)
<i>S. agalactiae</i> (n=3)	<i>S. agalactiae</i> (n=3)	<i>S. agalactiae</i> (n=3)
<i>S. equi zooepidermicus</i> (n=2)	<i>S. equi zooepidermicus</i> (n=2)	<i>S. equi zooepidermicus</i> <i>S. agalactiae</i> (ID 91.5%)
Total (n=171)		

MALDI-TOF MS score:

<1,7 l'identificazione non è affidabile

Tra 1,7 e 2,0 l'identificazione è affidabile a livello di genere

Tra 2.0 e 2.3 l'identificazione è affidabile a livello di genere e probabile a livello di specie

>2,3 l'identificazione di specie è altamente probabile.



Risultati

PCR-RFLP and sequencing analysis	MALDI-TOF MS	API Strep identification
<i>S. agalactiae</i> (n=1) (identity 87%)	<i>S. pluranimalium</i> (score 2.059)	<i>S. uberis</i> (ID 92.8%)
<i>S. equinus</i> (n=8) (identity 99%)	<i>S. lutetiensis</i> (score 2.064) <i>S. lutetiensis</i> (score 1.862) <i>E. faecalis</i> (score 2.513) <i>S. lutetiensis</i> (score 2.157) <i>S. lutetiensis</i> (score 2.211) <i>E. faecalis</i> (score 2.376) <i>S. utetiensis</i> (score 1.785) <i>S. utetiensis</i> (score 2.069)	<i>S. equinus</i> (ID 92.3%) <i>S. equinus</i> (ID 91.2%) <i>S. equinus</i> (ID 93.4%) <i>S. uberis</i> (ID 58.1%) <i>S. uberis</i> (ID 55.5%) <i>E. faecalis</i> (ID 71.8%) <i>S. equinus</i> (ID 90.6%) <i>S. equinus</i> (ID 91.5%)
<i>S. pneumoniae</i> (n=1) (identity 100%) <i>S. pneumoniae</i> (n=1) (identity 97%) <i>S. pneumoniae</i> (n=2) (identity 94%)	<i>S. mitis</i> (score 2.171) <i>S. oralis</i> (score 2.287) <i>S. pneumoniae</i> (score 2.326) <i>S. mitis/oralis</i> (score 2.331)	<i>S. dysgalactiae</i> (ID 56.5%) <i>S. dysgalactiae</i> (ID 58.2%) <i>S. dysgalactiae</i> (ID 58.4%) <i>S. dysgalactiae</i> (ID 53.7%)
<i>S. pyogenes</i> (n=3) (identity 96%)	<i>S. canis</i> (score 2.637) <i>S. canis</i> (score 2.581) <i>S. canis</i> (score 2.518)	<i>S. mitis</i> (ID 30.4%) <i>S. β haemolyticus group G</i> (ID 92.3%) <i>S. β haemolyticus group G</i> (ID 92.6%)
<i>S. oralis</i> (n=2) (identity 97%)	<i>S. oralis</i> (score 2.427) <i>S. sanguinis</i> (score 2.091)	<i>S. dysgalactiae</i> (ID 94.3%) <i>S. uberis</i> (ID 91.8%)
<i>S. halotolerans</i> (n=4) (identity 86%)	<i>S. pluranimalium</i> (score 2.063) <i>S. pluranimalium</i> (score 1.913) <i>S. pluranimalium</i> (score 2.033) <i>S. mitis</i> (score 2.201)	<i>S. dysgalactiae</i> (ID 45.3%) <i>S. uberis</i> (ID 35.8%) <i>S. uberis</i> (ID 36.2%) <i>S. uberis</i> (ID 43.6%)
<i>S. sanguinis</i> (n=2) (identity 87%)	<i>S. ovis</i> (score 2.005) <i>S. ovis</i> (score 2.125)	<i>S. bovis</i> (ID 32.6%) <i>S. uberis</i> (ID 40.3%)
Total (n=24)		

MALDI-TOF MS score:

<1,7 l'identificazione non è affidabile

Tra 1,7 e 2,0 l'identificazione è affidabile a livello di genere

Tra 2.0 e 2.3 l'identificazione è affidabile a livello di genere e probabile a livello di specie

>2,3 l'identificazione di specie è altamente probabile.



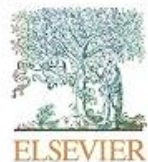
Conclusioni

Questa ricerca conferma e rafforza la necessità di standardizzare i metodi genotipici e fenotipici utilizzati per l'identificazione degli streptococchi isolati da latte ovino e caprino.

L'analisi genotipica basata sul gene *gap* potrebbe essere un utile strumento diagnostico per la corretta identificazione degli streptococchi. Tuttavia, l'esecuzione del metodo ha ancora necessità di molto tempo e richiede il confronto con i profili RFLP di altri ceppi di riferimento.

Nel nostro studio, l'accuratezza di MS MALDI-TOF e API Strep nell'identificare gli streptococchi a livello di specie non è stata perfetta; tuttavia riteniamo che MALDI-TOF MS abbia il vantaggio in termini di rapidità, affidabilità e basso costo.

NOTA: NECESSITA' di CONFRONTARE PCR-RFLP/SEQUENZIAMENTO/WGS con MALDI-TOF



Comparison of PCR-RFLP, API® 20 Strep and MALDI-TOF MS for identification of *Streptococcus spp.* collected from sheep and goat milk samples

Nives Maria Rosa^a, Fabrizio Agnoletti^b, Stefano Lollai^a, Sebastiana Tola^{a,*}

^a Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, 07100 Sassari, Italy

^b Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, 31100 Treviso, Italy

Acknowledgements

This research was supported by the Italian Health Ministry (Ricerca Corrente IZS SA 04/15). We are grateful to Elisa Azara, Antonella Barbato, Angelo Fiori, Rosaura Porcu Alessandra Spazziani, Maria Antonia Piredda and Vittoria D'Ascenzo for their technical assistance.

Stabulogeni prodotti dall'IZS Sardegna

 OVINI E CAPRINI 

- ➔ Aborto salmonellare
- ➔ Agalassia contagiosa
- ➔ Enterotossiemia
- ➔ Mastite stafilococcica/ Dermatite pustolosa mammaria
- ➔ Mastite streptococcica
- ➔ Pasteurellosi

 BOVINI 

 SUINI 

 CANI 

 CONIGLI 



Valutare la suscettibilità antimicrobica degli isolati di *S. uberis*

Genotipizzare gli isolati di *S. uberis* mediante MLSTe PFGE

124 ceppi di ***S. uberis***
(94% degli isolati)

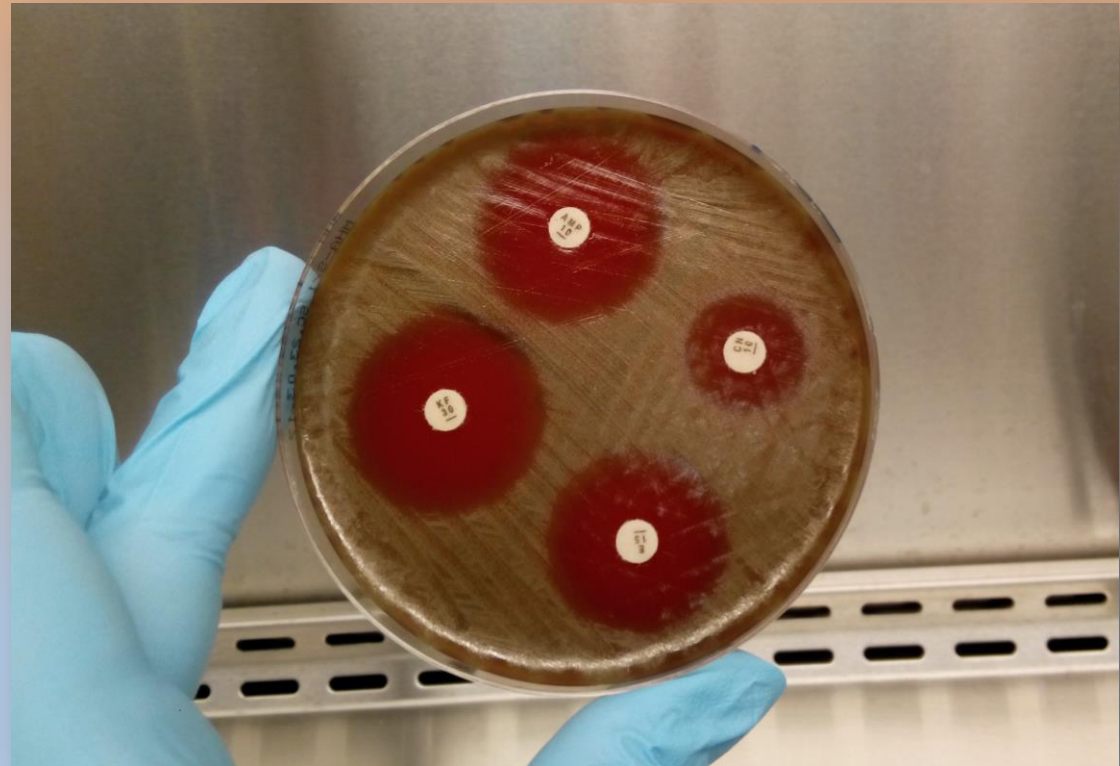


ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PIRELLI"

