

Ruolo eziologico di *Clostridium difficile* nelle enteropatie del coniglio osservate in allevamenti da reddito in Italia

Bano L.¹, Busani L.², Cocchi M.¹, Drigo I.¹, Grilli G.³, Ferro T.¹, Marcon B.¹, Agnoletti F.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperim.le delle Venezie. Sezione territoriale di Treviso, Italy

² Istituto Zooprofilattico Sperim.le delle Venezie, CREV, Legnaro, Italy

³ Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università di Milano, Italy

Corresponding author: Bano Luca, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Viale Brigata Treviso 13/a, 31100 Treviso, Italy - Tel. +39 0422 302302
- Fax: +39 0422 421154 - Email: lbano@izsvenezie.it

ABSTRACT: Role of *Clostridium difficile*-associated enteric disease in Italian commercial rabbitries. In order to investigate the role of *Clostridium difficile* (CD) in “rabbit enteritis complex”, intestinal contents were collected from the small intestine and caecum of 317 rabbits with enteric lesions and 80 control rabbits. The animals were selected on the base of age and enteric lesions (caecal constipation or fluid-filled caecum). Intestinal contents were ethanol treated and cultured in a prereduced selective medium for CD. Isolates were identified by commercial biochemical panel kit and by the specific *C. difficile* *tpi* gene PCR. Each isolate was tested by multiplex PCR to reveal the presence of *cdtA* and *cdtB* genes encoding for toxin A and toxin B respectively. Intestinal contents were screened for *C. difficile* toxins A and B by using a commercial ELISA. *C. difficile* was recovered from the intestinal content of 10 rabbits. All the positive animals were older than 35 days. *C. difficile* was not isolated from control rabbits. Eight strains resulted positive for both *cdtA* and *cdtB* genes. One strain was *cdtA/cdtB*⁺, and one strain was *cdtA/cdtB*⁻. In 10 samples the presence of toxins by a commercial ELISA was detected. This study demonstrates that CD is occasionally involved in outbreaks of enteric diseases in Italian rabbitries.

Key words: Rabbit, *Clostridium difficile*, Enteropathy, Toxins.

INTRODUZIONE – *Clostridium difficile* (CD) è segnalato in letteratura quale agente di gravi coliti pseudomembranose nell’uomo, generalmente osservate in pazienti ospedalizzati (Voth e Ballard, 2005). Infatti, sia nell’uomo che in numerose specie animali, CD è ritenuto responsabile di enteriti conseguenti a trattamenti antibiotici prolungati (ADD: antibiotic associated diarrhoea) (Voth e Ballard, 2005). Al contrario, nel coniglio, esistono segnalazioni di clostridiosi sostenute da CD anche in soggetti non trattati, di età compresa tra i 35 ei 55 giorni, nei quali si osservava enterocolite con contenuto ciecale liquido (Perkins *et al.*, 1995). In Francia CD sembra essere diffuso negli allevamenti di conigli (Bouvier *et al.*, 2005), mentre in Italia non esistono segnalazioni a riguardo. I maggiori fattori di virulenza di CD sono rappresentati da 2 esotossine ad attività citotossica: la tossina A (o enterotossina) e la tossina B (o citotossina) (Voth e Ballard, 2005). La presenza delle tossine A e B può essere agevolmente evidenziata nel contenuto intestinale mediante test immunoenzimatici commercialmente disponibili. Esiste una terza tossina binaria, simile alla iota-tossina di

C. perfringens e *C. spiroforme*, priva di attività citotossica, capace di modificare i filamenti di actina grazie alla sua azione ADP-ribosiltransferasica, ma il ruolo patogenetico di questa tossina deve ancora essere chiarito (Voth e Ballard, 2005). L'identificazione biochimica di CD mediante kit commerciali risulta particolarmente indaginosa e spesso poco attendibile, ma recentemente sono state descritte tecniche di biologia molecolare che consentono di determinare contemporaneamente la presenza di frammenti di DNA specie-specifici e di geni che codificano le tossine A (tcdA) e B (tcdB) (Lemee *et al.*, 2004). Il presente studio si propone di acquisire informazioni sul ruolo di *C. difficile* e delle sue tossine nelle sindromi enteriche del coniglio, osservandone la diffusione nella popolazione sana e malata.

MATERIALI E METODI – L'indagine ha coinvolto 397 soggetti provenienti da 132 allevamenti industriali, variamente distribuiti sul territorio nazionale. 317 animali presentavano lesioni a carico dell'apparato gastroenterico, mentre 80 conigli, privi di lesioni enteriche, sono stati inclusi nello studio come controllo. Il campione è stato stratificato in classi in base all'età degli animali ed ai diversi quadri necroscopici osservabili (tabella 1). Campioni di contenuto intestinale (2 gr. se solido, 2 ml. se liquido), prelevati sia nel tenue che nel grosso intestino, sono stati aliquotati in due diversi contenitori sterili. Il primo campione è stato sottoposto ad esame colturale su terreno selettivo per CD (*Clostridium Difficile* Agar Base, Oxoid), previo shock in alcol, secondo quanto descritto in letteratura (Jousimies-Somer *et al.*, 2002). In presenza di crescita batterica si è proceduto all'isolamento di colonie strettamente anaerobiche ed alla loro identificazione biochimica mediante kit commerciale API ANA (BioMerieux). L'identificazione biochimica di CD e la sua potenzialità tossigena sono state confermate mediante una multiplex-PCR in grado di evidenziare il gene specie-specifico *tpi* (triptose phosphate isomerase) ed i geni *tcdA* e *tcdB*, codificanti rispettivamente la tossina A e B di CD (Lemee *et al.*, 2004). Il secondo campione fecale è stato utilizzato per la ricerca delle tossine A e B mediante saggio immunoenzimatico (ELISA) reperibile in commercio (*C. difficile* tox A/B IITM, Techlab), secondo le indicazioni della ditta produttrice.

