

Identificazione molecolare di *Bordetella bronchiseptica* mediante real-time PCR con SYBR Green in cani con problemi respiratori

RIASSUNTO

La tracheobronchite infettiva del cane o “tosse dei canili” è una sindrome respiratoria ad eziologia variabile, causata dall’adenovirus 2 canino (CAV2), dal virus della parainfluenza (PIV), dal coronavirus respiratorio e dalla *B. bronchiseptica* (Bb) che riveste un ruolo di primaria importanza. Lo scopo del lavoro è descrivere la messa a punto di una metodica di PCR real-time che prevede l’utilizzo di SYBR Green su ceppo di riferimento e la sua successiva applicazione per la ricerca diretta di Bb in cani affetti da tosse acuta e/o persistente. La PCR real-time con SYBR Green è stata allestita con una coppia di primers specifici per il gene *flaA* di Bb, utilizzando il ceppo di riferimento ATCC 10580, come controllo positivo. Alla fine della reazione di amplificazione, è stata eseguita l’analisi della curva di melting e del prodotto di amplificazione mediante corsa elettroforetica in gel di agarosio per confermare il prodotto di amplificazione atteso. La metodica è stata quindi applicata su DNA estratti da 50 tamponi faringei prelevati da altrettanti cani, con sintomi riferibili a infezione tracheobronchiale acuta (ITB) e affezioni respiratorie ad andamento persistente/cronico. I pazienti erano suddivisi in 3 gruppi: A < 1 anno, B tra 1 e 7 anni, C > 7 anni. I risultati mostrano positività alla ricerca di Bb per 26 campioni (52%), in particolare: 26% nel gruppo A, 16% in B e 10% in C. La metodica messa a punto presenta notevoli vantaggi in termini di tempo e permette pertanto una rapida identificazione eziologica per Bb. Le elevate positività riscontrate suscitano interesse da un punto di vista epidemiologico e clinico nei riguardi di popolazioni canine con tosse. La PCR real-time con SYBR Green potrà essere utilizzata come metodo di screening per una rapida evidenziazione del patogeno Bb finora principalmente studiato in umana più che in veterinaria.

INTRODUZIONE

Bordetella bronchiseptica (Bb) ha subito nel corso degli anni numerosi cambiamenti per quanto concerne la sua classificazione e nomenclatura¹. Identificato come *Bacillus bronchicanis* da Ferry nel 1910, per il suo isolamento dalle vie respiratorie di cani affetti da cimurro, venne successivamente rinominato *Batterio bronchisepticus*, *Alcaligenes bronchisepticus*, *Brucella bronchiseptica*, *Alcaligenes bronchicanis* e *Haemophilus bronchisepticus*. Solo nel 1952 al batterio fu dato il nome attuale di *B. bronchiseptica* quando Moreno-Lopez² decisero di inserirlo nel genere *Bordetella*, in onore di Jules Jean Baptiste Vincent Bordet, che per primo isolò l’agente eziologico della pertosse nell’uomo.