Susceptibilità antimicrobica

Metodo Kirby - Bauer
diffusione in agar.
In base al diametro S, I e R

EUCAST breakpoint (2023)
From **old** "intermediate" to the
new "**Susceptible, increased**
exposure"



Muller Hinton agar + 5% sangue, a 37°C
in termostato con 5% di CO₂



Suscettibilità antimicrobica

14 agenti antimicrobici

(CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals*, 3th Ed. 2015)

Antibiotici più usati nella
terapia delle mastiti

Ampicillina	Tetraciclina
Cefalotina	Eritromicina
Oxacillina	Streptomicina
Gentamicina	Amoxicillina+Ac. Clavulanico
Kanamicina	Sulfamethoxazolo+ Trimethoprim
Novobiocina	Ceftiofur
Penicillina	Pirlimycin

Indicatori di resistenza
alla meticillina

Utilizzati in medicina umana e
veterinaria (mastiti bovine)



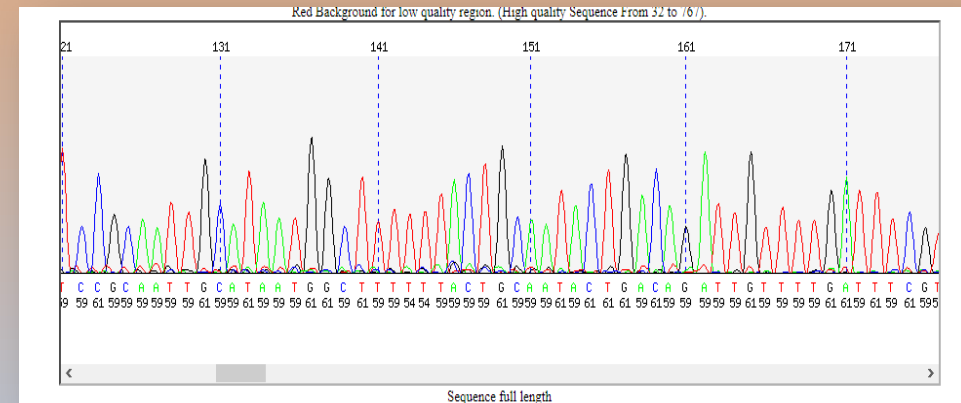
Suscettibilità antimicrobica: Il 97% degli isolati è resistente ad almeno un antibiotico

Antimicrobici	%
Ampicillina	7
Penicillina	5
Oxacillina	0
Amoxicillina+Ac. Clavulanico	0
Gentamicina	82
Kanamicina	93
Streptomycin	99

Antimicrobici	%
Tetraciclina	44
Eritromicina	16
Sulfamethoxazolo+ Trimethoprim	8
Novobiocina	69
Cefalotina	1
Ceftiofur	7
Pirlimycin	7

Genotyping mediante MLST e PFGE

La genotipizzazione è uno strumento importante negli studi epidemiologici in quanto contribuisce alla comprensione della disseminazione dei patogeni e fornisce un mezzo per correlare i ceppi. La tipizzazione a sequenza multipla (**MLST**) fornisce le informazioni più affidabili sul clustering filogenetico e sull'epidemiologia globale a lungo termine mentre la tipizzazione con elettroforesi su gel a campo pulsato (**PFGE**) è il metodo più utilizzato per affrontare problemi epidemiologici a breve termine.



MLST

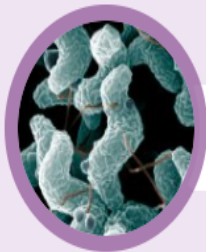
Multilocus Sequence Typing

La tecnica **MLST** permette di tipizzare gli isolati di una specie batterica attraverso l'analisi, mediante sequenziamento, delle variazioni alleliche in porzioni interne di geni *housekeeping*. Per ogni locus, ad ogni nuova sequenza verificata e registrata nel *data base*, è attribuito un numero allelico le cui diverse combinazioni individuano un diverso profilo allelico, detto **Sequence Type** (ST)

- ✓ Amplificazione dei geni
- ✓ Sequenziamento (For. e Rev.)
- ✓ Analisi delle sequenze

Organisms

Most popular



Campylobacter jejuni/coli



Haemophilus influenzae



Neisseria spp.



Staphylococcus aureus

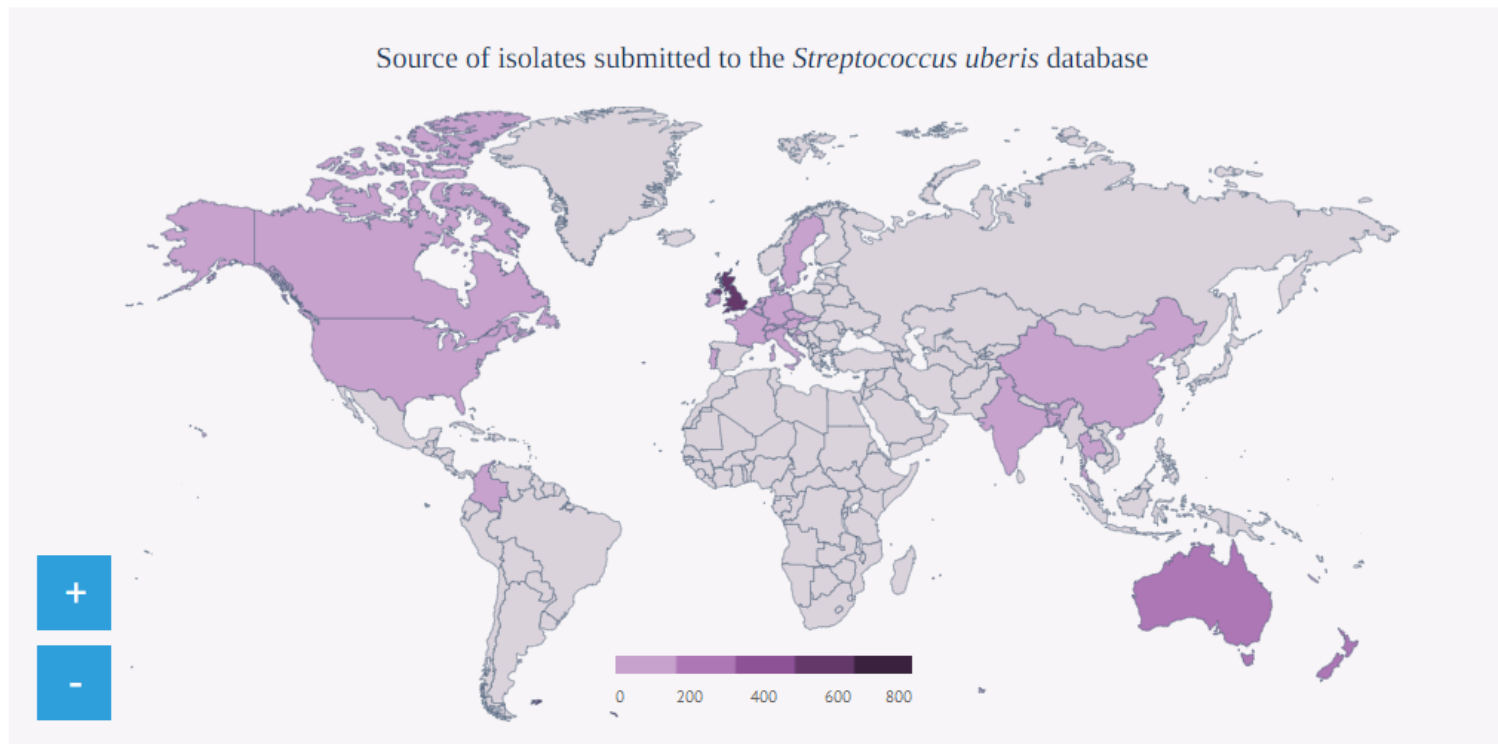


Streptococcus agalactiae



Streptococcus pneumoniae

Streptococcus uberis



↑ SUBMIT

This MLST scheme was developed by James Leigh, Tracey Coffey and Gillian Pullinger, Institute for Animal Health, Compton, UK. It is described in [Coffey *et al.* 2006 *Appl Environ Microbiol* 72:1420-8](#). The project was funded by BBSRC grant number 201/S15848 - Molecular Epidemiology of *Streptococcus uberis*.

