

# Diagnostikk av *Dichelobacter nodosus* ved Veterinærinstituttet

JANNICE SCHAU SLETTEMEÅS<sup>1</sup>, BJARNE BERGSJØ<sup>1</sup>, MARIANNE SUNDE<sup>1</sup>, ANNETTE KAMPEN<sup>2</sup> OG BERIT DJØNNE<sup>1</sup>

Seksjon for Bakteriologi/Veterinærinstituttet <sup>1</sup>, Seksjon for Husdyrhelse og velferd/Veterinærinstituttet<sup>2</sup>,

## Bakgrunn

Våren 2008 ble det for første gang siden 1948 påvist smittsom klauvsjuka eller fotråte hos sau som skyldes bakterien *Dichelobacter nodosus* i Norge. *D. nodosus* er årsak til smittsom klauvsjuka hos sau, men storfe og geit kan også bli smittet (Faktaark fra Veterinærinstituttet). Sjukdommen smitter ved kontakt mellom dyr, og bakteriene kan overleve noen dager i miljøet. I dype sprekker i kronisk infiserte klauver kan bakterien overleve i årevis.

## Dyrkning av *Dichelobacter nodosus*

Prøver tas fra klauvene ved hjelp av en trepinne som sendes laboratoriet i et kulltransportmedium. Dyrking av prøver for påvisning av *D. nodosus* blir utført på særskilt klauvagare med et høyt innhold av agar og oppmalt saueklauv under anaerobe forhold ved 37 °C (Moore et al). Prøvemateriale sås ut med trepinnen ved at man forsiktig risper i agaren og lager et rutenett. Skålene avleses etter noen døgn inkubering. *D. nodosus* har en karakteristisk vekst med flate kolonier som sprer seg i vifteform utover agaren (Bergey's manual). Koloniene har en matt, skimrende overflate med perlemorsglans. Reindyrking og isolering av karakteristiske kolonier utføres på Fastidious Anaerobic (FA) agar.

Typiske kolonier mikroskoperes ved fasekontrast. *Dichelobacter* er slanke Gram-negative stavbakterier med litt oppsvulming i endene og gjerne en lett knekk eller bøy på midten.

## Påvisning av *Dichelobacter nodosus* ved 16S rRNA PCR

### DNA ekstraksjon

DNA ekstraheres fra trepinner som oppbevares i PBS (phosphate buffered saline) med 20 mM EDTA pH 8 ved hjelp av DNA isoleringskitet NucleoSpin® Blood (Macherey-Nagel) (Moore et al). Prøvemateriale tines, spinnes raskt og 200 µl brukes til ekstraksjonen. Videre følges instruksjoner fra leverandøren.

Som positiv kontroll på PCR amplifisering brukes ekstrahert DNA fra tpepestamme *D. nodosus* ATCC 25542. Celler skrapes fra en agarplate, resuspenderes i 200 µl milliQ vann og kokes i 5 minutter.

### **16S rRNA PCR analyse av *D. nodosus***

16S rRNA PCR utføres med utkøkt materiale eventuelt skrap fra skål av renkultivert *D. nodosus*, eller med ekstrahert DNA som templat. Hver PCR kjøring inkluderer tre amplifiseringskontroller; én positiv kontroll fra en renkultur av tpestamme *D. nodosus* ATCC 25542, én negativ kontroll med rent milliQ vann og én isoleringskontroll der det ekstraheres DNA fra PBS eller rent vann.

Artsspesifikke primere som brukes er C (5'TCGGTACCGAGTATTCTACCCAACACCT 3') og Ac (5'CGGGTTATGTAGCTTGC 3') (Moore et al). Disse primerne gir et produkt på 783 bp.

Reaksjonsblandingen på totalt 25 µl inneholder 12,5 µl 2x ThermoStart Master Mix med 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (AB gene), 3 µl 0,1 % BSA, 0,625 µl av hver primer (10 pmol/µl) og 1 µl DNA templat. Aktivering av ThermoStart DNA polymerasen ved 95 °C i 15 minutter fulgt av 10 sykler 95 °C (10 s), 50 °C (10 s) og 72 °C (1 minutt), 15 sykler 95 °C (10 s), 55 °C (10 s) og 72 °C (1 minutt), og 20 sykler 95 °C (10 s), 60 °C (10 s) og 72 °C (1 minutt). Til slutt elongering ved 72 °C i 7 minutter.

