

# VALUTAZIONE DI UN TEST DI PCR REAL-TIME PER LA DIAGNOSI DELLE ENTERITI BATTERICHE DEL MAGRONAGGIO ED INGRASSO

## EVALUATION OF A PCR REAL-TIME TEST FOR THE DIAGNOSIS OF BACTERIAL ENTERITIS IN GROWERS AND FATTENERS

SEBASTIANI C.; CUCCO, L.; CIULLO M.; MARESCA, C.; SCOCCIA, E.;  
TARTAGLIA M.; MAGISTRALI C.F.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia*

**Parole chiave:** real time PCR, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli*, *Lawsonia intracellularis*, concordanza, specificità, sensibilità

**Key words:** real time PCR, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli*, *Lawsonia intracellularis*, agreement, specificity, sensitivity

**Riassunto:** le infezioni da *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* e *L. intracellularis* sono causa rispettivamente della dissenteria suina, spirochetosi intestinale suina e enteropatia proliferativa, malattie tipiche del periodo del magronaggio e ingrasso. Scopo di questo lavoro è stato valutare un protocollo di real-time PCR per il rilievo di *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* e *L. intracellularis* in feci suine da focolai di enterite. Dopo una valutazione della sensibilità analitica, il test di PCR real time è stato confrontato con l'esame colturale per *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* e con una nested PCR per *L. intracellularis*. L'esame colturale per *Brachyspira* e la nested PCR per *L. intracellularis* sono stati usati come gold standard per il kappa test di Cohen. Si è osservata una concordanza ottima sia per *B. hyodysenteriae* che *L. intracellularis*, e discreta per *B. pilosicoli*. I valori di sensibilità si sono collocati a 98% e 100%, quelli di specificità all'86% e 96% rispettivamente per *B. hyodysenteriae* e *L. intracellularis*. Il likelihood ratio positivo è risultato pari a 6,85 per *B. hyodysenteriae* e 25,75 per *L. intracellularis*. Non è stato possibile valutare le stesse caratteristiche per *B. pilosicoli*, a causa del basso numero di campioni positivi riscontrato. Per *B. hyodysenteriae*, il numero medio di copie di DNA rilevato nei campioni positivi all'esame colturale è stato significativamente più elevato rispetto al numero medio riscontrato nei campioni negativi all'esame colturale. Questi risultati suggeriscono l'impiego del protocollo di PCR real time nella diagnosi dell'enteropatia proliferativa, e nei casi di enterite dove si sospetti la presenza di infezioni miste.

**Abstract:** *Brachyspira hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* are the causative agents of swine dysentery, porcine spirochetosis and proliferative enteropathy, diseases that are particularly common in growers and fatteners. The aim of this study was to evaluate a PCR real time test for the detection of *B. pilosicoli*, *B. hyodysenteriae* and *Lawsonia intracellularis* in pig feces from cases of enteritis. This PCR real time test, after an assessment of analytical sensitivity, was put in comparison with bacteriological test for *B. hyodysenteriae* and *B. pilosicoli*, and with a nested PCR test for *L. intracellularis*. Culture for *Brachyspira* spp. and nested PCR for detection of *L. intracellularis* were used as gold standard for Cohen's kappa test. An almost perfect agreement was observed for both *B. hyodysenteriae* and *L. intracellularis*, while a moderate agreement was described for *B. pilosicoli*. Sensitivity was 98% and 100%, and specificity 86% and 96% for *B. hyodysenteriae* and *L. intracellularis*,

respectively. The positive likelihood ratio was 6,85 for *B. hyodysenteriae* and 25,75 for *L. intracellularis*. These characteristics could not have been evaluated for *B. pilosicoli*, due to the limited number of positive samples recorded. For *B. hyodysenteriae* the average number of DNA copies in culture-positive samples was significantly higher compared to the average number recorded in culture-negative samples. Taken together, these data strongly suggest the use of the PCR real time test for the diagnosis of proliferative enteropathy, and in cases of enteritis where the presence of multiplex pathogens is suspected.