Database curated by [Adam Blanchard](#).

- [Primers](#)

The preferred citation for this website is:

[Jolley *et al.* Wellcome Open Res 2018, 3:124](#) [version 1; referees: 2 approved]

Typing

The typing database contains nomenclature - allele definitions that provide an identifier for every unique allele sequence, and MLST profiles that index each unique combination of alleles with a sequence type (ST).

Allele sequences: 142,240

Last updated: 2023-11-20



Isolate collection

The isolate database consists of isolate records containing provenance and phenotype information linked to molecular typing information. These records may also include genome assemblies.

Isolates: 2,017

Last updated: 2023-11-20



Genome collection

A subset of records within the isolate database may contain genomes assemblies. You can access these from the isolate database by filtering on sequence bin size in a query.

Genomes: 506

Last updated: 2023-11-20



MLST of *Streptococcus uberis*

Genes

The *Streptococcus uberis* MLST scheme uses fragments of the following seven house-keeping genes:

Glucose kinase (*gki*)

Transketolase (*recP*)

D-ala-D-ala ligase (*ddl*)

Thymidine kinase (*tdk*)

Carbamate kinase (*arcC*)

Triosephosphate isomerase (*tpi*)

Acetyl CoA acetyl-transferase (*yqiL*)

Please note that all protocols here refer to fast-ramping thermal cyclers (such as ABI GeneAmp PCR 2700 or DNA engine) using 48/96 microtitre plates. Any other plates/thermal cycler combinations will require you to optimize your conditions.

Purification of chromosomal DNA from *S. uberis*

MLST

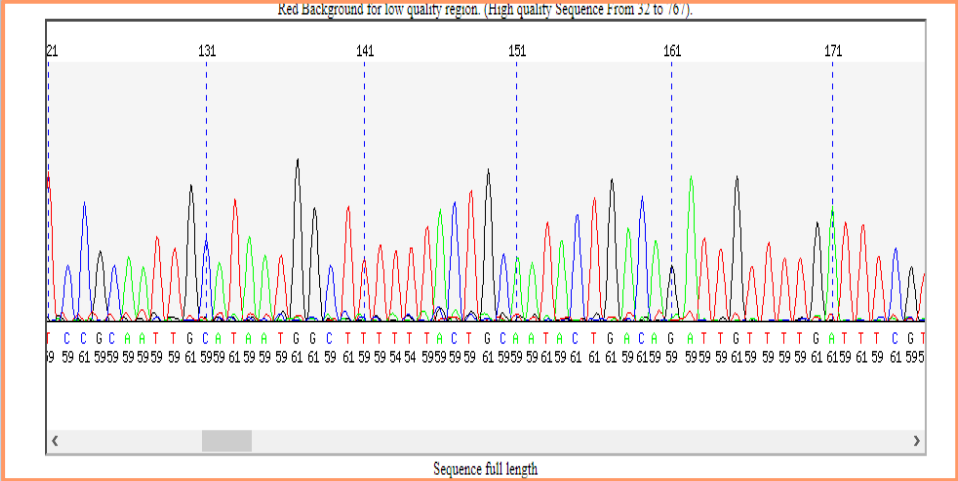
Amplificati sequenziati con metodo Sanger



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"

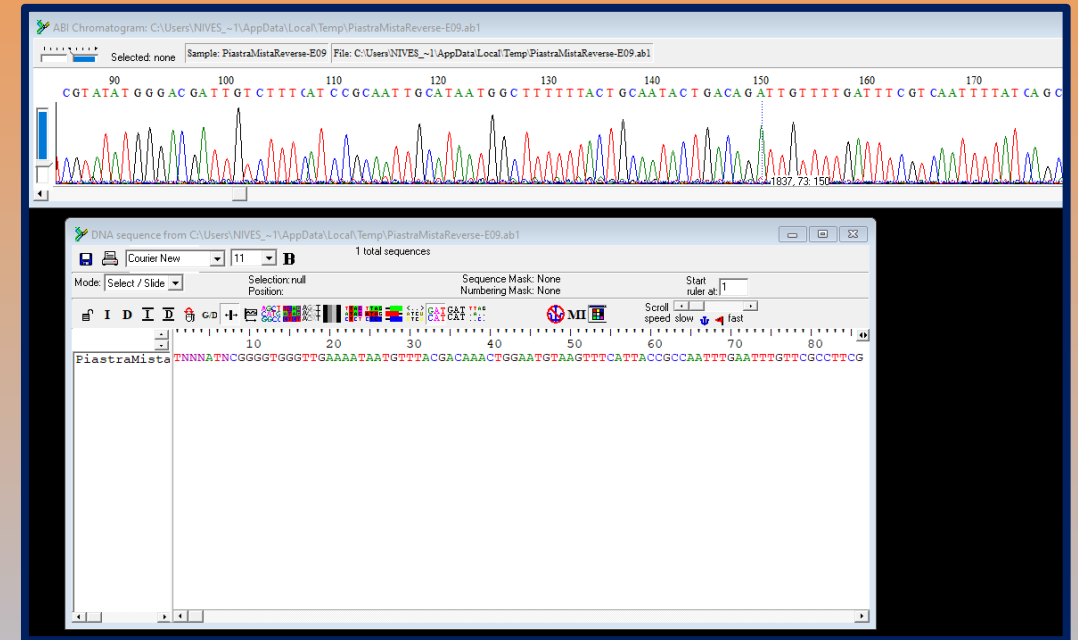




ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"

MLST

Le sequenze
forward e reverse
per ciascun *locus*
sono state
analizzate con
BioEdit e BLAST



NIH U.S. National Library of Medicine NCBI National Center for Biotechnology Information Sign In to NCBI

BLAST®

Home Recent Results Saved Strategies Help

COVID-19 is an emerging, rapidly evolving situation.
Get the latest public health information from CDC: <https://www.cdc.gov/covid19/>.
Get the latest research from NIH: <https://www.nih.gov/coronavirus>.
Find NCBI SARS-CoV-2 literature, sequence, and clinical content: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sars-cov2/>.

Basic Local Alignment Search Tool

BLAST finds regions of similarity between biological sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance. [Learn more](#)

Using new BLAST databases: [Webinar](#) on June 17, 2020
In this webinar, the NCBI BLAST team will show you how to be more effective using new BLAST databases to help identify organisms and explore their diversity.
Tue, 09 June 2020 12:00:00 EST [More BLAST news...](#)

Web BLAST

Nucleotide BLAST
nucleotide → nucleotide

blastx
translated nucleotide → protein

tblastn
protein → translated nucleotide

Protein BLAST
protein → protein



Sequence query

Please paste in your sequence to query against the database. Query sequences will be checked first for an exact match against the chosen (or all) loci - they do not need to be trimmed. The nearest partial matches will be identified if an exact match is not found. You can query using either DNA or peptide sequences. [i](#)

— Please select locus/scheme — — Order results by —

All loci ▼

locus ▼

— Enter query sequence (single or multiple contigs up to whole genome in size) — — Alternatively upload FASTA file — — or enter Genbank accession —

Select FASTA file: [i](#)

Click to select or drag and drop...

Action

RESET

SUBMIT



Search by locus combinations

Schemes

Please select the scheme you would like to query:

MLST ▼ [Select](#)

Please enter your allelic profile below. Blank loci will be ignored.