Bb è un batterio di forma cocco-bastoncellare, Gram negativo, aerobio stretto, catalasi e ossidasi positivo. Si differenzia dalle altre specie del suo genere (*B. ansorpii*, *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. parapertussis*, *B. pertussis*, *B. petrii*, *B. trematum*) per alcune caratteristiche biochimico-enzimatiche e fenotipiche: utilizza il citrato, non fermenta i carboidrati, idrolizza l’urea, non è emolitico su agar sangue ed è mobile³. *Bordetella pertussis* e *B. parapertussis* sono principalmente conosciute come patogeni umani^{4,5,6} tuttavia alcuni casi sono stati riferiti anche in medicina veterinaria⁷. Bb è uno degli agenti eziologici primari della rinite atrofica e polmonite nel suino, tracheobronchite nel cane, rinite nel coniglio e affezioni del tratto respiratorio nel gatto^{8,9}. Tra le malattie respiratorie, la tracheobronchite infettiva (ITB) del cane o “tosse dei canili” è conosciuta come una malattia altamente contagiosa, a decorso acuto che può essere provocata da diversi agenti microbici e virali tra cui Bb, l’adenovirus 2 canino (CAV2), il virus della parainfluenza (PIV) e il coronavirus respiratorio^{10,11}. Nei cuccioli, in particolare, è stata anche descritta una forma di polmonite batterica infettiva acquisita nella comunità che nella maggior parte dei casi (49%) è sostenuta da Bb¹². La diagnosi presunta di malattia respiratoria, di eventuale ITB o comunque di malattia riferibile a “Canine Infectious Respiratory Disease Complex” (CIRDC) verrà effettuata dal veterinario in base all’anamnesi, alla valutazione dei segni clinici e alle indagini di laboratorio^{10,13}. L’analisi del lavaggio broncoalveolare (BAL) permette di mettere in evidenza il grado d’infiammazione e, mediante esame batteriologico, i germi eventualmente coinvolti. L’isolamento e l’identificazione di Bb, a partire da BAL, con metodi tradizionali non è scevra da difficoltà tecniche per la simultanea crescita di batteri spesso contaminanti e per i test biochimici identificativi richiesti¹⁴. Dalla letteratura si evince come l’introduzione della reazione a catena della polimerasi (PCR) ha permesso di agevolare la sua più rapida e specifica identificazione^{15,16,17,18} no-

A. Corona, DVM, PhD, Torino

A. Vercelli, DVM, CEAV Med. Int., Torino

A. Casassa, DVM, Torino

Ambulatorio Veterinario Associato, C.so Traiano 99/d,
Torino, Italia

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 30/08/2013 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 03/12/2013”.

Lavoro presentato nella sezione “comunicazioni brevi” al 78° Congresso Internazionale Multisala SCIVAC, Rimini 31 Maggio/2 Giugno 2013, atti pp. 548. Vincitore premio Royal Canin nella sezione Medicina interna.

nostante le affinità genetiche presenti con le altre due specie *B. pertussis* e *B. parapertussis*.

Lo scopo del presente lavoro è descrivere la messa a punto di una nuova metodica di PCR real-time con utilizzo di SYBR Green a partire da un ceppo di referenza ATCC di Bb e la sua successiva applicazione per la ricerca diretta del batterio in cani con tosse acuta e/o persistente. La tecnica molecolare descritta viene quindi proposta come metodo di screening in cani con malattia respiratoria ad eziologia sospetta per Bb.

MATERIALI E METODI

Ceppo di referenza: coltura ed estrazione DNA

Per la messa a punto della metodica si è utilizzato il ceppo di referenza Bb ATCC 10580 in Culti-Loops (Oxoid, Milano). Questo veniva seminato in brodo di coltura Brain Heart Infusion (Biogenetics, Padova) e successivamente su Tryptone Soya Agar addizionato con 5% sangue di pecora (Oxoid, Milano) a 36°C per un totale 48-72h (Figura 1). Dalla sospensione, in H₂O distillata sterile, di colonie del ceppo isolate in purezza si procedeva all'estrazione del DNA mediante trattamento termico per 5 min in microonde, successiva centrifugazione a 13000rpm per 5 min e recupero del surnatante che veniva quindi stoccato a -20°C. Per ogni estrazione è stato introdotto un controllo negativo con H₂O-DEPC (diethylpolycarbonato).

Selezione casi clinici

I casi clinici sono stati seguiti dallo stesso medico veterinario che eseguiva la visita, la raccolta

dei dati anamnestici e il prelievo dei tamponi a livello faringeo per gli esami di PCR. I 50 cani, di differente sesso e razza, sono stati suddivisi in 3 gruppi in base all'età: gruppo A <1 anno (n=17), gruppo B tra 1 e 7 anni (n=18) e gruppo C > 7 anni (n=15). Quelli del gruppo A e parte di B erano caratterizzati da problemi respiratori che, riferivano i proprietari, avevano un'insorgenza rapida e quindi presenti da un massimo di 3 giorni. Quelli del gruppo C e i rimanenti B presentavano invece una sintomatologia tussigena più lieve ma persistente da alcune settimane o che recidivava dopo un precedente trattamento antibiotico. Quando possibile sono state annotate informazioni riguardanti lo stile di vita, i luoghi di frequentazione e di relazione con altri cani (giochi, agility, mostre ecc...).

