

Identificazione di *Clostridium spiroforme* e dei geni codificanti la tossina binaria (*sas*; *sbs*) da feci e da isolati mediante PCR

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

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Italy

Corresponding Author: Ilenia Drigo, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Viale Brigata Treviso 13/a, 31100 Treviso, Italy - Tel. +39 0422 302302
- Fax: +39 0422 421154 - Email: idrigo@izsvenezie.it

ABSTRACT: Identification of *Clostridium spiroforme* and binary toxin gene (*sas*;*sbs*) in stool specimens and bacterial isolates with PCR. Rabbit diarrhoea caused by toxigenic *Clostridium spiroforme* is responsible for significant losses in commercial rabbitries. Several phenotypic methods have been proposed for the identification of *C. spiroforme* but the biochemical tests are inappropriate for accurate species identification. The aim of this work is to design specific primers for identification of *C. spiroforme* and its binary toxin. The results indicate that our primers are specific for *C. spiroforme* and they are able to detect the bacteria with good sensitivity .

Key words: *Clostridium spiroforme*, Rabbit, PCR.

INTRODUZIONE – *C. spiroforme* è un batterio Gram positivo, anaerobio stretto, di forma spiralata, normalmente presente in bassa carica nel contenuto intestinale del coniglio; alterazioni della normale flora microbica intestinale, accompagnate da un'eccessiva proliferazione di questo microrganismo, possono determinare la comparsa di patologia enterica (Ellis *et al.*, 1991). Le lesioni osservabili nei soggetti malati sono determinate dalla produzione di una tossina binaria, antigenicamente simile alla tossina ι prodotta da *C. perfringens* di tipo E (Perelle *et al.*, 1993), costituita da 2 subunità indipendenti Sa e Sb. Queste due subunità, in associazione, presentano una spiccata attività citolitica (Barth *et al.*, 2004) e sono codificate, rispettivamente, dai geni *sas* ed *sbs*. La diagnosi di questa patologia enterica è basata principalmente sulla messa in evidenza di *C. spiroforme* mediante esame batterioscopico del contenuto ciecale dei soggetti malati e mediante isolamento in terreno selettivo; la successiva identificazione degli isolati, tuttavia, è complicata dall'assenza di metodi biomolecolari e dalla necessità di eseguire test biochimici di conferma, secondo lo schema interpretativo proposto da Kaneuchi (1979). Obiettivo del presente lavoro è la messa a punto di una PCR per l'identificazione di *C. spiroforme* e dei geni codificanti per la tossina binaria da feci e da coltura batterica, ai fini di semplificare le procedure di identificazione.

MATERIALI E METODI – Ceppi batterici e condizioni di coltura. Per la valutazione della specificità e della sensibilità dei test sono stati utilizzati 8 ceppi di riferimento appartenenti al genere *Clostridium*: *C. spiroforme* (ATCC 29900), *C. cocleatum* (CCUG 1551), *C. ramosum* (CCUG 1402), *C. innocuum* (CCUG 1286), *C. tertium* (ATCC 19405), *C. sordellii* (ATCC 9714), *C. perfringens* (CCUG 2037 e ATCC 27324) e *C. difficile* (ATCC 51695). Sono stati testati anche i seguenti ceppi: *S. aureus* (ATCC 29213), *B. fragilis* (ATCC 25285), *K. pneumoniae* (ATCC 700603), *E. coli* e 15 ceppi di campo di *C. spiroforme*. Per le prove di sensibilità del metodo *C.*