Autofill profile

arcC	ddl	gki	recP	tdk	tpi	yqiL

ST: [Autofill](#)

Options

Display/sort options

Action

Search: ▼

Order by: ▼ ▼

Display: ▼ records per page [i](#)

[RESET](#)

[SEARCH](#)



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"

MLST

Inserito nel Data Base MLST S. uberis

PubMLST Database home Contents

Logged in: Nives Rosa (nrosa) Log out Change password Help Toggle

Manage submissions

Submit new data

Data submitted here will go in to a queue for handling by a curator or by an automated script. You will be able to track the status of any submission.

Submission type:

- alleles
- MLST profiles
- vMLST profiles
- isolates (without assembly files) [Link to isolate database](#)
- genomes (isolate records with assembly files) [Link to isolate database](#)

Recently closed submissions

You have submitted the following submissions which are now closed - they can be removed once you have recorded the results. Alternatively they will be removed automatically after 30 days.

Submission id	Submitted	Updated	Type	Details	Outcome	Remove
BIGSdb_20200520111501_174271_75568	2020-05-20	2020-05-22	alleles	4 arcC sequences	😊	✕
BIGSdb_20200522113305_074218_73538	2020-05-22	2020-05-22	alleles	1 arcC sequence	😊	✕
BIGSdb_20200525121833_157339_72125	2020-05-25	2020-05-26	alleles	4 ddl sequences	😊	✕
BIGSdb_20200526105918_002100_11506	2020-05-26	2020-05-26	alleles	5 gkl sequences	😊	✕
BIGSdb_20200528094501_094843_99140	2020-05-28	2020-05-28	alleles	1 recP sequence	😊	✕
BIGSdb_20200528110747_119252_19280	2020-05-28	2020-05-28	alleles	2 tpi sequences	😊	✕
BIGSdb_20200528125525_050182_43802	2020-05-28	2020-06-03	alleles	7 tdk sequences	😊	✕
BIGSdb_20200603112517_094531_28435	2020-06-03	2020-06-03	alleles	6 yqIL sequences	😊	✕
BIGSdb_20200603153732_057519_89943	2020-06-03	2020-06-03	alleles	1 tdk sequence	😊	✕
BIGSdb_20200603160953_063959_98049	2020-06-03	2020-06-03	alleles	1 yqIL sequence	😊	✕
BIGSdb_20200604114132_065239_46338	2020-06-04	2020-06-04	profiles	35 MLST profiles	😊	✕
BIGSdb_20200604182333_014793_57258	2020-06-04	2020-06-05	profiles	4 MLST profiles	😊	✕

➤ 32 nuovi alleli

➤ 73 nuove combinazioni alleliche (ST)



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"

MLST

Submission: BIG Sdb_20200604160707_154493_11181

Summary

type: isolates
submitter: Nives Rosa Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna
timestamp: 2020-06-11
status: closed
outcome: accepted - data uploaded
curator: Adam Blanchard, University of Nottingham

Isolates

isolate	country	region	year	source	site	sample	arcC	ddl	gki	recP	tdk	tpi	yqiL	ST (MLST)
4	Italy	Sardinia	2011	sheep	udder	milk	81	68	4	36	46	43	15	1231
7	Italy	Sardinia	2013	sheep	udder	milk	3	65	3	4	5	2	3	1232
9	Italy	Sardinia	2013	sheep	udder	milk	10	1	5	1	46	4	75	1233
14	Italy	Sardinia	2014	sheep	udder	milk	84	10	66	2	111	45	76	1234
15	Italy	Sardinia	2014	sheep	udder	milk	10	67	4	2	46	33	10	1235
17	Italy	Sardinia	2014	sheep	udder	milk	4	4	3	1	44	4	77	1236
22	Italy	Sardinia	2015	sheep	udder	milk	10	1	5	2	45	43	30	1237
23	Italy	Sardinia	2015	sheep	udder	milk	7	1	67	2	73	4	5	1238
31	Italy	Sardinia	2015	sheep	udder	milk	10	67	5	2	45	4	10	1239
32	Italy	Sardinia	2015	sheep	udder	milk	10	68	5	2	45	43	30	1240
37	Italy	Sardinia	2015	sheep	udder	milk	40	1	68	2	17	4	78	1241
40	Italy	Sardinia	2015	sheep	udder	milk	80	1	4	1	13	1	3	1242
44	Italy	Sardinia	2015	sheep	udder	milk	5	1	70	1	13	1	10	1243
45	Italy	Sardinia	2015	sheep	udder	milk	3	2	3	2	110	2	3	1244
48	Italy	Sardinia	2016	sheep	udder	milk	21	4	63	2	10	43	15	1245
61	Italy	Sardinia	2016	sheep	udder	milk	81	10	3	2	112	7	38	1246
62	Italy	Sardinia	2016	sheep	udder	milk	42	10	70	2	111	4	27	1247
66	Italy	Sardinia	2016	sheep	udder	milk	21	2	63	2	6	43	15	1248
68	Italy	Sardinia	2016	sheep	udder	milk	4	1	16	1	13	4	81	1249
70	Italy	Sardinia	2016	sheep	udder	milk	82	1	5	2	45	4	38	1250
72	Italy	Sardinia	2016	sheep	udder	milk	42	67	4	2	46	33	30	1251
75	Italy	Sardinia	2016	sheep	udder	milk	3	1	5	2	112	7	5	1252
77	Italy	Sardinia	2016	sheep	udder	milk	10	67	4	1	46	4	33	1253
78	Italy	Sardinia	2016	sheep	udder	milk	42	10	70	2	29	4	27	1254
80	Italy	Sardinia	2016	sheep	udder	milk	4	67	32	2	46	4	38	1255
83	Italy	Sardinia	2016	sheep	udder	milk	81	10	3	2	115	4	15	1256
84	Italy	Sardinia	2016	sheep	udder	milk	3	1	5	2	112	7	62	1257
95	Italy	Sardinia	2016	sheep	udder	milk	83	10	70	2	111	4	27	1258
96	Italy	Sardinia	2016	sheep	udder	milk	10	68	6	2	45	43	30	1259
97	Italy	Sardinia	2016	sheep	udder	milk	4	68	69	2	116	43	30	1260
100	Italy	Sardinia	2017	sheep	udder	milk	0	1	4	2	112	1	10	1261

Dei 159 ST
attualmente
presenti nel data-
base, 81
provengono
dall'IZS Sardegna

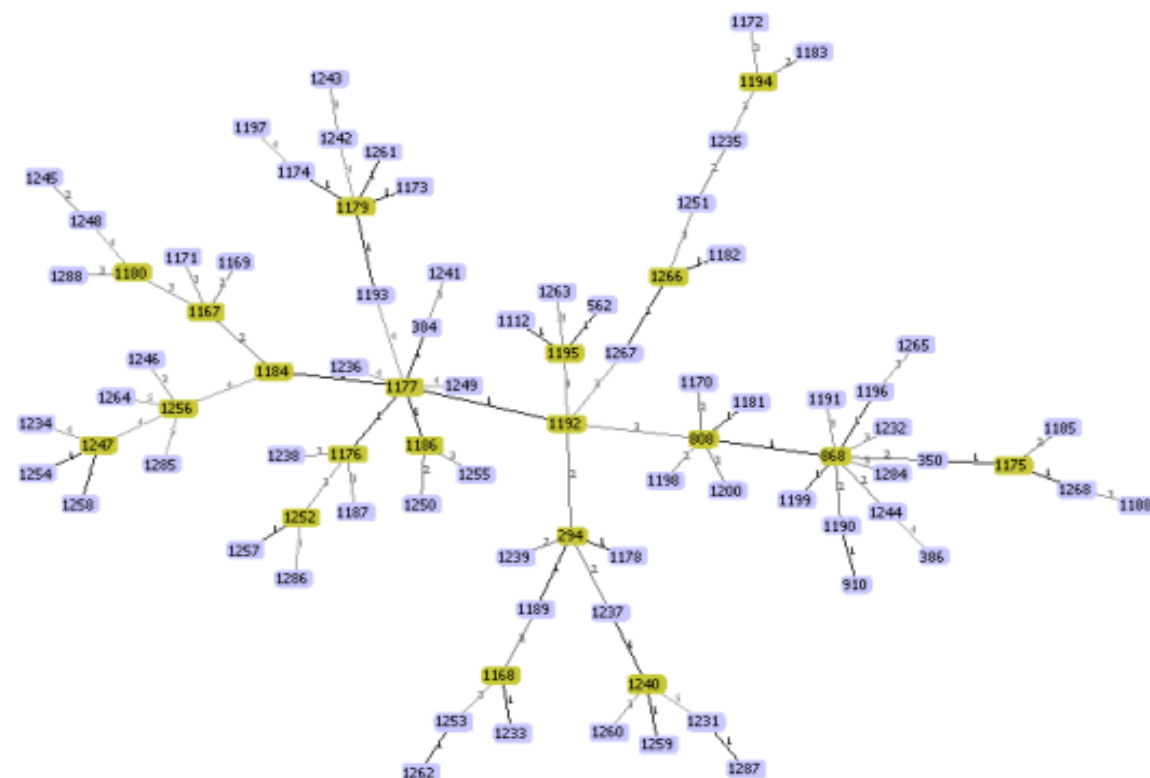


Figure 1. A complete minimum spanning tree (MST) based on allelic profiles of *Streptococcus uberis* isolated from ovine milk samples in Sardinia, Italy. The tree was generated by goeBURST full MST algorithm in PHYLOViZ 2.0 (<http://www.phyloviz.net>) (accessed on 29 April 2021). Numbers within the nodes indicate the ST. Yellow nodes correspond to the possible ST founders. Numbers on lines indicate locus variants between adjacent nodes.