## INTRODUZIONE

le infezioni da *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* e *L. intracellularis* sono causa rispettivamente della dissenteria suina, spirochetosi intestinale suina e enteropatia proliferativa, malattie tipiche del periodo del magronaggio e ingrasso del suino (Taylor, 1971; Trott, 1996; Gebhart, 2010). La dissenteria suina (DS), causata da *B. hyodysenteriae*, si caratterizza clinicamente per la sua particolare gravità, con episodi spesso ricorrenti, legati ad ingenti danni economici; tradizionalmente, il controllo della patologia si è basato sull'impiego di antimicrobici, ma il bando di alcune molecole nella seconda metà degli anni '90 prima, e successivamente, la diffusione di ceppi multi resistenti, hanno ostacolato il controllo della malattia (Karlsson, 2004). Attualmente l'infezione da *B. hyodysenteriae* è considerata una patologia emergente, sia in alcuni paesi europei, che negli Stati Uniti (Chander, 2012). Nelle forme croniche di malattia, la distinzione su base clinica della infezione da *B. hyodysenteriae* rispetto a quella da *L. intracellularis* o, più raramente, da *B. pilosicoli*, non è sempre immediata; e d'altra parte, l'iter diagnostico tradizionale prevede tempi piuttosto lunghi, ed è caratterizzato da una sensibilità contenuta (Willems, 2010). Inoltre, l'infezione da *B. hyodysenteriae* è spesso rilevata in concomitanza a quella di altri agenti di enterite, come *Salmonella typhimurium*, *Lawsonia intracellularis* o, meno frequentemente *B. pilosicoli*. Il riscontro di più di un agente nel corso di un singolo caso di enterite può rendere difficile l'interpretazione del dato diagnostico e a volte ostacolare il ricorso a terapie mirate (Reiner, 2011). Per questa ragione, negli ultimi dieci anni sono stati proposti protocolli diagnostici alternativi per la diagnosi eziologica di enterite: il ricorso a tecniche di PCR eseguite direttamente sul materiale fecale ha subito posto problemi in termini di sensibilità e specificità (Catanossi, 2008). Più recentemente, sono stati descritti metodi basati sull'impiego di tecnologie in real time (Willems, 2010, Akase, 2008; Song, 2009). Tali metodi offrono alcuni vantaggi rispetto alla PCR tradizionale, tra cui il minore rischio di contaminazioni crociate e la possibilità di quantificare il DNA batterico nel campione.

Scopo di questo lavoro è stato quindi quello di valutare le caratteristiche di un protocollo in PCR real time (PCR-rt) descritto in letteratura, diretto a *L. intracellularis*, *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*, su campioni provenienti da enteriti del magronaggio ed ingrasso, in parallelo con i test diagnostici tradizionali.

## MATERIALI E METODI

**Campionamento:** le feci da analizzare sono state prelevate da 121 animali, provenienti da 31 allevamenti nel corso di focolai di enterite in suini nella fase di magronaggio/ingrasso, verificatesi nel periodo settembre 2011- novembre 2012. I campioni sono stati analizzati in parallelo con le seguenti metodiche: esame colturale per *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*, PCR convenzionale per *L. intracellularis* e protocollo di PCR real-time multiplex oggetto di studio.

**Esame colturale per *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*:** è stata effettuata una semina del materiale fecale in TSA-BJ medium, seguita da incubazione a  $41,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  per almeno 5

giorni. Al termine del periodo di incubazione, è stata annotata la presenza di una eventuale emolisi. In caso di assenza di emolisi, l'esame è stato chiuso come negativo. In caso di presenza di emolisi, è stata effettuata una colorazione di Gram o con Blu Vittoria dell'area di crescita corrispondente all'emolisi, e il vetrino osservato in microscopia ottica, per il rilievo di microrganismi dalla morfologia tipica di *Brachyspira* spp. Le colonie provenienti dalle piastre positive sono state quindi sottoposte ad estrazione del DNA mediante bollitura, seguita da PCR end-point secondo il protocollo descritto da La, et al. (2006) modificando la quantità finale di Taq, specifico per le due sole specie *B. pilosicoli* e *B. hyodysenteriae*. In breve le colonie estratte mediante bollitura sono stati amplificate in un volume di reazione di 25 µl, utilizzando come concentrazione finale dNTPs 100 µM, primers *B. hyodysenteriae* 0,16 µM, primers *B. pilosicoli* 0,2 µM, 1,25 U di GoTaqFlexi DNA polymerase (Promega) con il seguente profilo di amplificazione: denaturazione iniziale a 94°C 1 min, 35 cicli a 94°C 30 sec, 58°C 90 sec e 68°C 2 min, estensione finale a 68°C 10 min, In caso di negatività, l'esame è stato chiuso come negativo.