spiroforme è stato coltivato in Reinforced Clostridial Medium (RCM, Oxoid) a 37 ± 1 °C in condizioni di anaerobiosi e le diluizioni scalari sono state effettuate in Wilkins Chalgren Anaerobe Broth (WCAB, Oxoid). **Disegno di primer specie specifici per 16S rDNA di *C. spiroforme*.** Le sequenze disponibili della subunità 16S dell'rRNA di *C. spiroforme* sono state allineate con le sequenze di 17 specie batteriche appartenenti al genere *Clostridium*, utilizzando il programma ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw/). I primers specifici per *C. spiroforme* sono stati disegnati con l'utilizzo del programma Web-Primer (seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer). **Estrazione del DNA da isolati batterici.** Alcune colonie, provenienti da colture pure del ceppo in esame, sono state stemperate in 2 ml di Phosphate Buffer Saline (PBS); 1 ml della sospensione batterica così ottenuta è stato utilizzato per l'estrazione del DNA, mediante il Kit commerciale GeneElute Bacterial DNA Extraction Kit (Sigma-Aldrich). **Estrazione di DNA da feci.** L'estrazione è stata eseguita partendo da 200 mg di feci di coniglio utilizzando il Kit commerciale QUIamp DNA Stool Mini Kit (Quiagen). **Amplificazione del DNA.** Il 16S rDNA di *C. spiroforme* è stato amplificato alle seguenti condizioni di PCR: denaturazione a 95 °C per 4', 8 cicli costituiti da 30" a 95 °C, 30" a 70 °C con calo di 1 grado per ogni ciclo e 30" a 72 °C seguiti da 30 cicli a 95 °C per 30", 62 °C a 30" e 72°C per 30" con uno step finale a 72 °C per 3'. Le condizioni di amplificazione per i primers specifici per la tossina binaria sono state invece le seguenti: 95°C per 5' seguiti da 30 cicli a 95 °C per 30", 60 °C per 30" e 72 °C per 30" seguiti da una fase finale a 72°C per 3'. La reazione di PCR è stata eseguita, in entrambi i casi, in un volume finale di 25 µl utilizzando 0,05 unità/µl di FastStart Taq DNA Polymerase (Roche), MgCl₂ 1,5 mM (Roche), GeneAmp dNTPs Mix 200 µM (Applied Biosystems), 0,5 µM di ciascun primers e 5 µl di DNA.

RISULTATI E CONCLUSIONI – Disegno di primers specifici per *C. spiroforme*.

Un allineamento multiplo delle sequenze della subunità 16S dell'rDNA di *C. spiroforme* e di 16 *Clostridium spp* ha permesso di verificare che *C. spiroforme* presenta un'alta similarità genetica con *C. cocleatum*, *C. ramosum* e *C. innocuum*. Utilizzando queste informazioni sono stati quindi disegnati dei primers, Spiro1_F e Spiro 4_R, che riconoscono porzioni specifiche della sequenza di *C. spiroforme*. Per la validazione della PCR sono state eseguite prove di specificità e sensibilità. Le prove di specificità dei primers, eseguite amplificando contemporaneamente il DNA estratto da ceppi di *C. spiroforme*, dai ceppi di riferimento e da feci di coniglio, hanno evidenziato la presenza della banda con l'altezza attesa di 925 pb solamente nei ceppi di *C. spiroforme* e nelle feci risultate positive all'esame batterioscopico per *C. spiroforme* (figura 1). Le prove di sensibilità sono state eseguite amplificando alle stesse condizioni di reazione DNA estratti da diluizioni scalari di *C. spiroforme* e DNA estratti da feci di coniglio infettate con concentrazioni scalari di *C. spiroforme*. La banda è risultata visibile fino alla diluizione corrispondente a 25 UFC/ml per le diluizioni in WCAB e fino a 1.38×10^4 UFC/g di feci. **Disegno di primers specifici per la tossina binaria di *C. spiroforme*.** L'allineamento delle sequenze dei geni codificanti la tossina binaria di *C. spiroforme* e di *C. difficile* e della ι tossina di *C. perfringens* ha evidenziato che tra queste sequenze vi è un'elevata similarità genetica. Sono stati quindi disegnati dei primers specifici per la tossina binaria di *C. spiroforme*, Sa/bS_F e Sa/bS_R; tali primers producono un amplificato di 824 pb che comprende una parte della sequenza 3' del gene *sas* e una parte della sequenza 5' di *sbs*. Le prove di specificità effettuate amplificando contemporaneamente il DNA estratto da alcuni isolati di *C. spiroforme*, dai ceppi di

referenza di *C. difficile* e di *C. perfringens* hanno evidenziato la presenza della banda solo nei ceppi di *C. spiroforme* e nelle feci che all'esame batterioscopico erano risultate positive al microrganismo (figura 2). Le amplificazioni eseguite da DNA estratti da diluizioni scalari di *C. spiroforme*, in presenza o assenza di feci, hanno messo in evidenza che la banda è visibile fino ad una diluizione corrispondente a 2.8×10^4 UFC/g di feci e fino ad una diluizione equivalente a 80 UFC/ml di sospensione batterica. I nostri risultati indicano che i primers sono in grado di identificare *C. spiroforme* e di mettere in evidenza la presenza dei geni per la tossina binaria con una buona sensibilità e quindi rappresentano un utile e affidabile strumento per la diagnosi della patologia enterica del sostenuta da questo microrganismo.