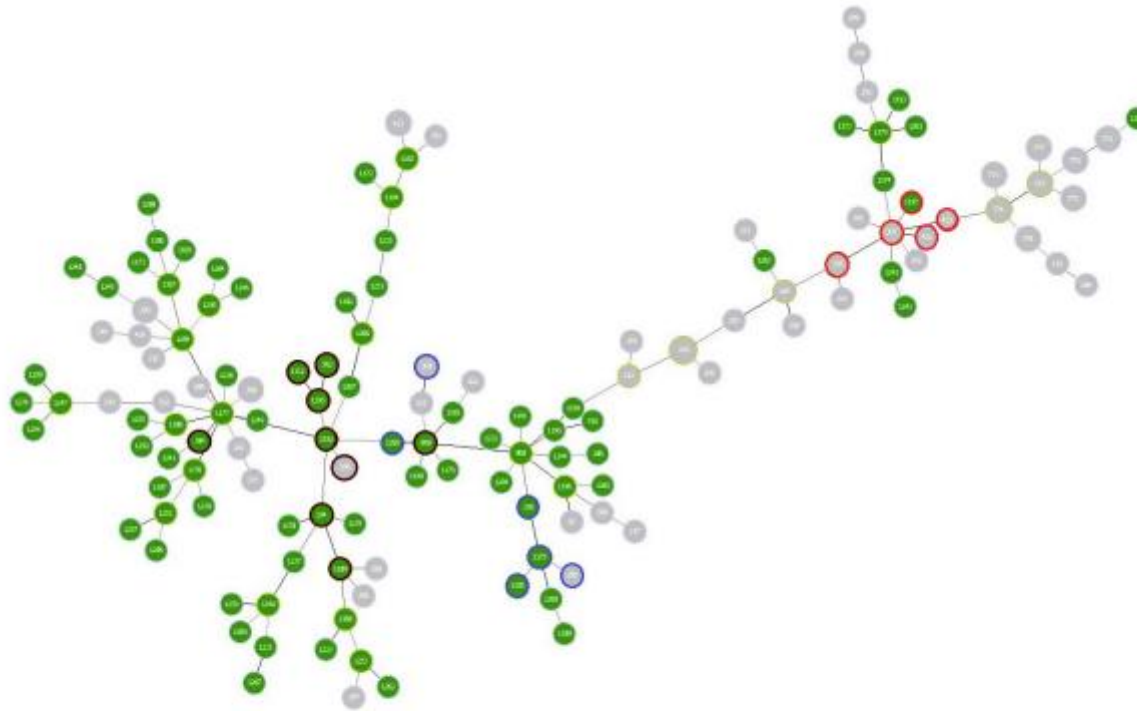


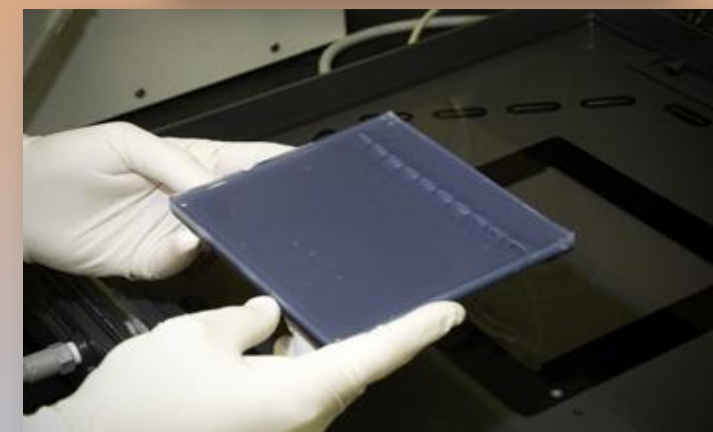
Figure 2. A complete minimum spanning tree (MST) of 137 *Streptococcus uberis* isolates from ovine (green) and bovine (grey) mastitis, collected in Italy. Isolates from bovine origin ($n = 51$) were downloaded from *S. uberis* MLST database (<https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-uberis>) (accessed on 29 April 2021). Numbers within the nodes indicate the ST. The color of the circle border refers to the clonal complex (CC) found: dark brown (CC143), blue (CC86) and red (CC5).

PFGE

(Pulsed Field Gel Electrophoresis)

➤ L'acronimo **PFGE** raggruppa tutte le tecniche utilizzate per la separazione di frammenti di DNA (di dimensione a partire da 24Kb), che si avvalgono di un campo elettrico la cui direzione varia periodicamente, rispetto alla matrice solida in cui avviene la migrazione.

- Estrazione del DNA
- Digestione con enzimi rari
- Corsa elettroforetica
- Colorazione ed acquisizione immagini

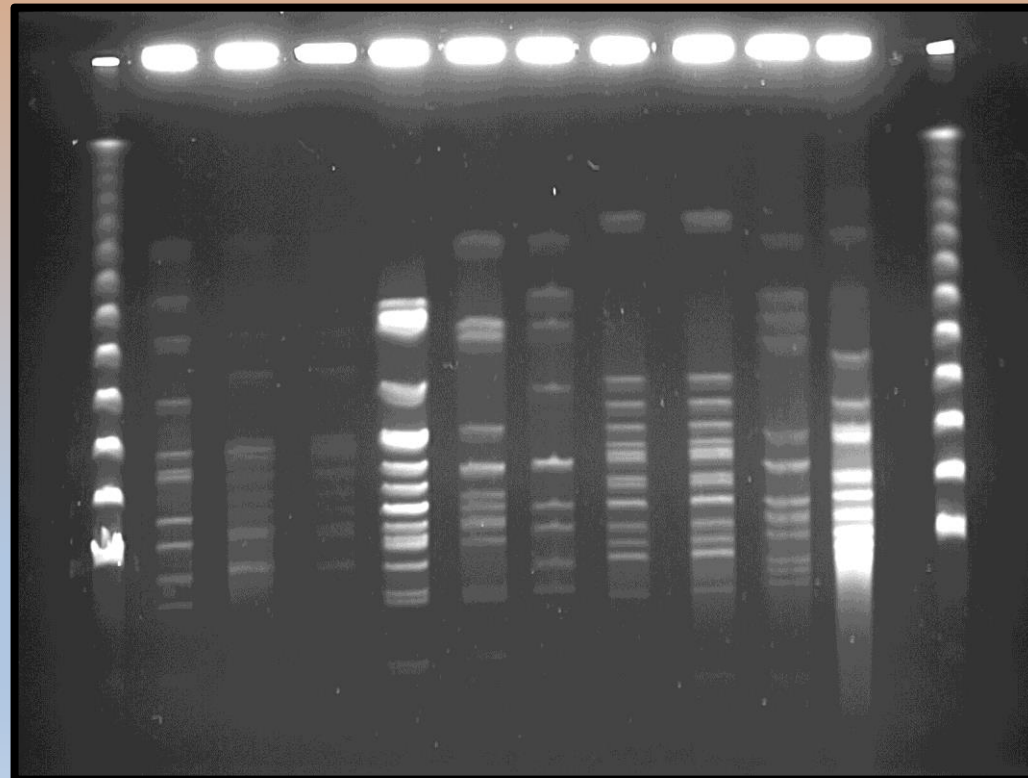




ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PIRELLI"