*PCR convenzionale per Lawsonia intracellularis*: Il DNA è stato estratto dai campioni fecali, utilizzando il kit QIAamp DNA Stool Mini kit (Qiagen) a partire da 200 mg di feci. I DNA estratti sono stati sottoposti a PCR end-point secondo il protocollo descritto da Jones et al (1993). In breve, gli estratti sono stati amplificati tramite PCR nested: in ogni step la reazione è stata condotta in un volume di 25 µl utilizzando come concentrazione finale dNTPs 250 µM, primer LawA/LawB e LawC/LawD, 0,1 µM, 1,25 U di GoTaqFlexi DNA polymerase (Promega). I profili di amplificazione utilizzati sono stati: 1° step, denaturazione iniziale a 95°C 2min, 35 cicli a 95°C 20 sec, 55°C 20 sec e 72°C 30 sec, estensione finale a 72°C 10 min; 2° step, denaturazione iniziale a 95°C 2 min, 35 cicli a 93°C 30 sec, 55°C 20 sec e 72°C 30 sec, estensione finale a 72°C 3 min. I prodotti di amplificazione sono stati separati tramite elettroforesi su gel d'agarosio al 2% in tampone TBE.

*Messa a punto del test in PCR real-time*: campioni di feci negativi per i tre patogeni oggetto del presente lavoro, sono stati contaminati con differenti quantità note di *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* e *Lawsonia intracellularis*. Per le due specie di *Brachyspira* gli isolati sono stati quantizzati utilizzando lo standard 0,5 McFarland corrispondente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml; 200mg di feci sono stati contaminati con quantità note di cellule batteriche da  $2 \times 10^7$  UFC a  $2 \times 10^3$  UFC. Per *Lawsonia intracellularis* è stato utilizzato un vaccino (Enterisollleitis, Bohringer Ingelheim), risospeso in 10 ml di acqua in modo da ottenere circa  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/0,2 ml (TCID<sub>50</sub>=Tissue Culture infectious dose); 200 mg di feci sono stati contaminati con  $0,5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^5$  e  $2 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>. Il DNA è stato estratto dal vaccino con il kit QIAamp DNA mini kit da 200 µl di campione.

*PCR Real-time multiplex*: i DNA estratti dalle colture batteriche, dal vaccino di *L. intracellularis* e dai campioni fecali contaminati con *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* e *Lawsonia intracellularis* sono stati analizzati tramite PCR real-time multiplex come descritto da Willems H., et al (2010), al fine di validare il protocollo. I primers e le sonde utilizzate sono dirette all'amplificazione del gene *nox* per *Brachyspira* e del gene *aspA* per *L. intracellularis*. La reazione, condotta in un volume finale di 25µl, era costituita da 12,5µl di Quantitect Multiplex Mastermix (Qiagen), primers e sonde (0,18-0,3 µM) e 2,5µl di DNA target. Per l'analisi quantitativa, gli standard per le curve di taratura sono stati ottenuti, per ciascun patogeno, attraverso l'amplificazione delle regioni genomiche target della PCR-rt; gli amplificati sono stati poi purificati con il kit QIAquick PCR purification kit (Qiagen), quantizzati spettrofotometricamente ed è stato successivamente calcolato il numero di copie di DNA corrispondente. Per ognuno dei tre patogeni in esame le curve di taratura erano costituite da diluizioni scalari in base 10 (da  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^2$  copie di DNA). Le reazioni

sono state eseguite utilizzando piattaforma 7900 HT SequenceDetection System (Life Technologies).

