

NUOVO PROTOCOLLO DI QPCR PER LA DIAGNOSI DI *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR GALLINARUM

Marino M.¹, Pugliese N.¹, Circella E.¹, Caroli A.¹, Legretto M.¹, De Virgilio C.², Romito D.¹, Camarda A.¹

¹ *Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari “Aldo Moro”, Italia*

² *Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologie e Biofarmaceutica, Università degli Studi di Bari “Aldo Moro”, Italia*

Summary

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Gallinarum (*S. Gallinarum*) is the causative agent of fowl typhoid, a major threat in poultry which causes mortality and high morbidity. The standard method for detection of *S. Gallinarum* relies on culture isolation and it requires more than five days for final confirmation. Recently, molecular methods have been developed, but they are not considered as golden standards, also because they do not allow pathogen quantification.

Therefore, we developed a real time quantitative PCR (qPCR) which may represent a fast and accurate method that reduce drastically the extent of the analytical process, while being sensitive and specific. In order to grant specificity, a specific probe has been designed to detect the amplification products. The method has been tested *in vitro* and it has been proved to be effective for detection and absolute quantification of *S. Gallinarum*. In particular we found high sensitivity and specificity, with accuracy higher than 98%. Therefore, we find that the method may be suitable for diagnostic and other application, such as environmental monitoring.

INTRODUZIONE

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Gallinarum (*S. Gallinarum*) è un batterio Gram negativo, anaerobio facoltativo, immobile, ed è l'agente eziologico della tifosi aviare. La malattia può causare, nei volatili, diarrea, anoressia, calo della ovodeposizione e mortalità elevata, con conseguenti gravi perdite economiche per gli allevatori. (Shivaprasad, 2003).

La tifosi aviare è una malattia soggetta a denuncia. L'organizzazione internazionale della sanità animale, inoltre, ha emesso specifiche direttive per la prevenzione e il trattamento della malattia (OIE, 2010b), ed ha stabilito i criteri per la diagnosi differenziale tra *Salmonelle* mobili e immobili.

Attualmente, le metodiche standard sono basate sulle tecniche di isolamento ed identificazione culturali, esplicitate dalla norma ISO6579:2002, che consiste nel prearricchimento non selettivo seguito da una fase di arricchimento selettivo e successive colture su terreni selettivi, a cui segue l'identificazione basata su test biochimici e la sierotipizzazione (Popoff *et al.*, 1997) (ISO 6579:2002).

Tuttavia, tale metodica è laboriosa e generalmente necessita di almeno cinque giorni per giungere all'individuazione del germe.

Per ridurre i tempi di identificazione della *S. Gallinarum*, sono stati sviluppati diversi

saggi molecolari tra cui un protocollo di seminested PCR validato per l'identificazione di *S. Gallinarum* che si è dimostrato particolarmente sensibile, oltre a ridurre notevolmente i tempi di analisi rispetto alle procedure standard batteriologiche (Pugliese *et al.*, 2011). Queste metodiche molecolari, tuttavia, consentono solo di valutare la positività di un campione al germe ma non permettono la quantificazione del DNA bersaglio eventualmente presente nei campioni analizzati.

In tal senso, la Real Time PCR, o PCR quantitativa (qPCR) rappresenta un valido approccio sperimentale utile per ottenere informazioni qualitative e quantitative.

Scopo di questo studio, pertanto, è stato quello di mettere a punto una strategia di qPCR sensibile e specifica, utile non solo ad identificare ma anche quantificare la carica batterica di *S. Gallinarum* presente nei campioni sottoposti ad analisi.

MATERIALI E METODI

Cepi batterici

Per la sperimentazione è stato utilizzato un ceppo di *S. Gallinarum* isolato da un allevamento di galline ovaiole nel Sud Italia, identificato attraverso saggio biochimico mediante le strip API 20E (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia), e sierotipizzato in accordo con lo schema Kauffmann-Whyte (Popoff *et al.*, 2005). Come controlli negativi sono stati utilizzati *Escherichia coli* ATCC 25922, e due ceppi di *S. enterica*, *serr.* Enteritidis e Typhimurium precedentemente isolati e caratterizzati (Camarda *et al.*, 2013).

Tutti i ceppi sono stati rivitalizzati da glicerolo, coltivati su Tryptic Soy Agar (TSA, Oxoid, Milano) ed incubati nelle condizioni ottimali per ciascuno stipite.

Estrazione del DNA batterico

L'estrazione del DNA batterico è stata effettuata a partire da colture pure, utilizzando il PureLink® Genomic DNA Kits (Life Technologies, Milano) secondo le indicazioni fornite dal produttore.