RISULTATI E CONCLUSIONI – *Clostridium difficile* e le sue tossine sono stati evidenziati complessivamente in 14 soggetti con sindrome enterica (14/317, 4.4%) in 12 diversi allevamenti (12/132, 9%). I risultati vengono sintetizzati in tabella 2. Dai risultati ottenuti emerge uno scarso coinvolgimento di CD nelle forme enteriche osservate negli allevamenti cunicoli italiani, rispetto a quanto osservato in Francia (Bouvier *et al.*, 2005). La presenza di CD è stata evidenziata batteriologicamente solo in soggetti di età superiore ai 35 giorni, in accordo con la casistica già descritta. La presenza di tossine di CD è stata rilevata in tutte le classi d'età prese in considerazione, indipendentemente dal fatto che i soggetti fossero malati o meno, mentre CD è stato isolato solo da soggetti con lesioni gastroenteriche, a prescindere dal tipo di lesione. La positività all'isolamento e la concomitante negatività alle tossine in ceppi potenzialmente tossigeni, potrebbe essere spiegata con la mancata espressione delle tossine. Viceversa, la presenza di tossine nel contenuto intestinale di soggetti da cui non è stato isolato CD, potrebbe essere attribuita alla minor sensibilità dell'esame batteriologico rispetto all'ELISA. C'è da sottolineare la potenziale patogenicità di quasi tutti i ceppi isolati (tcdA+/tcdB+) e risulta particolarmente interessante la sovrapposizione delle positività batteriologiche a quelle in ELISA in 4 casi su 10, per i

quali si può ipotizzare un ruolo attivo di CD nel determinare la sintomatologia gastroenterica in atto. E' opportuno sottolineare, inoltre, che in questi quattro soggetti, la presenza di CD è risultata concomitante a quella di altri batteri enteropatogeni per il coniglio (tab. 2); ciò supporta l'ipotesi che anche l'enterocolite da CD vada inquadrata nelle sindromi enteriche ad eziologia multifattoriale di questa specie.

Lesione Età (giorni)	Enterotiflite liquida	Coprostasi ciecale	Assenti lesioni enteriche	Totale
< 35	27	7	20	54
35-55	94	35	18	147
> 55	82	35	17	134
riproduttori	28	9	25	62
Totale	231	86	80	397

Tabella 1. Aggregazione dei campioni per classi di età e lesioni.

Allev.	Età	Lesione	Es. colt. CD	Tpi	TcdA	TcdB	Tox A/B	C. perfr.	C. spir.	REPEC	Cocc.
A	> 55	ETL	+	+	+	+	+	+	-	-	-
B	35-55	C	+	+	-	-	-	+	-	-	-
C	fatrice	C	+	+	+	+	-	+	-	-	-
D	> 55	C	+	+	-	+	-	-	+	-	-
E	> 55	C	+	+	+	+	-	-	+	+	-
F	35 - 55	ETL	+	+	+	+	+	-	-	+	-
F	35 - 55	ETL	+	+	+	+	-	-	-	+	-
G	> 55	ETL	+	+	+	+	+	-	+	+	-
G	35 - 55	ETL	+	+	+	+	+	-	-	+	+
G	35 - 55	ETL	+	+	+	+	-	-	-	+	+
H	<35	ETL	-	/	/	/	+	-	-	-	-
I	<35	C	-	/	/	/	+	-	-	-	-
J	35-55	ETL	-	/	/	/	+	-	+	-	-
D	35-55	AL	-	/	/	/	+	-	-	-	+
K	>55	AL	-	/	/	/	+	+	-	-	-
L	fatrice	ETL	-	/	/	/	+	-	+	-	-

Tabella 2. ETL: enterotiflite liquida ; C: coprostasi; AL: assenti lesioni; Cocc.: coccidi
REPEC: *Escherichia coli* enteropatogeni del coniglio

BIBLIOGRAFIA – Bouvier, A. C., Jacquinet, C., Manco, B., 2005. Etude récente sur la sensibilité de différentes souches de *Clostridium* prélevées sur des lapins avec signes cliniques d'EEL, vis-à-vis de la tiamuline. 11^{èmes} Journées de la Recherche cunicole, 29-30 nov., Paris, France, 253-256. Jousimies-Somer, H., Summanen, P., Citron, D., M., Jo Baron, E., Wexler, H., M., Finegold, S., M., 2002. Laboratory tests for diagnosis of *Clostridium difficile* enteric disease. In: Wadsworth – KTL, Anaerobic bacteriology manual. Star publishing company, Belmont, California, pp. 133-141. Lemee, L., Dhalluin, A., Testelin, S., Mattrat, M., A., Maillard, K., Lemeland, J., F., Pons, J., L., 2004. Multiplex PCR targeting *tpi* (triose phosphate isomerase), *tcdA* (toxin A), and *tcdB* (toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. J. Clin. Microbiol. 42:5710-5714. Perkins, S., E., Fox, J., G., Taylor, N., S., Green, D., L., Lipman N., S., 1995. Detection of *Clostridium difficile* toxins from the small intestine and cecum of rabbits with naturally acquired enterotoxemia. Lab. Anim. Sci. 45:379-384. Voth, D., E., Ballard, J., D., 2005. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. Clin. Microbiol. Rev. 18:247-263.