*Elaborazione statistica:* per quanto riguarda gli accertamenti per *Brachyspira hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*, è stata valutata la concordanza tra l'esame batteriologico, assunto come gold standard e la PCR Real-time, per *Lawsonia intracellularis*, la concordanza è stata effettuata tra PCR tradizionale, assunta come gold standard, e la PCR Real-time. Il test utilizzato è il test K di Cohen valutato secondo la scala di Altman. Per le prove di PCR real-time per *B. hyodysenteriae* e *L. intracellularis* sono state inoltre calcolate la specificità e la sensibilità e l'indice di Youden, che fornisce una valutazione aggregata di sensibilità e specificità. Sulle stesse basi, e' stato definito il likelihood ratio positivo (LH+) e negativo (LH-) ed attraverso il LH+ è stata calcolata la probabilità post test, cioè la probabilità di trovare un maggior numero di campioni positivi con la PCR real Time rispetto al solo esame colturale (Thrusfield, 2005) Per quanto riguarda i dati quantitativi, sempre riferiti a *B. hyodysenteriae* e *L. intracellularis*, è stato valutato il numero di copie rilevate con la PCR real time rispetto al risultato ottenuto con l'esame batteriologico. L'ipotesi saggiata è che il numero di copie riscontrate con PCR real time con esame batteriologico positivo sia maggiore del numero di copie riscontrate quando l'esame batteriologico è risultato negativo. Dall'elaborazione sono stati esclusi i campioni che risultavano non quantizzabili (due, entrambi per *L. intracellularis*). La differenza è stata valutata con il t di Student utilizzando l'approssimazione di Welch.

## RISULTATI

*PCR real-time: efficienza e sensibilità analitica* L'efficienza della PCR Real-time multiplex è stata calcolata mediante l'utilizzo di diluizioni seriali in base 10 (da 10<sup>2</sup> a 10<sup>6</sup> copie di DNA). Le pendenze delle curve di taratura sono risultate pari a -3,42 (*B. hyodysenteriae*), -3,48 (*B. pilosicoli*) e -3,49 (*L. intracellularis*) che corrispondono ad efficienze del 96%, 93,7% e 93,4%, rispettivamente. I limiti di rilevabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) sono stati calcolati analizzando varie diluizioni di DNA estratto da campioni di feci contaminate con quantità note dei tre patogeni. Ogni diluizione è stata analizzata in 10 replicati. In questo caso il LOD corrisponde alla minima concentrazione di analita a livello della quale si ottiene segnale nel 100% dei replicati. Il LOQ corrisponde alla diluizione in corrispondenza della quale il valore di RSD (Deviazione Standard Relativa) risulta minore o uguale a 25. I valori di LOD e LOQ ottenuti per *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* e *L. intracellularis* espressi sia come numero di copie di DNA sia come UFC (o TCID<sub>50</sub> per *L. intracellularis*) sono riportati nelle Tabelle 1 e 2.

**Tabella 1: sensibilità analitica della PCR real-time. Sono indicati il LOD e il LOQ espressi come numero di copie di DNA/g feci**

*Table 1: analytic sensitivity of the PCR real-time test. LOD and LOQ are expressed as number of DNA copies/g of feces*

	<i>B. hyodysenteriae</i>	<i>B. pilosicoli</i>	<i>L. intracellularis</i>
LOD (copie)	7	172	28
LOQ (copie)	7	344	225
LOD (copie/gr feci)	2,8X10 <sup>3</sup>	6,9X10 <sup>4</sup>	11,2x10 <sup>3</sup>
LOQ (copie/gr feci)	2,8X10 <sup>3</sup>	1,4X10 <sup>5</sup>	9X10 <sup>4</sup>

**Tabella 2: sensibilità analitica della PCR real-time. Sono indicati il LOD e il LOQ espressi come UFC/g feci (*Brachyspira*) e come TCID<sub>50</sub>/g feci (*L. intracellularis*)**

**Table 2: analytic sensitivity of the PCR real-time test. LOD and LOQ are expressed as number of UFC/g of feces (*Brachyspira*), and TCID<sub>50</sub>/g of feces (*L. intracellularis*)**