Estrazione DNA da campioni

I tamponi faringei erano conservati in provetta sterile contenente EDTA e stoccati a temperatura di refrigerazione, per un massimo di 3 giorni, fino all'estrazione del DNA. Questa è stata effettuata tramite l'utilizzo di kit commerciali (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Milano) che permettono di ottenere un volume finale di circa 100 µl di DNA eluito in buffer AE e stoccato a -20°C fino al suo utilizzo per la reazione di PCR.

Tecnica PCR Real-Time ed elettroforesi

La reazione di PCR real-time è stata eseguita su termociclatore StepOne (Life Technologies Italia, Monza), strumento capace di rilevare la fluorescenza emessa dal colorante intercalante SYBR Green presente nella miscela di reazione (Life Technologies Italia, Monza). Per la reazione di PCR real-time mediante SYBR Green è stata utilizzata una coppia di primers specifici per il gene flagellare *flaA* di Bb: Fla4 (forward) 5'-TGGCGCCTGCCCTATC-3' e Fla2 (reverse) 5'-AGGCTCCCAAGAGAGAA-AGGCTT-3' che producono un prodotto di amplificazione di 237bp, come descritto da Hozbor et al., 1999¹⁵. Il volume finale per singola reazione era di 25 µl contenente 2 µl DNA, 12 µL di Fast Mixer SYBR Green, 1µL di ciascun primer (100mM) e H₂O pura fino a raggiungimento del volume. Come controllo positivo si utilizzava il ceppo di referenza ATCC 10580 e come controllo negativo H₂O-DEPC, inserito in ogni ciclo di reazione. I cicli di amplificazione comprendevano uno step iniziale di denaturazione a 95°C per 20 sec, seguiti da 40 cicli comprensivi di 0,1 sec di denaturazione a 95°C, annealing e extension a 60°C per 20 sec, e uno step finale di melting per lo studio della relativa curva: 95°C per 15 min, 60°C per 1 min e infine un lento aumento della temperatura a 95°C ad una velocità di 0,3°C per 15 sec per l'acquisizione continua del declino di fluorescenza. Il prodotto di amplificazione del ceppo di referenza (ATCC 10580)

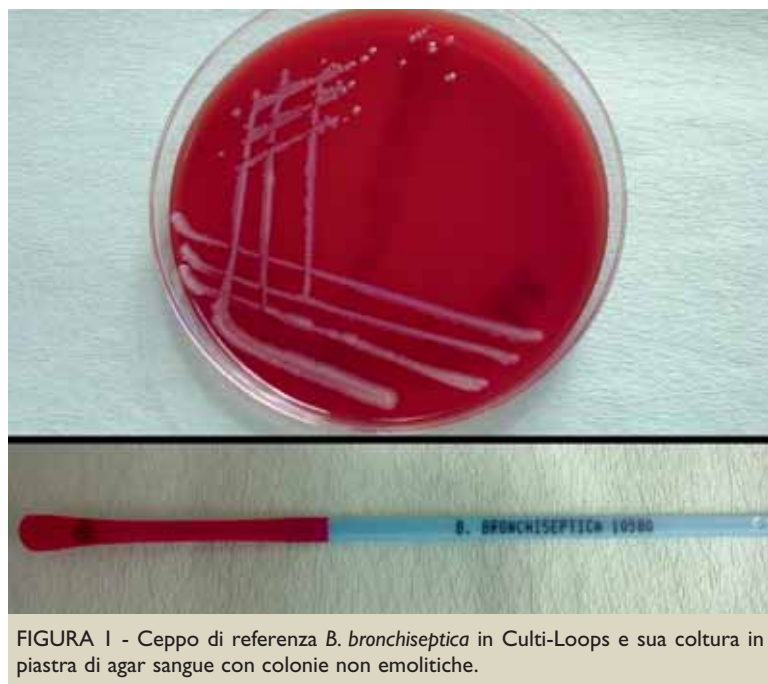


FIGURA 1 - Ceppo di referenza *B. bronchiseptica* in Culti-Loops e sua coltura in piastra di agar sangue con colonie non emolitiche.