### **Påvisning av *intA* genet hos *Dichelobacter nodosus***

#### **Bakgrunn**

Det finnes forskjellige stammer av *D. nodosus* med varierende sjukdomsfremkallende egenskaper eller virulens (Faktaark for fagpersonell fra Veterinærinstituttet). Gelatin gel testen for påvisning av termostabile serine proteaser er under etablering ved seksjonen (Palmer). Bakgrunnen for gelatin gel testen er at proteaser som utskilles fra virulente stammer er mer termostabile enn de som skilles ut fra benigne. Cheetham et al (2005) fant at det var noen falske positive stammer i gelatin gel testen, som kan føre til unødvendig karantene (Cheetham et al). De fant at det var en sterk korrelasjon mellom tilstedeværelsen av *intA* genet og virulens, og fravær av *intA* genet og benign fostråte (Cheetham et al). *intA* genet er en integrase som tilhører et gencluster som er assosiert med virulens og som kan integreres inn i kromosomet til *D. nodosus* (Cheetham et al). Man kan isolere ulike stammer av *D. nodosus* fra besetninger med fostråte. Sauer fra besetninger med virulent fostråte kan også være bærere av benigne stammer.

#### ***intA* PCR analyse av *D. nodosus* for påvisning av virulens**

Duplex PCR brukes for påvisning av *intA* og husholdningsgenet *pnpA*. Amplifiseringen av *intA* genet er mer sensitiv enn amplifiseringen av *pnpA* genet, dette for å unngå falske negative som et resultat av utilstrekkelig mengde med mål DNA i prøven. Duplex PCR utføres på køkt materiale eller skrap fra skål av renkultur av *D. nodosus*. Hver PCR kjøring inneholder tre

amplifiseringskontroller; DNA ekstrahert fra tpeestamme *D. nodosus* ATCC 27521 som inneholder både *intA* og *pnpA*, DNA ekstrahert fra en *intA* negativ, men *pnpA* positiv stamme, og en negativ kontroll med milliQ vann.

For amplifisering av deler av *intA* genot brukes primerne *intA.F* (5' ACATCATGCGACTCACTGAC 3') og *intA.R* (5' TCTCTGGTCGGTCGTACAAT 3'), mens primere for amplifisering av deler av *pnpA* genot er *pnpA.F* (5' ACCGAACAGACGGGAACAAC 3') og *pnpA.R* (5' CGCGTACATCATTAACCCG 3') (Cheetham et al). Primerne gir produkter på henholdsvis 530 bp for *intA* og 300 bp for *pnpA*.

Reaksjonsblandingen på totalt 25 µl inneholder 12,5 µl 2x ThermoStart master mix med 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (AB gene), 1 µl av hver primer (10 pmol/µl) og 3 µl DNA templat. Aktivering av ThermoStart DNA polymerasen ved 95 °C i 15 minutter fulgt av 30 sykler 95 °C (30 s), 60 °C (30 s) og 72 °C (1 minutt). Til slutt elongering ved 72 °C i 7 minutter.

## Serogruppe spesifikk PCR av *Dichelobacter nodosus* stammer

### Bakgrunn

Bakteriecellene har et stort antall polare fimbrier eller pili (tilheftingstråder) tilhørende type IV familien. Disse fimbriantigenene er immunogene og danner grunnlaget for inndeling av bakterien i klasser og serogrupper (Bergey's manual, Billington et al). Fimbrie subenheten er den eneste virulensfaktoren som har vist seg å være essensiell for virulens (Bergey's manual). Antigenet variasjoner blant stammer av *D. nodosus* ble først observert av Beveridge i 1941 ved bruk av slide agglutineringsstest (Dhungyel et al). Fimbriene hos *D. nodosus* er lange kjeder komponert av en enkel pilin subenhet som kodes for av *fimA* genot (Billington et al). Variasjon i DNA sekvensen i *fimA* genot gir antigen variasjon i fimbriene til *D. nodosus* (Dhungyel et al). Dette gir grunnlag for klassifisering av *D. nodosus* isolater i 10 serogrupper A, B, C, D, E, F, G, H, I og M. Det er meget sannsynlig at mer enn en serogruppe er til stede i besetninger med fotråte (Dhungyel et al).

