

Caratterizzazione del gene *cpb2* negli isolati di *Clostridium perfringens* di coniglio

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

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Italy

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

ABSTRACT: Characterization of *Clostridium perfringens cpb2* gene in rabbit strains. In commercial rabbitries, enteritis due to bacteria belonging to the genus *Clostridium* are considered a major cause of economic losses. Among this genus the role played by *C. perfringens* is still under debate. Recently, the β_2 toxin, associated to enterotoxaemia in swine, horses and cattle, was described in *C. perfringens* rabbit isolates. Two *cpb2* alleles, *cpb2^{con}* and *cpb2^{aty}*, were reported in association with enteritis in several animals. To our knowledge no data are available for rabbits. In this paper we report the detection of the two allelic forms of the *cpb2* gene in 56 strains of *C. perfringens* isolated during enteritis in rabbits. Results indicate that 94 % of strains harbour the *cpb2^{con}* variant with a uniform distribution of toxin-types and *cpb2* alleles in the same animal.

Key words: *Clostridium perfringens*, *cpb2 consensus*, *cpb2 atypical*

INTRODUZIONE – *Clostridium perfringens*, batterio anaerobio Gram positivo sporigeno, è un importante agente di enterite/enterotossiemia negli animali e nell'uomo. Nelle diverse fasi dell'allevamento cunicolo rappresenta una delle cause più comuni di enterite, insieme a parassiti (Coccidi) e ad altri batteri (*E. coli* enteropatogeni, *K. pneumoniae*, *Salmonella spp.*, *C. spiroforme*, *C. difficile* etc.). L'enteropatia causata da *C. perfringens* è una patologia condizionata; infatti, errori nella dieta, fattori ambientali, stress e somministrazione di alcuni farmaci, possono causare un'alterazione della microflora intestinale tale da indurre un'intensa moltiplicazione del microrganismo con produzione di tossine capaci di esplicare la loro azione a livello intestinale e/o sistemico. *C. perfringens* viene classificato in 5 tossinotipi (A-E) in base alla produzione delle tossine maggiori α , β , ϵ , ι (Songer, 1996). Ulteriori fattori di virulenza sono rappresentati dall'enterotossina e dalla tossina β_2 (CPB2). Quest'ultima è codificata dal gene a localizzazione plasmidica *cpb2*. I ceppi di *C. perfringens cpb2+* sono associati a patologia enterica in cavalli, suinetti e bovini (Jost *et al.*, 2005). Recenti studi (Jost *et al.*, 2005; Jost *et al.*, 2006; Lebrun *et al.*, 2007) hanno dimostrato, in diverse specie, la presenza di due forme alleliche del gene *cpb2*: l'allele *consensus* (*cpb2^{con}*) e l'allele *atipico* (*cpb2^{aty}*), i quali codificano rispettivamente per la proteina β_2 *consensus* (CPB2^{con}) e per la proteina β_2 *atipica* (CPB2^{aty}). Queste proteine, che presentano un'omologia nella sequenza aminoacidica pari al 62,3% (Jost *et al.*, 2005), presentano diversa citotossicità *in vitro* (Fisher *et al.*, 2005), e ciò fa presumere che le due isoforme abbiano anche una diversa tossicità *in vivo*. Scopo del presente lavoro è stata la caratterizzazione di ceppi di *C. perfringens cpb2+*, al fine di verificare quale variante allelica del gene *cpb2* fosse presente nei ceppi isolati in corso di patologia enterica nel coniglio.