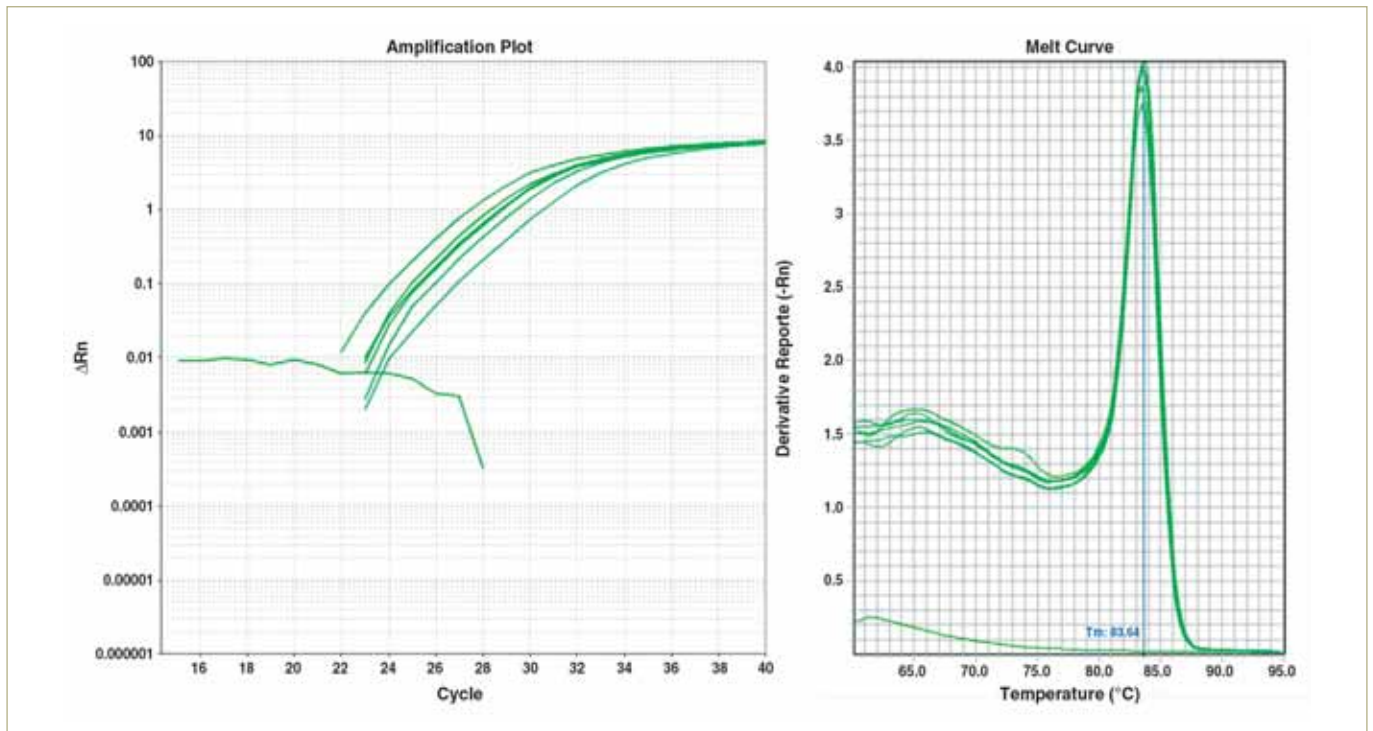


FIGURA 2 - Curva di amplificazione dei campioni positivi alla ricerca di *B. bronchiseptica* mediante PCR real-time con SYBR Green e relativa curva di melting.