Il DNA estratto è stato quantificato mediante misurazione della densità ottica a 260 nm mediante apparato Nanodrop (Thermo Scientific, Milano). A partire da ciascun ceppo sono stati allestiti sette campioni di DNA a concentrazione scalare, come riportato in Tab. 1.

Tabella 1. Concentrazione dei sette campioni determinata mediante misurazione dell'assorbanza a 260 nm.

Campione	Concentrazione (ng/μL)
A	1,66E+00
B	3,32E-01
C	6,63E-02
D	1,33E-02
E	2,65E-03
F	5,30E-04
G	1,06E-04

I campioni sono stati utilizzati per allestire tre differenti esperimenti di qPCR. In ogni ripetizione, ciascun campione è stato esaminato in triplicato al fine di verificare la riproducibilità, specificità e sensibilità del metodo.

Real Time PCR

Gli oligonucleotidi da usare come primer sono stati disegnati per amplificare una porzione di una regione unica e non ripetuta nel genoma di *S. Gallinarum* (Thomson *et al.*, 2008), riconosciuta essere specifica e discriminante (Pugliese *et al.*, 2011), mediante software Primer3 (Untergrasser *et al.*, 2012).

Le sequenze dei primer forward (RTSGf) e reverse (RTSGr) sono rispettivamente: 5'-CCGATATGAGGGGATGTAC-3' [posizione sul genoma da 334859 a 334876] e 5'-AGGTCGTAATGAGTCAAA-3' [posizione sul genoma da 334985 a 335002].

La specificità delle sequenze è stata inizialmente testata *in silico* mediante Primer-BLAST (Ye, *et al.*, 2012).

Per garantire una maggiore specificità, come reporter è stata utilizzata una sonda interna all'amplificato.

La reazione è stata condotta in un volume finale di 10 μ L, con 1X SsoFast™ Probes Supermix with ROX (Biorad, Milano), 100 nM di ciascun primer (RTSGf e RTSGr) e 400 nM di sonda. A ciascun campione è stato aggiunto 1 μ L di campione di DNA. In ogni esperimento sono state allestite tre reazioni con acqua distillata da usare come bianco.

Tutte le reazioni sono state condotte su piattaforma ABI 7300 Real-Time PCR System (Life Technologies, Milano), con il seguente protocollo di amplificazione: una prima fase in cui i campioni sono stati sottoposti per 5 minuti a 95°C, ed in seguito a 45 cicli di denaturazione a 95°C per 30 secondi, appaiamento a 55°C per 30 secondi, estensione 65°C per 45 secondi. L'acquisizione della fluorescenza è stata impostata durante la fase di estensione. I dati sono stati poi analizzati con il Sequence Detection Software versione 1.2.3 (Life Technologies). Il ciclo soglia (Ct) è stato impostato automaticamente.

Delle sette diluizioni quattro (A, B, D, F) sono state utilizzate come standard per la costruzione della retta di taratura, mentre le restanti tre (C, E, G) sono state identificate come campioni per poter verificare l'eventuale corrispondenza tra le concentrazioni ottenute con il protocollo di qPCR con quelle quantificate mediante misurazione della densità ottica.

La retta di taratura è stata ricavata rapportando il Log10 della concentrazione contro il Ct di ogni campione, per le tre ripetizioni, attraverso interpolazione mediante metodo dei minimi quadrati, calcolando R² ed efficienza di amplificazione.

Il numero di copie di sequenze bersaglio è stato determinato, considerando che la regione amplificata è presente in singola copia nel genoma di *S. Gallinarum* e che la dimensione del cromosoma è di 4,658 Mpb, secondo l'equazione $N = (m/M) * N_A$ (N=numero di copie; m=massa in g; M=massa molare del cromosoma; N_A=Numero di Avogadro).

L'accuratezza è stata calcolata secondo l'equazione $A = 100 - (C_q - C_a) / C_a * 100$ (A=accuratezza; C_q=concentrazione misurata tramite qPCR; C_a=concentrazione misurata attraverso l'assorbanza a 260nm).

RISULTATI

Le curve di amplificazione dei sette campioni di *S. Gallinarum* sono mostrate in Figura 1.

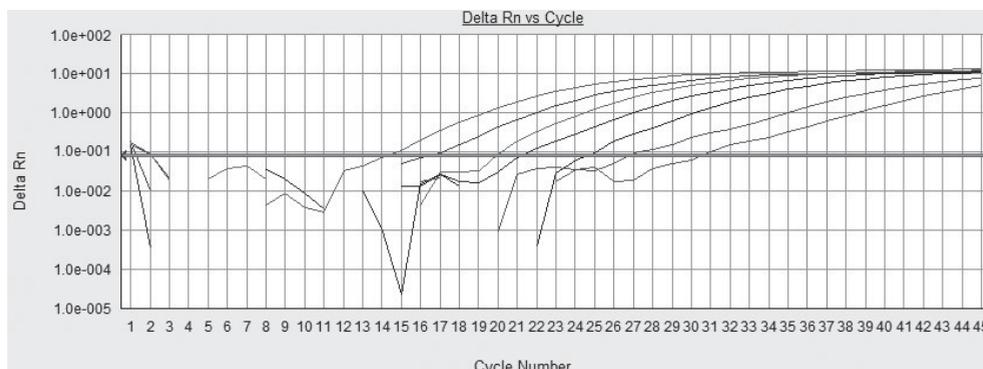


Figura 1. Diagramma di amplificazione dei campioni di *S. Gallinarum*.