	<i>B. hyodysenteriae</i>	<i>B. pilosicoli</i>		<i>L. intracellularis</i>
LOD (UFC )	31,25	45	LOD (TCID <sub>50</sub> )	0.31x10 <sup>-1</sup>
LOQ (UFC )	31,25	90	LOQ (TCID <sub>50</sub> )	0.125
LOD (UFC /gr feci)	1,25X10 <sup>4</sup>	1,8X10 <sup>4</sup>	LOD (TCID <sub>50</sub> /gr feci)	12.4
LOQ (UFC/gr feci)	1,25X10 <sup>4</sup>	3,6X10 <sup>4</sup>	LOQ (TCID <sub>50</sub> /gr feci)	50

L'efficienza della procedura d'estrazione è stata calcolata per valutare l'effetto matrice (feci), comparando la sensibilità ottenuta per i campioni fecali contaminati con i batteri o con il vaccino in confronto con i batteri o il vaccino puri, estratti senza feci. Le perdite dovute all'effetto matrice, valutate confrontando i risultati ottenuti in PCR real-time dai DNA estratti dalle feci contaminate e dai batteri/vaccino senza feci, sono risultate inferiori a un ordine di grandezza per ciascuno dei tre patogeni oggetto di studio, in accordo con la letteratura.

E' stata dimostrata l'assenza di inibitori nel DNA estratto dalle feci contaminate attraverso l'analisi in PCR real-time del DNA tal quale e di una sua diluizione 1:4, le cui curve di amplificazione avevano unDCt=2 come atteso.

I risultati relativi agli accertamenti per *B. hyodysenteriae* in PCR real time e con colturale tradizionale sono espressi in tabella 3, mentre quelli relativi a *B. pilosicoli* sono descritti in tabella 4. In tabella 5 sono infine indicati gli esiti dei test per *L. intracellularis*, in PCR tradizionale e in real time PCR.

**Tabella 3: risultati degli accertamenti per *B. hyodysenteriae* con metodo colturale e PCR real-time**

**Table 3: Detection of *B. hyodysenteriae* in pig fecal samples by culture and by PCR real time**

PCR real-time	Esame colturale		Totale
	Negativi	Positivi	
<b>Negativi</b>	60	1	61
<b>Positivi</b>	10	46	56
<b>Totale</b>	70	47	117

**Tabella 4: risultati degli accertamenti per *B. pilosicoli* con metodo culturale e PCR real-time***Table 4: Detection of B. pilosicoli in pig fecal samples by culture and by PCR real time*

PCR real-time	Esame culturale		Totale
	Negativi	Positivi	
<b>Negativi</b>	114	1	115
<b>Positivi</b>	1	1	2
<b>Totale</b>	115	2	117

**Tabella 5: risultati degli accertamenti per *Lawsonia intracellularis* con PCR e PCR real time***Table 5: Detection of L. intracellularis in pig fecal samples by PCR and by PCR real time*

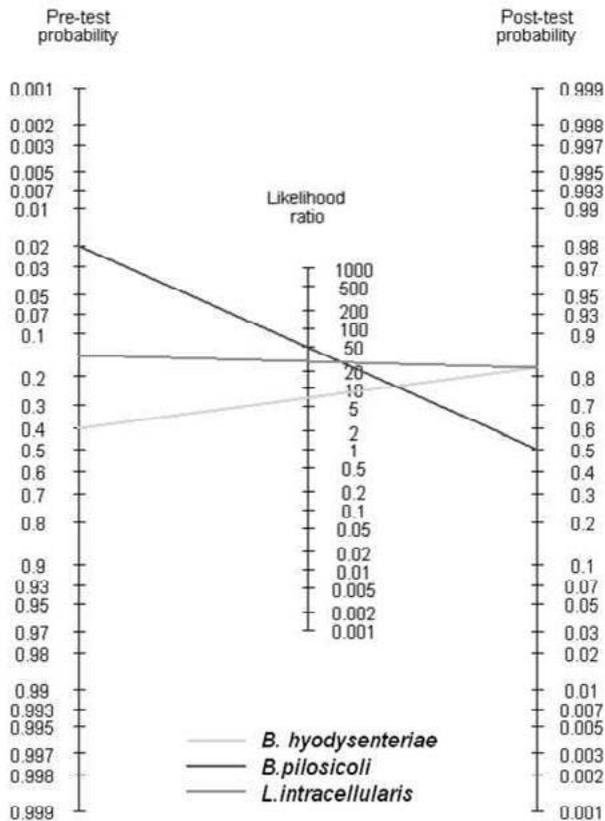
PCR real time	PCRLAW		Totale
	Negativi	Positivi	
<b>Negativi</b>	99	0	99
<b>Positivi</b>	4	18	22
<b>Totale</b>	103	18	121