PFGE

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M



Restrizione con *Sma*I

M = marker
1-10 = isolati di *S. uberis*

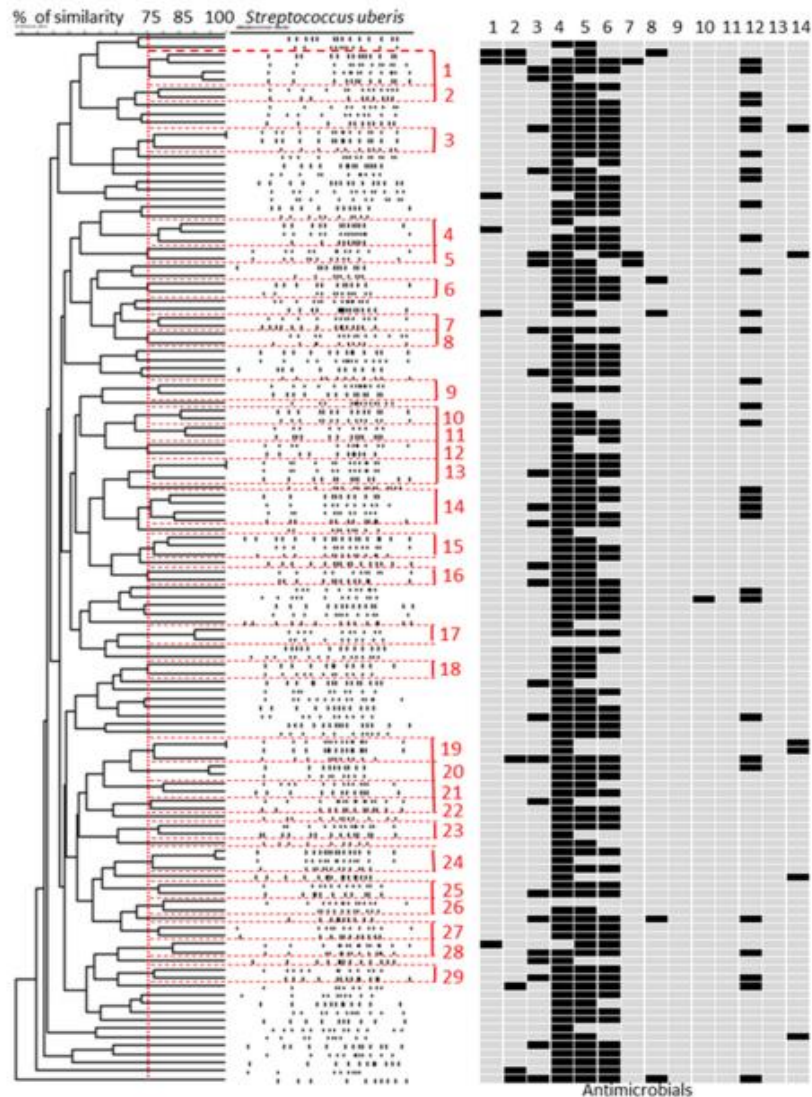


Figure 3. PFGE-based dendrogram of 124 *Streptococcus uberis* isolates collected from ovine milk samples and antimicrobial resistance profiles. Clusters were based on $\geq 75\%$ similarity and are labeled 1 to 29 in red. For antimicrobial resistance phenotypes, black indicates resistance and grey indicates susceptible or intermediate. Antimicrobials are ampicillin (1), penicillin (2), tetracycline (3), streptomycin (4), kanamycin (5), gentamicin (6), erythromycin (7), trimethoprim-sulphamethoxazole (8), amoxicillin-clavulanic acid (9), cephalothin (10), oxacillin (11), novobiocin (12), ceftiofur (13) and pirlimycin (14).

- La PFGE evidenzia una elevata variabilità genetica a dimostrazione che, sul territorio regionale, la gran parte degli isolati batterici non ha origine clonale
- Tale considerazione è confermata dall'analisi con MLST che rileva ben 81 ST differenti nei ceppi analizzati



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"




pathogens



Article

Molecular Typing and Antimicrobial Susceptibility Profiles of *Streptococcus uberis* Isolated from Sheep Milk

Nives Maria Rosa ¹, Ilaria Duprè ^{1,2}, Elisa Azara ¹, Carla Maria Longheu ¹ and Sebastiana Tola ^{1,*} 



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"

Vezina et al. BMC Veterinary Research (2022) 18:264
<https://doi.org/10.1186/s12917-022-03341-1>

BMC Veterinary Research

RESEARCH

Open Access



Genomic surveillance reveals antibiotic resistance gene transmission via phage recombinases within sheep mastitis-associated *Streptococcus uberis*

Ben Vezina^{1*} , Maria Nives Rosa^{2†}, Antonella Canu^{2†} and Sebastiana Tola^{2*}

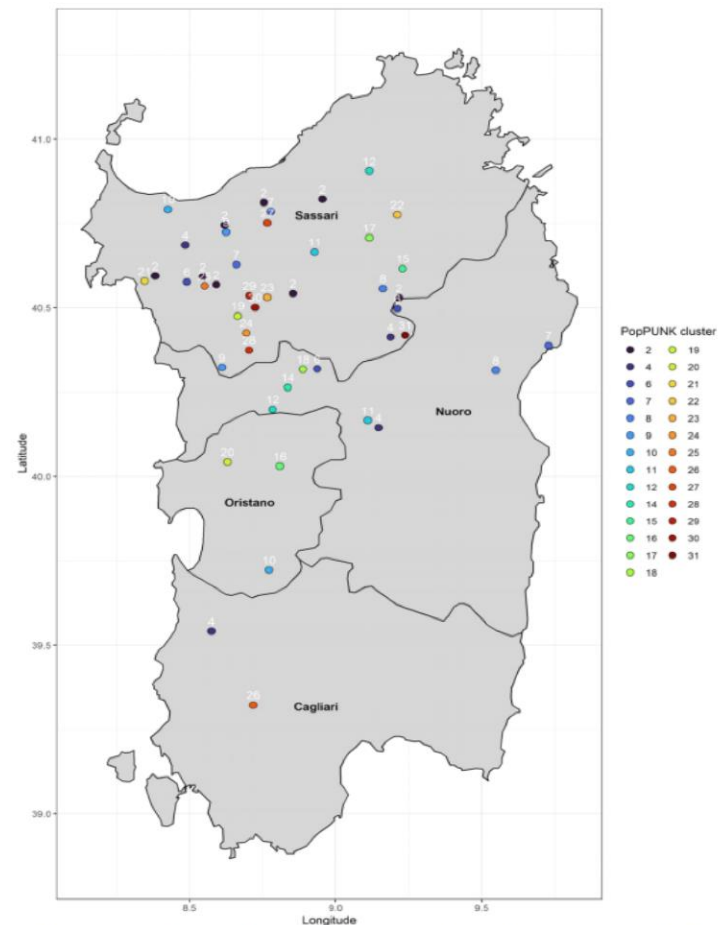


Fig. 1 Map of Sardinia showing the collection of *S. uberis* isolates from sheep mastitis milk samples. Each point represents an individual isolate while point colour represents the PopPUNK cluster number as an alternative for MLST typing. PopPUNK cluster also shown in white above point. Regions are shown in bolded black text.