è stato saggiato tramite corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2%, contenente bromuro di etidio, per l'evidenziazione della banda di 237bp corrispondente alla regione amplificata del gene *flaA* di *Bb*. Per tutti gli altri amplificati, è stata eseguita l'analisi della temperatura di melting (T_m) e relativa curva per l'accertamento dell'avvenuta reazione e l'assenza/presenza di aspecifici, congiuntamente al controllo positivo precedentemente testato.

RISULTATI

La reazione di PCR real-time in SYBR Green e la relativa analisi della curva di melting sul ceppo di riferimento di *Bb* ATCC 10580, mostrano una corretta individuazione del DNA batterico e l'amplificazione a partire dal 22-23° ciclo, con un massimo della T_m a $83 \pm 1^\circ\text{C}$ (Figura 2).

Nessuna amplificazione si è manifestata nel controllo negativo (H_2O), la lettura della corsa elettroforetica conferma un prodotto di 237bp corrispondente al gene *flaA* (Figura 3).

Sul totale dei 50 campioni di DNA saggiati, $n=26$ sono risultati positivi (52%) alla ricerca di *Bb* con tecnica PCR real-time SYBR Green. In particolare nei 3 gruppi saggiati si evidenziano le seguenti positività: $n=13$ (26%) nel gruppo A, $n= 8$ (16%) nel gruppo B e $n=5$ (10%) in C (Grafico 1).

Considerando il solo gruppo dei cuccioli (A) si evince un'incidenza pari al 76% dei cuccioli testati (Grafico 2).

DISCUSSIONE

La metodica di PCR real-time con SYBR Green ci consente di monitorare la formazione del prodotto e di analizzare la successiva curva di melting, con notevoli vantaggi in termini di tempo ed affidabilità legati alle caratteristiche della reazione stessa, come già descritto in letteratura^{15,19}. Infatti l'isola-

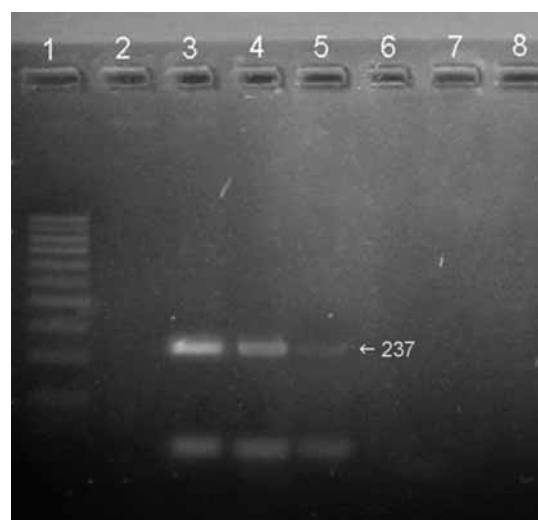


FIGURA 3 - Elettroforesi in gel agarosio 2% al bromuro di etidio, per evidenziazione del frammento di 237bp (*flaA*) di *B. bronchiseptica* da tre diluizioni successive del ceppo di riferimento ATCC 10580 (colonna 3-4-5), controllo negativo (colonna 2) e peso molecolare 100bp (colonna 1).