Per quanto riguarda *B. hyodysenteriae*, il grado di concordanza osservato delle due prove è pari al 91% (accordo casuale 50%). Inoltre il valore della statistica Kappa è pari a 0,81 (IC95%: 0,63-0,99), concordanza ottima secondo la scala di Altman. La sensibilità della real-time qualitativa per *B. hyodysenteriae* è pari al 98% (IC95%: 89%-100%), la specificità è dell'86% (IC95%: 75%-93%). L'indice di Youden è risultato pari a 0,84 (I.C.95% 0,74-0,93). Il likelihood ratio positivo (LH+) è di 6,85 e quello negativo (LH-) è di 0,02. La probabilità pre-test è del 40% (tramite esame batteriologico), applicando la PCR real time agli stessi campioni la probabilità di trovare campioni positivi passa all'82%. La media delle copie riscontrate con esame batteriologico negativo è di 4316 copie (DS: 15035) e la media delle copie riscontrate con esame batteriologico positivo è di 42883 (DS: 101478). La differenza tra le medie, è risultata statisticamente significativa ( $p=0,0065$ ).

I dati relativi a *B. pilosicoli* indicano un grado di concordanza osservato delle due prove pari al 98%, quasi uguale all'accordo casuale, 97%, Il valore Kappa è pari a 0,49 (IC95%: 0,31-0,67), concordanza discreta secondo la scala di Altman. Il basso numero di campioni positivi riscontrati per questo patogeno nel campione di feci esaminato non hanno permesso di effettuare ulteriori elaborazioni.

Infine, per *Lawsonia intracellularis* il grado di accordo che ci si aspetterebbe se le due prove fossero fatte in maniera casuale è del 72%, ma il grado di concordanza osservato è molto più alto (97%). Inoltre il valore Kappa è pari a 0,88 (IC95%: 0,70-1), concordanza

ottima secondo la scala di Altman. La sensibilità e la specificità sono risultate pari rispettivamente al 100% e al 96% (IC95%: 90%-99%), l'indice di Youden pari al 0,96 (IC95%: 0,92-1). Il LR positivo è risultato pari a 25,75 e il LR negativo pari a 0. La probabilità pre-test è del 15% e risulta dell'82% nel post test. Per quanto riguarda l'elaborazione dei dati quantitativi, la media delle copie riscontrate con PCR negativo è di 50 copie (DS: 434) e la media delle copie riscontrate con PCR positivo è di 3503334 (DS: 6718553). La differenza tra le medie, è risultata statisticamente significativa ( $p=0,0205$ ).



**Fig. 1:** probabilità pre-test e post-test  
**Fig. 1:** pre-test and post- test probability

## DISCUSSIONE

La determinazione dei parametri analitici di efficienza e sensibilità dei test in PCR real-time è un elemento importante per potere comparare protocolli pubblicati da differenti autori. Per quanto riguarda i dati di sensibilità analitica ottenuti nella fase di messa a punto della PCR real-time, essi sono risultati simili a quelli indicati da Willems (2010): ad esempio, il valore di LOQ indicato per *B. hyodysenteriae* si collocava a 8000 cellule/g di feci, molto vicino alle 10 000 cellule/g di feci stimate nel corso di questo lavoro. Una sensibilità inferiore, pari a circa