L'andamento delle curve è coerente con la concentrazione dei campioni. Si nota, infatti, che il ciclo soglia aumenta in maniera inversamente proporzionale con la concentrazione dei campioni.

La retta di taratura allestita con gli standard (Fig. 2) presenta un coefficiente angolare di -3,72 e coefficiente di correlazione R_2 pari a 0,99. L'efficienza di amplificazione stimata è dell'85,7%.

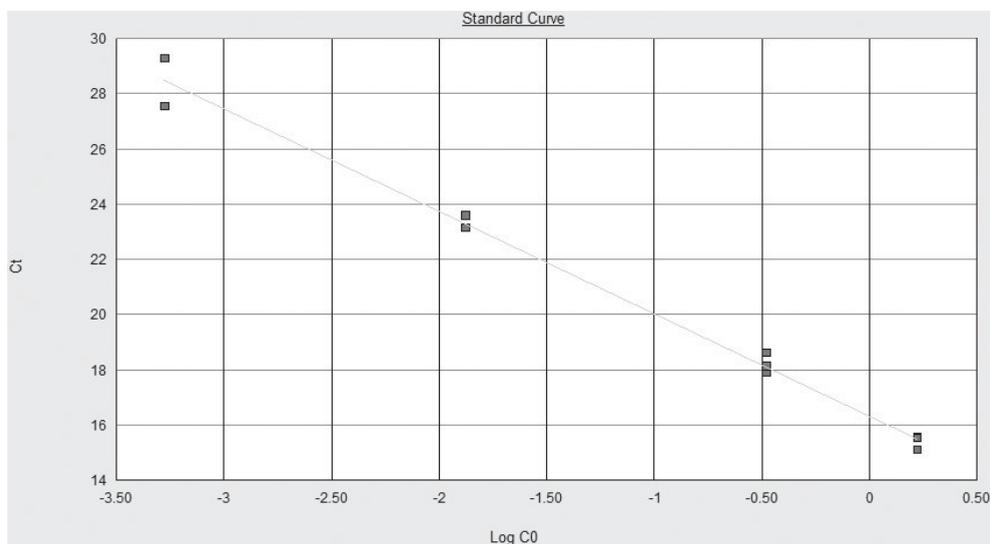


Figura 2. Retta degli standard.

Al contrario, le qPCR allestite a partire da DNA di ceppi di *E. coli*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* non evidenziano le curve di amplificazione (Fig. 3). L'analisi di specificità *in silico* non evidenzia altri potenziali amplificati tra le sequenze depositate in GenBank.

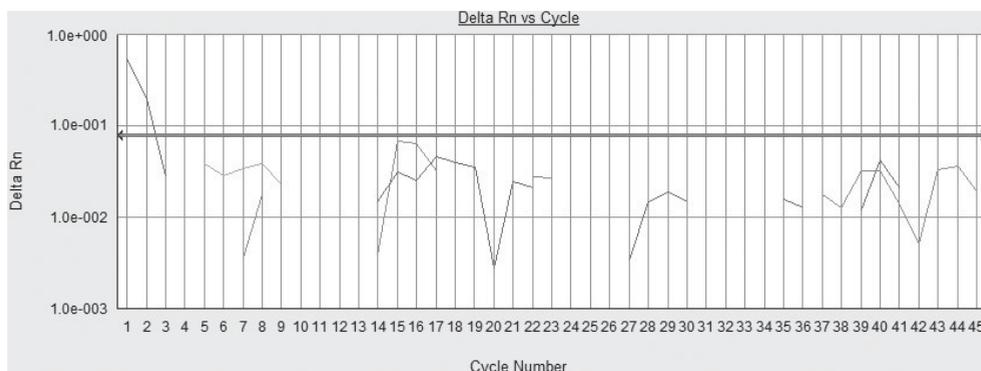


Figura 3. Diagramma di amplificazione del DNA di *E. coli*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*.

La media delle quantità di DNA per ogni campione considerato come incognito, misurata mediante qPCR, sono riportati in Tab. 2. L'accuratezza risulta essere superiore al 98%.