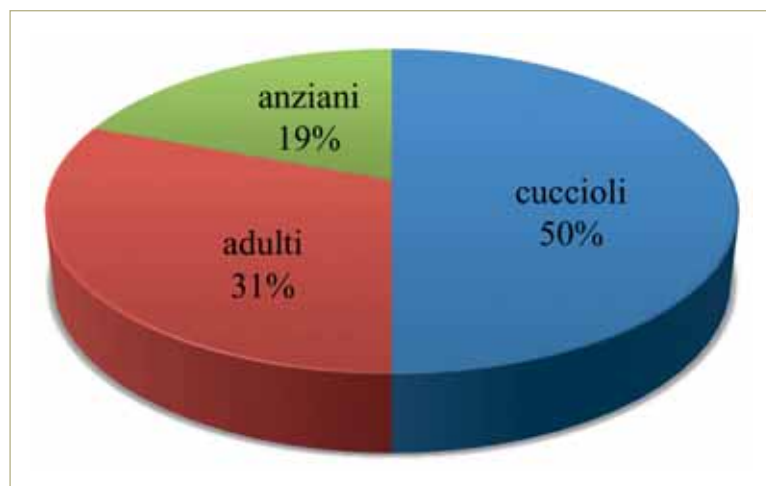


GRAFICO 1 - Positività percentuali riscontrate nelle tre classi (A, B e C) alla ricerca di *B. bronchiseptica*.

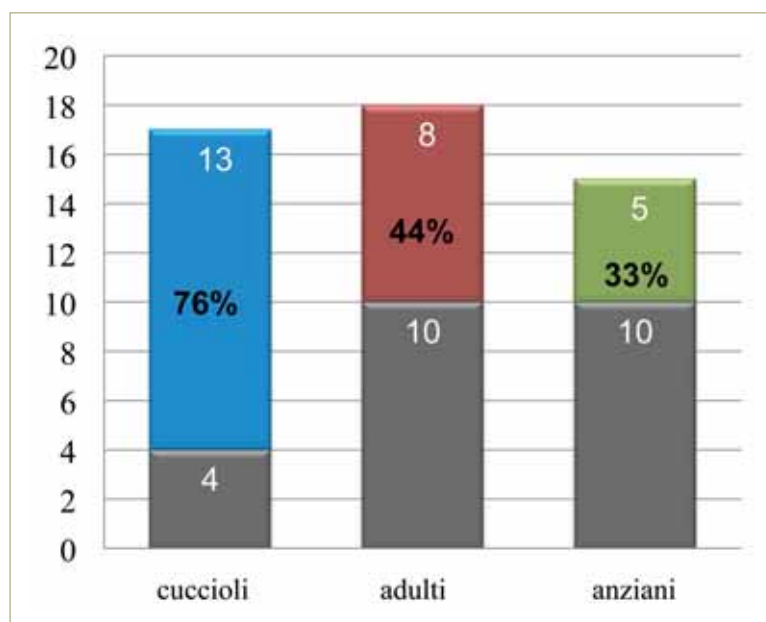


GRAFICO 2 - Incidenza delle positività nelle singole classi dei campioni testati (cuccioli, adulti e anziani).

mento di *Bb* mediante la sola microbiologia classica si presenta piuttosto indaginosa: può essere eseguita su diversi terreni colturali (MacConkey agar, Bordet-agar o Gengou Smith-Baskerville) che però consentono la crescita di altri batteri, anche semplici contaminanti, che alterano la morfologia coloniale di *Bb*, rendendo necessaria l'esecuzione di numerosi test biochimici per la sua più certa identificazione²⁰. Per tale ragione l'utilizzo delle tecniche di biologia molecolare (PCR) facilitano la sua identificazione e permettono di discriminare anche tra le specie più affini del genere *Bordetella*^{19,21}. Nello specifico, la reazione di PCR real-time con SYBR Green, qui descritta, consente una rapida identificazione del batterio in circa 90 min. Tecnicamente il SYBR Green, colorante intercalante fluorescente, quando è fortemente legato al DNA

a doppio filamento, determina un aumento della fluorescenza che viene rilevato dalla macchina^{22,23}. A reazione avvenuta, il software rende visibile la formazione di un picco di fusione detto punto della curva di melting (Figura 2). Tale tipologia di analisi molecolare non rende più necessaria la visualizzazione dei prodotti di PCR su un gel di agarosio e permette un notevole risparmio di tempo, migliorando inoltre la sicurezza per l'operatore.