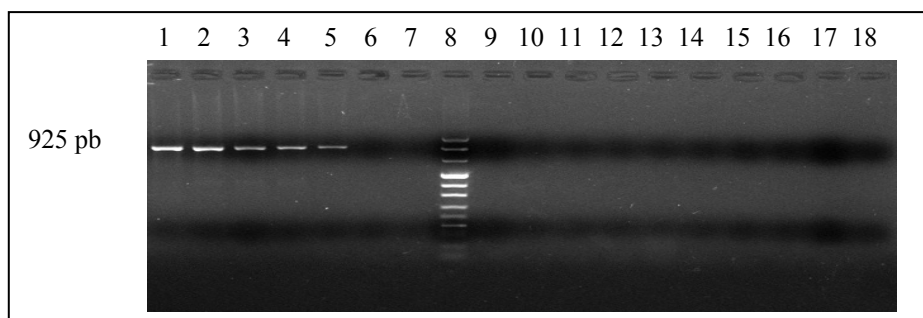


Figura 1. Prove di specificità dei primers Spiro1_F e Spiro 4_R. (1) *C. spiroforme* ATCC 29900, (2-3) feci positive, (4) e (5) ceppi di campo di *C. spiroforme*, (6) *C. coleatum* CCUG 1551, (7) *C. ramosum* CCUG 1402 (8) Marker di peso molecolare (9) *C. innocuum* CCUG 1286, (10) *C. tertium* ATCC 19405, (11) *C. sordellii* ATCC 9714, (12) *C. perfringens* CCUG 2037, (13) *C. difficile* ATCC 51695, (14) *S. aureus* ATCC 29213, (15) *B. fragilis* ATCC 25285, (16) *K. pneumoniae* ATCC 700603 (17) *E. coli* isolato nel nostro laboratorio, (18) feci negative per *C. spiroforme*.

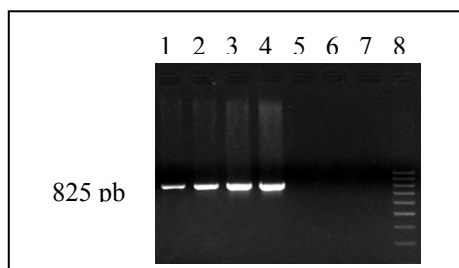


Figura 2. Prove di specificità dei primers per la tossina binaria. (1) feci positive, (2) (3) e (4) ceppi di *C. spiroforme* isolati nel nostro laboratorio, (5) *C. perfringens* ATCC 27324, (6) *C. difficile* ATCC 29213 (7) feci negative per *C. spiroforme*.

BIBLIOGRAFIA – Barth, H., Aktories, K., Popoff, M.R, Stiles, B.G., 2004. Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and application of common Clostridium and bacillus proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68: 373-402. Ellis, T.M., Gregory, A.R. and Louge G.D., 1991. Evaluation of a toxoid for protection of rabbits against enterotoxaemia experimentally induced by trypsin-activated supernatant of *Clostridium spiroforme*. Vet. Microbiol., 28: 93-102. Kaneuchi, C., Miyazato, T., Shinjo, T., Mitsuoka, T. 1979. Taxonomic study of helically coiled, sporeforming anaerobes isolated from the intestines of human and other animals: *Clostridium cocleatum* sp. Nov. and *Clostridium spiroforme* sp. nov. Int.J.Syst.Bacteriol. 29:1-12. Perelle, S., Gibert, M, Boquet, P., Popoff, M.R., 1993. Characterization of *Clostridium spiroforme* iota-toxin genes and expression in *Escherichia coli*. Infect. Immun. 63: 5147-56.