Tossinotipizzazione di *Clostridium perfringens* isolato da coniglio

Cocchi M., Agnoletti F., Bacchin C., Bano L., Guolo A., Drigo I.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Italy

Corresponding Author: Monia Cocchi, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. V.le B.ta Treviso 13/a, 31100 Treviso, Italy - Tel. +39 0422 302302 - Fax: +39 0422 421154 - Email: mcocchi@izsvenezie.it

ABSTRACT: *Clostridium perfringens* toxinotypes isolated from rabbit. *C. perfringens* is an anaerobic Gram positive bacterium, responsible for many pathologies both in human and animals. *C. perfringens* strains are classified into five toxinotypes (A-E) based on the production of four major toxins (α , β , ϵ , ι); each toxinotype is associated with a particular disease. A novel toxin (β_2) has recently been identified, but its role in the pathogenesis of enterities/enterotoxaemia in animals is still in debate. Aim of this study was to investigate which toxinotype of *C. perfringens* is recovered in rabbit affected by enteropathy. In our study, 149/150 strains have showed *cpa* and in only one case *cpi* was found. 25% of *C. perfringens* toxinotype A has harboured *cpb2*.

Key words: *C. perfringens*, Rabbit, Toxinotypes.

INTRODUZIONE – *C. perfringens*, bacillo Gram positivo anaerobio sporigeno, è ampiamente distribuito nell'ambiente e nell'intestino di uomo e animali (Petit *et al.*, 1999). La produzione di una o più delle quattro tossine maggiori (α , β , ϵ , ι) è utilizzata per la classificazione in 5 diversi tossinotipi (A-E), ad ognuno dei quali è associata una particolare patologia (Tabella 1) (Songer *et al.*, 1996; Petit *et al.*, 1999).

Tabella 1. Tossinotipo e principali patologie

	TOSSINOTIPO	TOSSINA	PATOLOGIA/SPECIE
TOSSINOTIPI MAGGIORI	A	α	Enterite necrotica nel puledro, enterotossitemia nel bovino e nell'agnello (<i>yellow lamb disease</i>), enterite necrotica nel suinetto, gastroenterite emorragica nel cane
	B	α , β , ϵ	Dissenteria negli agnelli neonati
	C	α , β	Enterite nei giovani animali
	D	α , ϵ	Enterotossitemia nell'ovino e nel cavallo
	E	α , ι	Enterotossitemia in diverse specie animali

E' stata descritta la produzione di ulteriori 2 tossine con un potente effetto citotossico: l'enterotossina, associata a tutti i tossinotipi, e la tossina β_2 . Quest'ultima, codificata dal gene *cpb2* e inizialmente descritta solo nel tossinotipo A, è stata recentemente associata a tutti i tossinotipi (Bueschel *et al.*, 2002), anche se l'esatto ruolo nella patogenesi delle enteriti/enterotossiemie degli animali non è ancora completamente chiaro. La tipizzazione di *C. perfringens*, originariamente basata su studi di neutralizzazione della tossina *in vivo* e successivamente su test immunoenzimatici (ELISA), è attualmente condotta con analisi biomolecolari. Nel coniglio, *C. perfringens* tipo E è stato ritenuto a lungo agente causale di enterotossiemie (Baskerville *et al.*, 1980), successivamente imputate all'azione della tossina binaria di *C. spiroforme* (Borriello *et al.*, 1983). *C. perfringens* tipo A, invece, è ritenuto da alcuni autori un possibile commensale od

opportunistica (Songer, 1996). Di fatto, il ruolo di *C. perfringens* nelle enterotossiemie del coniglio è ancora in discussione. Il presente studio si propone di fornire informazioni utili a chiarire il coinvolgimento di *C. perfringens* nelle sindromi enteriche del coniglio, tramite la determinazione del tossinotipo dei ceppi di campo isolati da soggetti colpiti da enteropatia.

MATERIALI E METODI – Sono stati tipizzati 150 ceppi di *C. perfringens* isolati dall'intestino di conigli affetti da patologia enterica. L'acido nucleico è stato estratto utilizzando il kit commerciale “GeneElute Bacterial genomic DNA kit” (Sigma-Aldrich), seguendo le istruzioni del produttore, partendo da una coltura pura di *C. perfringens* isolato in PAB (Oxoid) addizionato di globuli rossi di montone (5% v/v). Il DNA estratto è stato sottoposto a una multiplex PCR per la determinazione dei geni codificanti le tossine α , β , ϵ e ι e a una duplex PCR per la determinazione dei geni codificanti la tossina $\beta 2$ e l'enterotossina (Baums *et al.*, 2004). I primers utilizzati per la multiplex PCR e per la duplex PCR sono illustrati nella tabella 2.