I risultati ottenuti, con particolare riferimento alle positività (52%), evidenziano l'importanza della prevalenza del patogeno *Bb* finora principalmente studiato in umana¹ rispetto alla veterinaria²⁰. La corretta identificazione e la diagnosi eziologica della malattia respiratoria sono infatti necessarie per un migliore approccio terapeutico rispetto alle infezioni di origine virale (CAV2, PIV e coronavirus) a cui possono successivamente associarsi altri batteri presenti nell'albero respiratorio²⁴ (*E. coli*, *Klebsiella spp*, *Pseudomonas spp*, *Streptococcus spp*). Tuttavia bisogna precisare che la sola indagine molecolare per la ricerca mirata di *Bb* non può escludere la concomitante presenza di altri patogeni delle vie aeree. Nella nostra esperienza i trattamenti farmacologici (doxiciclina o azitromicina) eseguiti dopo esito positivo alla PCR, hanno portato ad una risoluzione della sintomatologia tossigena, tuttavia questo non permette di identificare il batterio come unico responsabile del quadro clinico-sintomatologico osservato. In molti casi la bordetellosi è una malattia autolimitante e i trattamenti farmacologici sono spesso riservati ai casi resistenti o con complicanze polmonari²⁵.

Le elevate positività riscontrate tra i cuccioli (76%) congiuntamente ai rilievi clinici caratterizzati da fenomeni di tosse acuta sono indicativi di una ITB acuta sostenuta da *Bb*, così come anche in parte degli adulti. Nel gruppo anziani è interessante evidenziare come l'anamnesi dei soggetti, risultati positivi alla ricerca di *Bb* mediante PCR, riferisce di un contatto con altri soggetti di giovane età e con tosse, recentemente introdotti in ambito familiare o in allevamento o anche durante attività all'aperto (agility, aree cani per gioco, ecc...)^{13,26}. Tali considerazioni congiuntamente alle non esigue positività riscontrate induce gli autori a consigliare la metodica di PCR real-time con SYBR Green come metodo di screening su popolazioni canine di differenti età con problemi respiratori acuti o cronici/persistenti.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il tecnico specializzato di laboratorio Ilaria Francesca Boido per la preziosa collaborazione durante le fasi di realizzazione tecnica del lavoro.

Parole chiave

Bordetella bronchiseptica, PCR SYBR Green, tosse, cani.

Molecular identification of *Bordetella bronchiseptica* by real-time PCR in dogs with respiratory disease

Summary

The infectious tracheobronchitis of dog or “kennel cough” is a respiratory syndrome caused by different etiologic agents such as canine adenovirus 2 (CAV-2), parainfluenza virus (PIV), respiratory coronavirus and by *Bordetella bronchiseptica* (Bb) which is considered the prominent agent. The aim of the following paper is to describe the development of a diagnostic method based on SYBR Green real-time PCR on a reference strain and its subsequent application for the direct search of Bb in patients with acute and/or persistent cough. The real-time PCR based on SYBR Green was arranged with a couple of primers specific for the *flaA* gene of Bb, using the reference strain of ATCC 10580 as a positive control. At the end of the cycle, the melting temperature curve was ana-

lysed and the expected product of 237bp was detected by electrophoresis in agarose gel at 2%. The technique was applied on 50 throat swabs taken from dogs affected by infectious tracheobronchitis or chronic/persistent respiratory diseases. The patients were divided into 3 groups: group A <1 year, group B between 1 and 7 years, group C > 7 years. The results showed positivity of Bb in 26 samples (52%), in particular: 26% in group A, 16% in group B and 10% in group C. The developed method has considerable advantages in terms of time, sensitivity and specificity. The frequent positivity detected indicates the epidemiological and clinical importance of the identification of Bb in coughing dogs. The real-time PCR based on SYBR green can be used as a screening method for detection of the pathogen Bb, until now more deeply studied in human than in veterinary medicine.

Key words

Bordetella bronchiseptica, PCR SYBR Green, cough, dogs.