### *fimA* PCR for serogruppering av *D. nodosus*

Multiplex PCR brukes for påvisning av ni ulike serogrupper (A til I) og kan utføres både på kultur og på ekstrahert DNA. Totalt tre multiplex PCR amplifiseringer utføres, se tabell 1 for primeroversikt.

Reaksjonsblandingen på totalt 25 µl inneholder 12,5 µl 2x HotStarTaq Master Mix (Qiagen) med 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 µl 0,1 % BSA, 1,5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 µl forward primer FP (bruksløsning 10 pmol/µl), 1 µl revers primer mix RA-RB-RC/RD-RE-RF/RG-RH-RI (bruksløsning 10 pmol/µl av hver primer). Som

templat tilsettes 1 µl av utkøkt DNA og opptil 4 µl av ekstrahert DNA. Aktivering av HotStarTaq DNA polymerasen ved 95 °C i 15 minutter fulgt av 5 syklar 95 °C (30 s), 60 °C (30 s) og 72 °C (30 s), 25 syklar 95 °C (30 s), 58 °C (30 s) og 72 °C (30 s). Til slutt elongering ved 72 °C i 4 minutter.

Tabell 1. Detaljer for forward primer og serogruppe-spesifikke revers primere benyttet i PCR undersøkelsen, tabell hentet fra Dhungyel OP et al (2002).

Primer name	Nucleotide sequence	Position in <i>fimA</i>	Product size (bp)	GenBank name accession number
FP	5' CCTTAATCGAACTCATGATTG 3'	26–46	–	X52403
RA	5' AGTTTCGCCTTCATTATATTT 3'	421–441	415	X52403
RB	5' CGGATCGCCAGCTTCTGTCTT 3'	286–309	283	X52404
RC	5' AGAAGTGCCTTTGCCGTATTC 3'	331–351	325	X52405
RD	5' TGCAACAATATTTCCCTCATC 3'	325–345	319	X52389
RE	5' CACTTTGGTATCGATCAACTTGG 3'	367–389	363	X52407
RF	5' ACTGATTTCCGGCTAGACC 3'	250–267	241	X52408
RG	5' CTTAGGGTAAGTCTGCAAG 3'	283–305	279	X52409
RH	5' TGAGCAAGACCAAGTAGC 3'	412–435	409	X52390
RI	5' CGATGGGTGATCATCTGGACC 3'	194–215	189	X52410

## Kommentar

Eventuelle oppdaterte resultater vil legges frem under Husdyrforsøksmøtet 2009.

## Referanser

Moore LJ, Wassink GJ, Green LE, Grogono-Thomas R. 2005. The detection and characterisation of *Dichelobacter nodosus* from cases of ovine footrot in England and Wales.

Cheetham BF, Tanjung LR, Sutherland M, Druitt J, Green G, McFarlane J, Bailey GD, Seaman JT, Katz ME. 2006. Improved diagnosis of virulent footrot using *intA* gene.

Dhungyel OP, Whittington RJ, Egerton JR. 2002. Serogroup specific single and multiplex PCR with pre-enrichment and immuno-magnetic bead capture for identifying strains of *D. nodosus* in sheep with footrot prior to vaccination.

Billington SJ, Johnston JL, Rood JI. 1996. Virulence regions and virulence factors of the ovine footrot pathogen, *Dichelobacter nodosus*.

Palmer MA. 1993. A gelatine test to detect activity and stability of proteases produced by *Dichelobacter (bacteroides) nodosus*.

Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, Second edition, Volume Two The Proteobacteria, Part B The Gammaproteobacteria. S 126-129.

Faktaark: Smittsom klauvsjuka – fotråte hos sau (for fagpersonell).

<http://www.vetinst.no/index.php/nor/Faktabank/Alle-faktaark/Smittsom-klauvsjuka-fotraate-hos-sau-for-fagpersonell>

Faktaark: Smittsom klauvsjuka – fotråte hos sau.

<http://www.vetinst.no/index.php/nor/Faktabank/Alle-faktaark/Smittsom-klauvsjuka-fotraate-hos-sau>