Tabella 2. Primers utilizzati nella multiplex PCR e nella duplex PCR

Primers utilizzati nella multiplex PCR			
TOSSINA	GENE	SEQUENZA OLIGONUCLEOTIDICA (5'-3')	LUNGHEZZA FRAMMENTO
α	Cpa_for	AGT CTA CGC TTG GGA TGG AA	900 pb
	Cpa_rev	TTC CCT GGG TTG TCC ATT TC	
β	Cpb1_for	TCC TTT CTT GAG GGA GGA TAAT	611 pb
	Cpb1_rev	TGA ACC TCC TAT TTT GTA TCC CA	
ϵ	Cpetx_for	ACT GCA ACT ACT ACT CAT ACT GTG	541 pb
	Cpetx_rev	CTG GTG CCT TAA TAG AAA GAC TCC	
ι	Cpi_for	AAA CGC ATT AAA GCT CAC ACC	293 pb
	Cpi_rev	GTG CAT AAC CTG GAA TGG CT	
Primers utilizzati nella duplex PCR			
enterotossina	Cpe_for	GCG GAA CCC TCA GTA GTT TCA	506 pb
	Cpe_rev	ACC AGC TGG ATT TGA GTT TAA TG	
$\beta 2$	Cpb2_for	CAA GCA ATT GGG GGA GTT TA	200 pb
	Cpb2_rev	GCA GAA TCA GGA TTT TGA CCA	

Condizioni per l'amplificazione del DNA. Multiplex PCR: denaturazione 95°C, 2 min 30sec; 35 cicli così suddivisi: 95°C, 1 min, 60°C, 1 min, 72°C, 1 min 20 sec. Elongazione finale: 72°C, 2 min. Duplex PCR: denaturazione 95°C, 2 min 30sec; 35 cicli così suddivisi: 95°C, 1 min, 56°C, 1 min, 72°C, 1 min 20 sec. Elongazione finale: 72°C, 2 min. Gli amplificati sono stati esaminati con elettroforesi in gel di agarosio al 2,0% (p/V), addizionato di etidio bromuro.

RISULTATI E CONCLUSIONI – I risultati della tossinotipizzazione dei ceppi di campo di *C. perfringens* sono riassunti in tabella 3. Sono stati identificati 149/150 tossinotipi A ed un solo tossinotipo E. Il 25% dei ceppi di *C. perfringens* tossinotipo A è risultato portatore del gene *cpb2*.

Questi risultati permettono di reinquadrare la problematica delle enterotossiemie del coniglio sostenute da *C. perfringens*, restringendo il campo d'interesse al tossinotipo A ed al nuovo tossinotipo $\alpha + \beta 2$. Il tossinotipo E, invece, viene di fatto relegato ad un

ruolo eziologico marginale e sporadico, così come i tossinotipi B, C e D. L'utilizzo della PCR ha permesso di determinare il tossinotipo di *C. perfringens* in modo rapido ed accurato. Questa tecnica rilevando la presenza del gene, ma non fornendo informazioni circa la sua espressione, non è in grado di evidenziare l'effettiva produzione della tossina, fornendo quindi solo informazioni circa la potenzialità tossigena del ceppo in esame. In particolare per quanto riguarda *cpb2* diversi Autori ne hanno riscontrato la presenza sia in animali affetti da patologia enterica che in soggetti sani (Bueschel *et al.*, 2002); inoltre sono stati segnalati ceppi *cpb2+* non produttori della $\beta 2$. Brüggemann (2005) ipotizza la presenza di stimoli interni/esterni in grado di influenzare l'espressione della tossina, inducendo o reprimendo l'espressione della medesima. E' evidente, comunque, che anche le enterotossiemie del coniglio sono da considerare patologie condizionate nelle quali diversi fattori, come i trattamenti antibiotici o antiflogistici, i rapidi cambiamenti nella dieta, l'eccessiva somministrazione nella stessa di carboidrati, possono determinare un'alterazione dell'ecosistema intestinale e favorire un'intensa moltiplicazione del batterio (Songer, 1996). In sostanza, per chiarire la patogenicità del tossinotipo A e del tossinotipo $\alpha + \beta 2$ di *C. perfringens*, sarà necessario approfondire ulteriormente le indagini considerando l'effettiva espressione delle tossine e l'eventuale danno tissutale da esse causato, affiancando ai metodi biomolecolari utilizzati in questo lavoro, anche tecniche istologiche, immunoenzimatiche, ed eventualmente di proteomica. Infine si sottolinea che fra i 150 ceppi di campo esaminati non sono stati individuati ceppi di *C. perfringens* *cpe+*; ovvero produttori di enterotossina, responsabile nell'uomo di episodi di tossinfezione alimentare.

Tabella 3. Risultati della tossinotipizzazione dei ceppi di campo di *C. perfringens*

TOSSINOTIPO	n. ceppi (totale n. 150)	%	n. positivi <i>cpe</i>	%	n. positivi <i>cpb2</i>	%
A	149	99,33	0	0	37	24,8
B	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0
E	1	0,67	0	0	0	0

BIBLIOGRAFIA – Baskerville, M., Wood, M., and Seamer, J.H., 1980. *Clostridium perfringens* typeE enterotoxaemia in rabbit. Vet. Rec. 107, 18-19. Baums, C.G, Schotte, U., Amtsberg, G., Goethe, R., 2004. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. Vet. Microbiol., 100, 11-16. Borriello, S. P., and Carman, R.J., 1983. Association of iota-like toxin and *Clostridium spiroforme* with both spontaneous and antibiotic-associated diarrhea and colitis in rabbits. J Clin. Microbiol. 17:3, 414-418. Bueschel, D.M., Jost, B.H., Billington, S.J., Trinh H.T., Songer J.G., 2003. Prevalence of *cpb2*, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. Vet Microbiol., 94, 121-129. Brüggemann, H, 2005. Genomics of clostridial pathogens: implication of extrachromosomal elements in pathogenicity. Current Opinion in Microbiol 8, 1-5. Petit, L. Gibert, M., Popoff, M., 1999. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. Trends in Microbiology 7, 104-110. Songer, J.G., 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clin. Microbiol. Rev., 9:2, 216-234.