BIBLIOGRAFIA

1. Woolfrey BF and Moody JA. Human infection associated with *Bordetella bronchiseptica*. Clin Microbiol Rev. 4, 3: 243-55, 1991.
2. Lopez-Moreno M. El genero *Bordetella*: Microbiol Esp. 5, 1952, pp. 177-81.
3. Hoppe J. *Bordetella*. In: Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenoever M, Tenover R. Ed. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed Washington, DC, 1999, pp. 614-24.
4. Hewlett E. Pertussis: current concepts of pathogenesis and prevention. Pediatr Infect Dis J. 16, 4: 78-84, 1997.
5. Cotter PA, Miller JF. *Bordetella*. In: Groisman EA. Ed. Principles of Bacterial Pathogenesis Academic Press., 2001, pp. 619-74.
6. Mattoo S, Cherry J. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. Clin Microbiol Rev. 18, 2: 326-82, 2005.
7. Porter JF, Connor K, Donachie W. Isolation and characterization of *Bordetella parapertussis*-like bacteria from ovine lungs. Microbiology 140: 255-61, 1994.
8. Goodnow RA. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. Microbiol Rev. 12: 722-38, 1980.
9. Egberink H, Addie D, Belák S et al. *Bordetella bronchiseptica* infection in cats. ABCD guidelines on prevention and management. J Feline Med Surg. 11, 7: 610-4, 2009.
10. Hawkins EC. Respiratory System Disorders. In: Nelson RW, Couto CG. Ed. Small Animal Internal Medicine. Mosby Elsevier, 4th ed., 2009, pp. 285-301.
11. Buonavoglia C, Mortella V. Canine respiratory virus. Vet Res. 38, 2: 355-73, 2007.
12. Radhakrishnan A, Drobatz KJ, Culp WT et al. Community-acquired infectious pneumonia in puppies: 65 cases (1993-2002). J Am Vet Med Assoc. 230, 10: 1493-7, 2007.
13. Ford RB. Canine Infectious Respiratory Disease. In: Green CE. Ed. Infectious Diseases of the Dog and Cat. Elsevier Saunders 4th ed., 2012, pp. 55-64.
14. Dénes AL, Răpuntean GH, Cosmina Cuc et al. Biochemical tests used for identification of *Bordetella bronchiseptica*. Buletinul USAMV-CN 63: 67-70, 2008.
15. Hozbor D, Fouque F, Guiso N. Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. Res Microbiol. 150: 333-41, 1999.
16. Messina MT, Mangano AM, Santillan MA et al. Polymorphism in the pertussis toxin promoter in *Bordetella bronchiseptica* veterinary isolates from Argentina. Diagn Microbiol Infect Dis. 49, 4: 227-9, 2004.
17. Register KB, DeJong KD. Analytical verification of a multiplex PCR for identification of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from swine. Vet Microbiol. 117, 2-4: 201-10, 2006.
18. Stark M, Reizenstein E, Uhlen M et al. Immunomagnetic separation and solid-phase detection of *Bordetella pertussis*. J Clin Microbiol. 34, 4: 778-84, 1996.
19. Koidl C, Bozic M, Burmeister A et al. Detection and differentiation of *Bordetella* spp. by real-time PCR. J Clin Microbiol. 45, 2: 347-50, 2007.
20. Friedman LE, Messina MT, Santoferrara L et al. Characterization of *Bordetella bronchiseptica* strains using phenotypic and genotypic markers. Vet Microbiol. 31, 117: 313-20, 2006.
21. Gerlach G, von Wintzingerode F, Middendorf B et al. Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. Microbes Infect. 3, 1: 61-72, 2001.
22. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology 11, 9: 1026-30, 1993.
23. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal Biochem. 245, 2: 154-60, 1997.
24. Mochizuki M, Yachi A, Ohshima T et al. Etiologic study of upper respiratory infections of household dogs. J Vet Med Sci. 70, 6: 563-9, 2008.
25. Sykes JE. Bordetellosis. In: Canine and Feline Infectious Diseases. Elsevier Saunders 1st ed., 2013, pp. 372-9.
26. Vieson MD, Piñeryo P, LeRoith T. A review of the pathology and treatment of canine respiratory infections. Vet Med: Research and Reports 3: 25-39, 2012.