Il sequenziamento non ha evidenziato la presenza di geni di resistenza per gli aminoglicosidi: **resistenza innata**. E' inutile effettuare per gli streptococchi la resistenza fenotipica

Scelta di **46** isolati per il Whole Genomic Sequencing, IonTorrent Personal Genome Machine (PGM) (Life Technologies, Carlsbad, CA) dell'IZS Sardegna

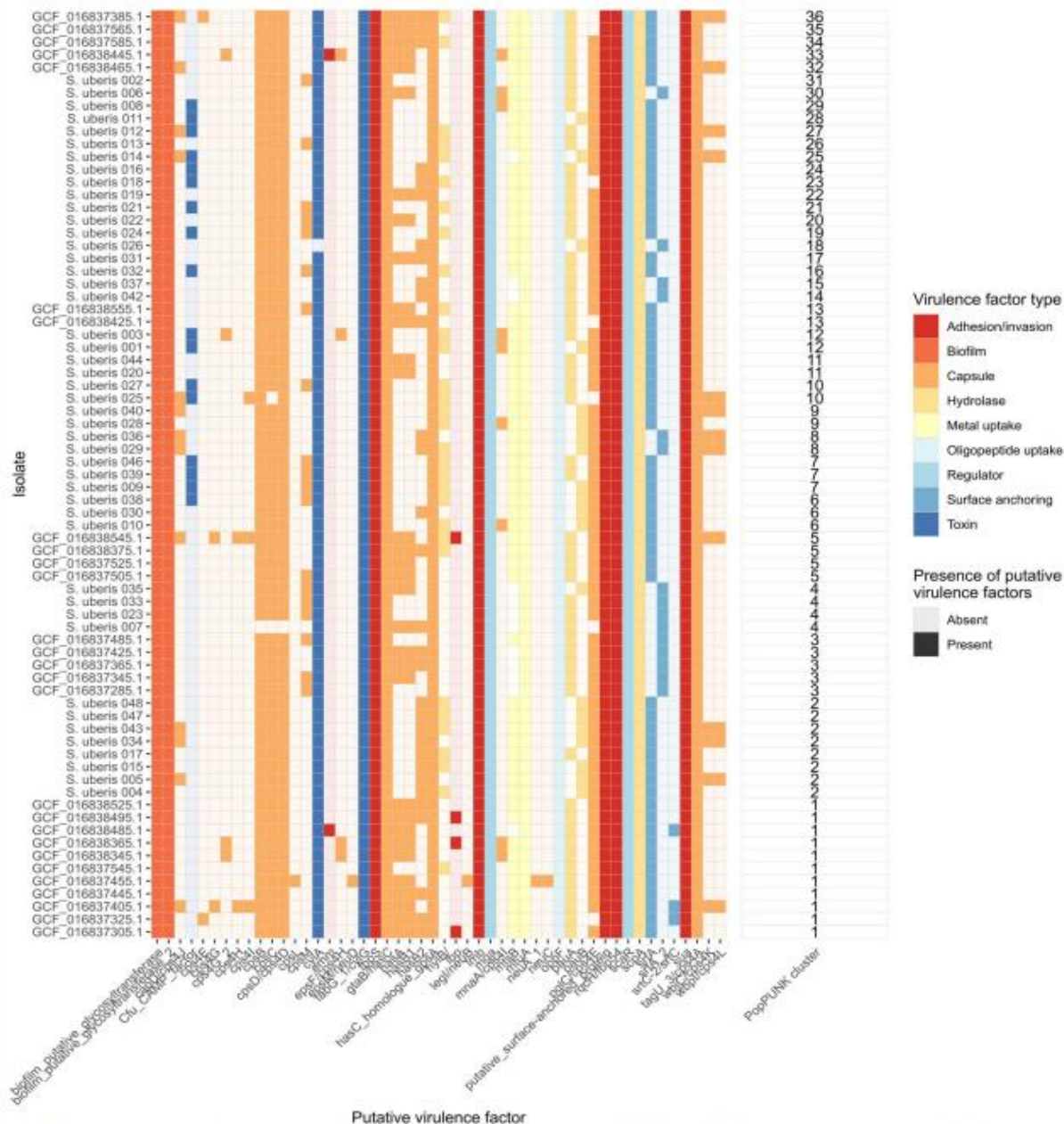


Fig. 5 Heatmap of putative virulence factors comparing *S. uberis* isolated from this study to Australian isolates. Virulence factor broad 'type' is shown based on colour, and transparency of colour denotes presence or absence within a genome

Fattori di virulenza
presenti nei 46 isolati di
Streptococcus uberis

Osservazioni/indicazioni dei revisori

Data la notevole variabilità genetica degli isolati di *S. uberis*, perché non avete campionato gli animali del focolaio e analizzato tutti i ceppi circolanti?

Che sintomatologia causano negli ovini gli *S. uberis*?

Nella preparazione dei vaccini stabulogeni, ha senso mettere un solo ceppo?

Quali proteine sono coinvolte nella produzione di anticorpi durante l'infezione naturale?

CAMPIONAMENTO DI ALLEVAMENTI CON MASTITE CLINICA DA STAFILOCOCCI E STREPTOCOCCI




RESEARCH ARTICLE

Open Access



Species identification by MALDI-TOF MS and *gap* PCR–RFLP of non-*aureus* *Staphylococcus*, *Mammaliicoccus*, and *Streptococcus* spp. associated with sheep and goat mastitis

Nives Maria Rosa^{1†}, Martina Penati^{2,3†}, Sara Fusar-Poli^{2,3}, Maria Filippa Addis^{2,3*}  and Sebastiana Tola¹

Allevamento di Dorgali (Nuoro) con isolamento di streptococchi

F4 (+) (B)	7 (standard)	<i>Streptococcus suis</i>	<u>1.85</u>	<i>Streptococcus suis</i>	<u>1.75</u>
F5 (+) (B)	7 (standard)	<i>Streptococcus suis</i>	<u>1.77</u>	No Organism Identification Possible	<u>1.63</u>

Allevamento di Dorgali (Nuoro): maggio 2022

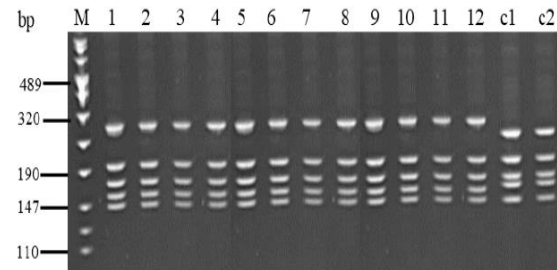
174 pecore, 24 con mastite clinica
12 pecore sono state selezionate in base al quadro clinico comune della mammella



Sheep n°	Half-udder RH	Half-udder LH	SLN RH	SLN LH	Milk
2627	Nodules, Calor, Rubor Sclerotic, Atrophic	Calor, Edematous	Reactive	Reactive	Normal
6843	Edematous	Sclerotic, Atrophic	Reactive	Normal	RH=slightly serous LH=serous/hemorrhagic
671	Edematous Sclerotic	Edematous	Reactive	Reactive	RH=serous with clots
8464	Nodules Edematous	Sclerotic, Atrophic	Normal	Normal	RH=serous with clots LH=serous with clots
8206	Sclerotic, Atrophic	Slightly edematous	Reactive	Normal	RH=serous with clots
2605	Nodules Edematous	Atrophic	Reactive	Normal	RH= hemorrhagic
8477	Dolor Sclerotic Atrophic	Edematous	Reactive	Reactive	RH=serous with clots
6740	Nodules Edematous Sclerotic	Nodules	Reactive	Reactive	RH=slightly serous with clots
6730	Nodules Edematous Sclerotic	Nodules	Reactive	Reactive	RH=serous with clots
1519	Nodules Calor Edematous	Nodules Calor Edematous	Reactive	Reactive	RH=serous LH=serous
2622	Calor Rubor Edematous	Edematous Sclerotic	Normal	Reactive	RH=serous with clots and slightly hemorrhagic LH=serous
2616	Nodules	Edematous	Reactive	Reactive	RH=serous with clots
RH=right					
LH=left					
SLN= supramammary lymph nodes					

Table 2: Clinical examination of udder, lymph nodes, and milk of the 12 ewes with mastitis

Additional file 5 Restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns of PCR products from the *gap* gene of 12 *S. ruminantium* and 2 *S. suis* isolates after digestion with *AluI* enzyme and separated by 12% NuPAGE gel. Lanes 1-12, isolates from mastitis outbreak; c1, *S. suis* isolate 3089; c2, *S. suis* isolate 3627. M, Marker VIII (Roche)



Additional file 6 Genomic sequence of the *gap* gene and sequence similarity data for the *S. ruminantium* isolate n° 2622.