un logaritmo, si è invece osservata per *B. pilosicoli*. I dati di confronto tra il protocollo di PCR real-time e tecniche diagnostiche tradizionali applicati ai campioni di feci permettono di fornire indicazioni pratiche rispetto all'impiego di questa metodica. Innanzitutto, per quanto riguarda *B. hyodysenteriae*, il nuovo test presenta un grado di concordanza ottimo rispetto all'esame colturale; la sensibilità in particolare appare elevata (98%), consentendo un valore di likelihood ratio di 6.85 e in un'ultima analisi, un aumento moderato della sensibilità pre-test. Più contenuto, il valore riferito alla specificità (86%), legato alla presenza di campioni positivi in PCR real time risultati negativi all'esame batteriologico. L'indice di Youden, che consente una valutazione complessiva di sensibilità e specificità, è di 0,84 confermando le buone performance del protocollo in PCR real time.

Per quanto riguarda il riscontro di campioni negativi all'esame batteriologico e positivi in PCR real time, la maggior parte proveniva da focolai di enterite in cui *B. hyodysenteriae* era stata isolata da altri animali, mentre alcuni di essi era caratterizzato da un numero di copie basso. E' quindi possibile ipotizzare che per questi campioni il batteriologico abbia fornito un esito falsamente negativo. Questa ipotesi sembra essere confermata dal confronto del numero di copie di DNA rilevate nei campioni negativi all'esame colturale, rispetto a quelle riscontrate nei campioni positivi. Per quanto riguarda *B. pilosicoli*, il grado di concordanza tra le metodiche tradizionali e il protocollo in real time è solo discreto nella scala di Altman; tuttavia, il basso numero di campioni positivi per questo patogeno riscontrato nel corso di questo lavoro ostacola di fatto il confronto tra i test.

Infine, i dati riferiti a *L. intracellularis* descrivono valori di concordanza molto elevati, ottimi in base alla scala di Altman, con valori di sensibilità e specificità prossimi al 100% e indice di Youden di 0,96: forse a motivo della somiglianza tra i test, entrambi di tipo biomolecolare, effettuati direttamente sulle feci, e diretti allo stesso gene. Tuttavia, anche in questo caso, il protocollo di PCR real time permette di aumentare considerevolmente la probabilità pre-test.

Complessivamente, i dati riferiti al protocollo in PCR real time per i due patogeni *B. hyodysenteriae* e *L. intracellularis*, confrontati con le metodiche di tipo tradizionale, rivelano degli ottimi dati di concordanza e un aumento della possibilità pre-test, a differenza di quanto osservato in passato per protocolli in multiplex PCR (Catanossi, 2008). Il protocollo in real time presenta alcuni vantaggi nella routine diagnostica: è di esecuzione molto più rapida rispetto al colturale ed è meno soggetto a contaminazioni rispetto alla PCR convenzionale. Inoltre, rispetto all'esame batteriologico, il test si può applicare in campioni in stato di conservazione non ottimale. Il rilievo di più di un patogeno nella stessa reazione permette infine l'identificazione di infezioni miste, particolarmente frequenti nelle nostre realtà, a costi analitici contenuti.

## CONCLUSIONI

Nel presente lavoro, il protocollo di PCR real time per *L. intracellularis* e *B. hyodysenteriae* ha dimostrato ottimi gradi di concordanza e performance diagnostiche pari o superiori rispetto ai test tradizionali: per *L. intracellularis* in particolare, potrebbe essere valutata una definitiva adozione della PCR real time. L'esame colturale per *Brachyspira* presenta tuttavia alcune caratteristiche che lo rendono ancora non sostituibile nella pratica diagnostica: in primo luogo, la possibilità di disporre del batterio isolato per la valutazione della resistenza agli antimicrobici ed in secondo luogo la capacità di individuare altre specie di *Brachyspira* potenzialmente patogene. Tuttavia, la PCR real time trova applicazione nei casi in cui sia necessaria una diagnosi rapida, o qualora, in allevamenti infetti, si necessiti di una conferma e infine negli studi epidemiologici. Inoltre, la possibilità di quantificare i batteri presenti all'interno del campione sta aprendo nuove strade nel campo della diagnosi delle enteriti. Infatti è stata dimostrata una correlazione tra la gravità dei sintomi e la quantità di *L. intracellularis* escrete nelle feci (Guedes, 2003) e tale associazione è stata supposta anche per *B. hyodysenteriae* (Reiner, 2011). Un test in grado di quantificare la carica

batterica fecale potrà quindi permettere di disporre di criteri interpretativi nel caso di infezioni miste e subcliniche e in ultima analisi, di adottare misure di controllo più mirate ed efficaci.