Tabella 2. Concentrazioni e numero di copie dei campioni considerati come incogniti

Campione	Misurazione mediante assorbanza		Misurazione mediante qPCR		Accuratezza (% sul numero di copie)
	Concentrazione (g/mL)	Numero di copie ¹ (Log ₁₀)	Concentrazione (g/mL)	Numero di copie ¹ (Log ₁₀)	
C	6,63E-2	5,12	6,10E-2	5,08	99,3
E	2,65E-3	3,72	2,75E-3	3,74	99,6
G	1,06E-4	2,32	1,17E-4	2,37	98,1

¹Calcolato sulla quantità di DNA in 1 mL

DISCUSSIONE

Alla luce dei dati ottenuti, il protocollo di qPCR descritto risulta efficace e sensibile. Esso è, infatti, in grado di rilevare quantità di DNA almeno pari a 10^{-4} ng, corrispondenti a circa 200 copie del genoma di *S. Gallinarum*. Inoltre, il protocollo risulta altamente specifico in quanto né *in silico*, né *in vitro* si ottengono amplificati aspecifici. In particolare, non si ottiene nessun amplificato da *E. coli* così come da altri serovar di *S. enterica*.

Inoltre, esso presenta ulteriori vantaggi. La possibilità di utilizzare una Ct automatica che garantisca un'elevata riproducibilità della quantificazione è un passaggio importante per una standardizzazione del metodo, in quanto non richiede una particolare elaborazione da parte dell'operatore nell'interpretazione dei dati, contribuendo all'oggettività dei dati.

Pertanto, la possibilità di disporre di un sistema oggettivo ed affidabile potrebbe consentirne l'utilizzo in ambito diagnostico, ma anche per altri scopi, tra cui il monitoraggio ambientale degli allevamenti, o per studi di trasmissibilità mediata da vettori.

Non va sottovalutato, infatti che la determinazione della carica batterica circolante può risultare particolarmente utile al fine di intervenire rapidamente per attivare misure profilattiche necessarie non solo per contenere la diffusione della malattia ma anche per evitarne l'insorgenza.

BIBLIOGRAFIA

1. Shivaprasad HL. (2003). Pullorum Disease and Fowl Typhoid, In: Saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson JR, Fadley AM, McDougald LR and Swayne DE (Eds.), *Diseases of Poultry, 11th edn.* Iowa State Press, Ames, IA, pp. 568–582.
2. OIE, 2010a. Criteria for Listing Diseases. In: OIE (World Organisation for Animal Health), Terrestrial animals health code, 19th ed., vol. I. OIE, Paris.
3. OIE, 2010b. Fowl typhoid and pullorum disease. In: OIE (World Organisation for Animal Health), Terrestrial animals health code, 19th ed., vol. II. OIE, Paris.
4. Popoff MY and Le Minor L. (1997). Antigenic formulas of the Salmonella serovars, 7th revision. Pasteur Institute, Paris.
5. ISO 6579. (2002). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Horizontal Method for the Detection of *Salmonella*. *International Organization for Standardization*, Geneva, Switzerland.
6. Pugliese N, Circella E, Pazzani C, Pupillo A and Camarda A. (2011). Validation of a seminested PCR approach for rapid detection of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum. *J. Microbiol Methods* 85, 22–27.
7. Popoff MY and Le Minor LE. (2005). Genus XXIII. *Salmonella* Lignères 1900, 389AL. In: Garrity GM, Brenner DJ, Krieg N.R and Staley JT (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, II ed., vol II The Proteobacteria, Part B, The Gammaproteobacteria.* Springer, New York, pp. 764–799.
8. Camarda A, Pugliese N, Pupillo A, Oliva M, Circella E, Dionisi AM, Ricci A, Legretto M, Caroli A and Pazzani C. (2013). Resistance Genes, Phage Types and Pulsed Field Gel Electrophoresis Pulsotypes in *Salmonella enterica* Strains from Laying Hen Farms in Southern Italy. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 10, 3347-3362.
9. Thomson NR, Clayton DJ, Windhorst D, Vernikos G, Davidson S, Churcher C, Quail MA, Stevens M, Jones MA, Watson M, Barron A, Layton A, Pickard D, Kingsley RA, Bignell A, Clark L, Harris B, Ormond D, Abdellah Z, Brooks K, Cherevach I, Chillingworth T, Woodward J, Norberczak H, Lord A, Arrowsmith C, Jagels K, Moule S, Mungall K, Sanders M, Whitehead S, Chabalgoity JA,

- Maskell D, Humphrey T, Roberts M, Barrow PA, Dougan G and Parkhill J. (2008). Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Res.* 18, 1624–1637.
10. Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M and Rozen SG. (2012). Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15):e115.
 11. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S and Madden T. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 13:134.