TCCGAATTGAGATACCCACGATGTTCTGAAGATAACAAGTGGATCTTCAGTGTAACCGAATGATTCAGTAGCAGCAGTTTTCATAGCAGCGTTTACTTCTTCAGCAGTTACTTTCTTATCAAGAGTCGCAACCAATTCAGTTACAGAACCTGTTGGAACGGAACACGTTGTGCGGCACCATCAAGTTTACCATTCAATTCTGGGATTACCAAACCGATAGCTTTAGCTGCACCAGTTGAGTTAGGAACGATGTTTGCTGCAGCAGCAGCAGCAGCAGGAA GGTCACCACCACGGTGTGGTCCGTCAAGAACCATTGGTGCACCAGTGTAACCGTGGATTGTAGTCATCAAACCTTTTGAACGCCAAACGCAT CGTGAAGAGCTTTAGCCATTGGTGCCAAACAGTTGTAGTACATGAAGCACCTGAGATAACTGTTTCAGTACCGTCAAGGATGTCATGGTTAG TGTGAAAAACAACGTCTTCACATCGTTACCACCAGGAGCAGTGATAACAACCTTTCTTAGCACCGTTAGCGTGAATGTGTTGCTCAGCTTTT CTTTAGAAGCAAAGAAACCTGTTTGCTTCCAAAACAATATCTACGCCCATCAGTTAGCCAGTTCAATGTTTCTGGGCTCACGCTCAGCAG AAACCTTTTAACGAATTTACCCGTTAACTTCAAAAACCACCCGTCTTAACTTACAACCAGTACCCATCGAAAACGACCCTTTGA

☒ select all 100 sequences selected

[GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Streptococcus sp. DAT741 chromosome, complete genome	Streptococcus sp. DAT741	1212	1212	99%	0.0	96.99%	2105284	CP019557.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Streptococcus ruminantium GUT-189 DNA, complete genome	Streptococcus ruminantium	1212	1212	99%	0.0	96.99%	2081190	AP025333.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Streptococcus ruminantium GUT-183 DNA, complete genome	Streptococcus ruminantium	1212	1212	99%	0.0	96.99%	2175328	AP025331.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Streptococcus ruminantium GUT187T DNA, complete genome	Streptococcus ruminantium	1206	1206	99%	0.0	96.86%	2090539	AP018400.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Streptococcus ruminantium GUT-184 DNA, complete genome	Streptococcus ruminantium	1206	1206	99%	0.0	96.86%	2115310	AP025332.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Streptococcus suis strain NCTC10237 genome assembly, chromosome 1	Streptococcus suis	1079	1079	99%	0.0	93.72%	2070644	LR594043.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Streptococcus suis strain 1081 chromosome, complete genome	Streptococcus suis	1079	1079	99%	0.0	93.72%	2228089	CP017667.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Streptococcus suis strain 0061 chromosome, complete genome	Streptococcus suis	1079	1079	99%	0.0	93.72%	2138420	CP017666.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Streptococcus suis ST1, complete genome	Streptococcus suis ST1	1079	1079	99%	0.0	93.72%	2034321	CP002651.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Streptococcus suis strain HN105 chromosome, complete genome	Streptococcus suis	1074	1074	99%	0.0	93.58%	2196724	CP029398.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Streptococcus suis strain M105052_S26 chromosome, complete genome	Streptococcus suis	1074	1074	99%	0.0	93.58%	2411696	CP102136.1

Sequenziamento dell'intero genoma degli isolati di *S. ruminantium*

Nuova classificazione del ***S. suis***, uno dei più importanti patogeni dei suini che causa polmoniti, artrite, meningite e endocarditi. E' un agente zoonotico, riscontrato nelle persone a stretto contatto con i maiali o prodotti derivati

S. suis comprendeva
35 sierotipi

Attualmente, non sono più inclusi i
sierotipi **20, 22, 26, 32, 33 e 34**

I sierotipi **20, 22 e 26** sono rinominati
Streptococcus parasuis (Nomoto et al., 2015)

I sierotipi **32 e 34** sono rinominati
Streptococcus orisratti (Hill et al., 2005)

Il sierotipo **33** è rinominato ***Streptococcus ruminantium*** (Tohya et al., 2017)

Nota 1: Il MALDI-TOF MS non presenta nel database lo spettro dello ***S. ruminantium***


Nota 2: ***S. ruminantium*** isolato in Giappone da bovini con artrite, polmonite e endocarditi (Okura et al., 2019)

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Streptococcus ruminantium-associated sheep mastitis outbreak detected in Italy is distinct from bovine isolates



Maria Nives Rosa^{1†}, Ben Vezina^{2*†}, Gavino Marogna¹, Antonella Canu¹, Monica Rosaria Molotzu¹ and Sebastiana Tola^{1*} 

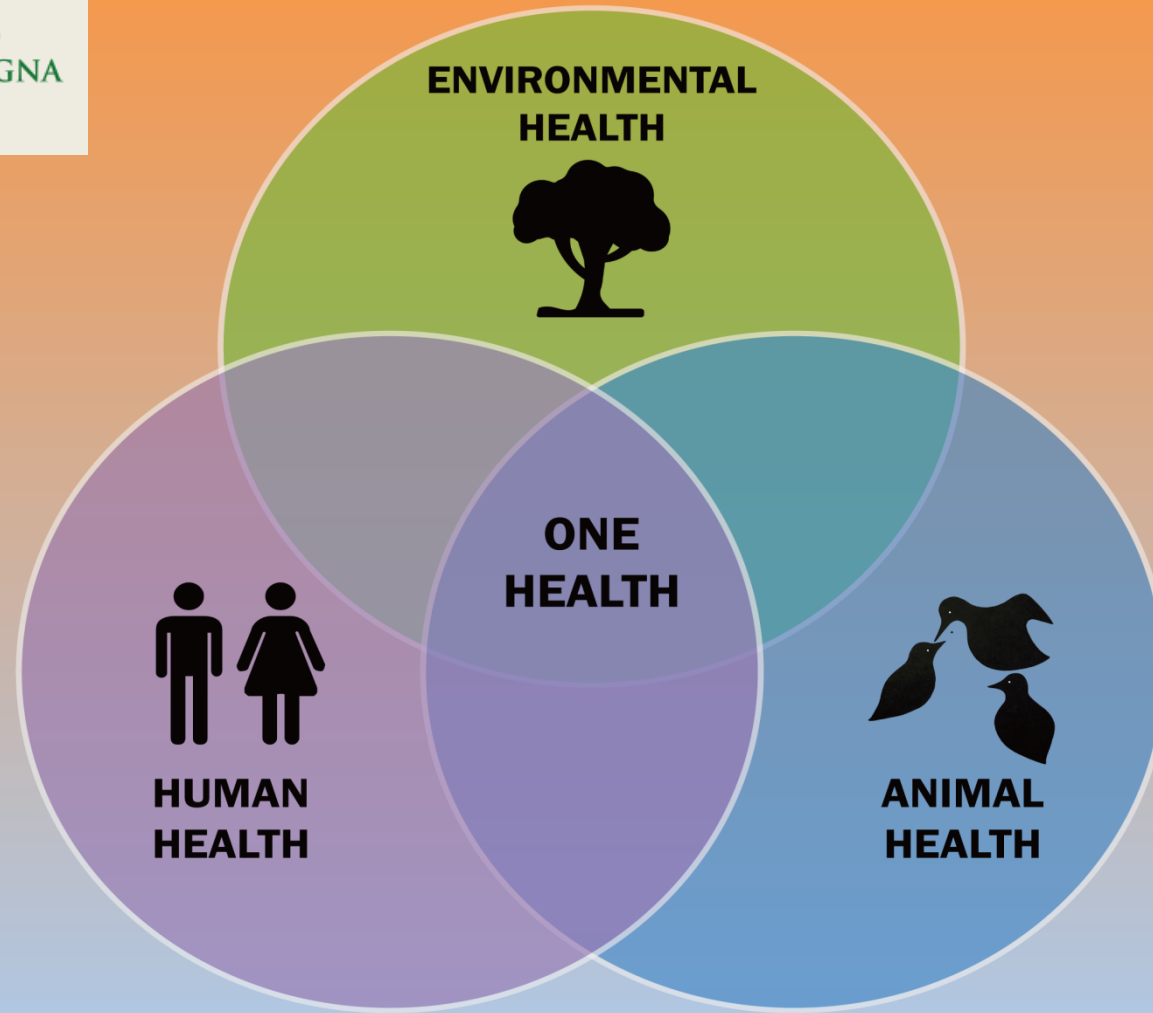
INDICAZIONI/OSSERVAZIONI DEI REVISORI

- perché non avete campionato gli altri animali presenti nell'allevamento?
- perché non avete campionato tutto il personale dell'allevamento
- perché non avete campionato l'acqua, feci etc
- sarebbe interessante verificare con gli ospedali/centri di cura locali la diffusione del *S. ruminantium*.

Si richiede un approccio



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA
"G. PEGREFFI"



La visione olistica *One Health*, si basa sul riconoscimento che la salute umana, la salute animale e la salute dell'ecosistema siano legate indissolubilmente.

GRAZIE per l'attenzione