## BIBLIOGRAFIA

- Akase S, Uchitami, Y.; Sohmura, Y., Tatsuta K.; Sadamasu, K.; Adachi Y. *Application of real time PCR for diagnosis of Swine Dysentery.* J Vet Med Sci. 2009 Mar;71(3):359-62.
- Catanossi, M.; Crotti, S.; Marenzoni M.L.; Sensi M.; Maresca C. Tentellini, M.; Valente, C.; Magistrali, C.F. (2008) *Concordanza tra diversi metodi per la diagnosi delle enteriti batteriche del magronaggio e ingrasso della specie suino.* Atti SIPAS 2008: 133-144.
- Chander, Y; Primus, A.; Oliveira A.; Gebhart C.J. (2012) *Phenotypic and molecular characterization of a novel strongly hemolytic Brachyspira species, provisionally designated "Brachyspira hamptonii".* J. Vet Diagn Invest. 2012 Sep;24(5):903-10.
- Gebhart CJ, Guedes RMC. In: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 4. Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, editor. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA; 2010. *Lawsonia intracellularis*; pp. 503–509.
- Guedes, R.M.; Winkelman, N.L.; Gebhart, C.J. (2003) *Relationship between the severity of porcine proliferative enteropathy and the infectious dose of Lawsonia intracellularis*, Vet Rec 153: 432-433.
- Karlsson M, Aspán A, Landén A, Franklin A. (2004) *Further characterization of porcine Brachyspira hyodysenteriae isolates with decreased susceptibility to tiamulin.* J Med Microbiol. 53:281-285.
- La, T. ; Collins, A.M.; Phillips, N.D.; Oksa, A. and D.J. Hampson (2006) *Development of a multiplex-PCR for rapid detection of the enteric pathogens Lawsonia intracellularis, Brachyspira hyodysenteriae, and Brachyspira pilosicoli in porcine faeces.* Letters in applied microbiology 42 (2006) 284-288.
- Jones G.F., Ward G.E., Murtaugh M.P., Lin G., Gebhart C.J. *Enhanced Detection of Intracellularis Organism of Swine Proliferative Enteritis, Ileal Symbiont Intracellularis, in Feces by Polymerase Chain Reaction.* Journal of Clinical Microbiology, (1993) 31 :2611-2615.
- Reiner G, Hillen S, von Berg S, Kixmöller M, Willems H. (2011) *Analysis of bacterial load and prevalence of mixed infections with Lawsonia intracellularis, Brachyspira hyodysenteriae and/or Brachyspira pilosicoli in German pigs with diarrhoea.* Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 124(5-6):236-41.
- Sheskin D.J. *Handbook of Parametric and Nonparametric Statistical Procedures.* Chapman and HAL/CRC ed. Fourth Edition, 2004.
- Song Y, Hampson, D.J. *Development of a multiplex qPCR for detection and quantitation of pathogenic intestinal spirochaetes in the faeces of pigs and chickens.* Vet Microbiol 2009 May 28;137(1-2):129-36.
- Taylor DJ, Alexander TJ (1971) *The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete.* Br Vet J. 1971 Nov;127(11):58-61.
- Trott D. J., Stanton T. B., Jensen N. S., Duhamel G. E., Johnson J. L., Hampson D. J. (1996) *Serpulina pilosicoli sp. nov., the agent of porcine intestinal spirochetosis.* Int. J. Syst. Bacteriol. 46:206–215.
- Thrusfield, M. *Veterinary Epidemiology.* Blackwell publishing. Third edition – 2005.
- Willems H, Reiner G. *A multiplex real-time PCR for the simultaneous detection and quantitation of Brachyspira Hyodysenteriae, Brachyspira pilosicoli and Lawsonia intracellularis in pig faeces.* Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift (2010)123 (5-6): 205-209