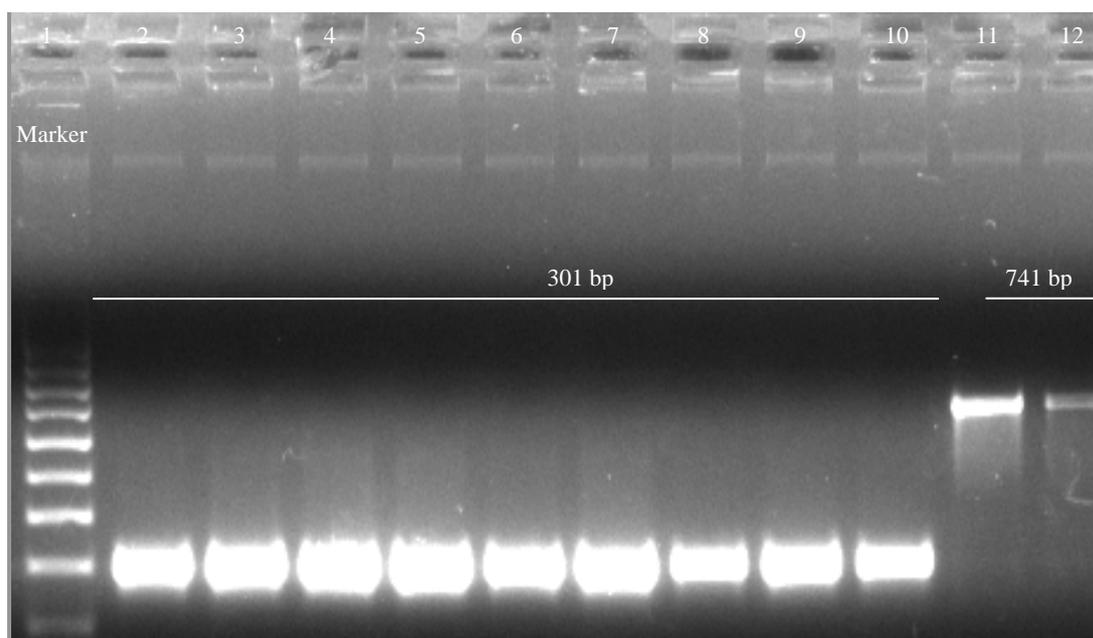
MATERIALI E METODI – In questo studio sono stati analizzati 31 ceppi di *C. perfringens* *cpb2*⁺, precedentemente isolati dal contenuto ciecale di conigli affetti da enterotiflite o coprostasi ciecale, provenienti da allevamenti diversi.

Il contenuto ciecale di altri 5 conigli, anch'essi provenienti da 5 allevamenti diversi, è stato sottoposto ad esame colturale per la ricerca di *C. perfringens*, e da ciascun soggetto sono state clonate 5 diverse colonie, ottenendo ulteriori 25 ceppi batterici.

In totale, 56 ceppi di *C. perfringens* (31 + 25) sono stati sottoposti a tossinogenotipizzazione (Yoo *et al.*, 1997) e a PCR per l'individuazione della variante allelica, secondo il protocollo proposto da Jost *et al.* (2005).

RISULTATI E CONCLUSIONI – Il protocollo biomolecolare ha permesso di verificare che 29/31 ceppi *cpb2*⁺ (94%) appartengono alla variante *consensus*, mentre 2/31 (6%) all'allele *atipico*. La caratterizzazione del gene *cpb2* dei 25 ceppi derivanti da 5 diversi animali, ha evidenziato che l'allele *cpb2*^{con} è presente in 24/25 ceppi, mentre 1/25 è *cpb2*^{aty}. (Fig. 1). In totale, quindi, 53/56 ceppi appartengono alla variante *consensus*, mentre 3/56 a quella *atipica*.

Figura 1 – Corsa elettroforetica dei prodotti di amplificazione delle forme alleliche *cpb2*^{con} e *cpb2*^{aty}. 1: Marker di peso molecolare (100bp. Roche); 2-10: prodotto di amplificazione del gene *cpb2*^{con}; 11-12: prodotto di amplificazione del gene *cpb2*^{aty}.



Questo studio dimostra un'elevata prevalenza della variante allelica *consensus* negli isolati di *C. perfringens* *cpb2*⁺, ottenuti da conigli affetti da patologia enterica, in accordo con quanto sostenuto da Jost *et al.* (2005), secondo il quale l'alta percentuale della variante *cpb2*^{con} è maggiormente diffusa negli isolati europei rispetto a quelli nordamericani.

I risultati ottenuti dall'analisi dei ceppi di *C. perfringens* *cpb2*⁺ raccolti dal medesimo animale hanno evidenziato non solo uniformità nella distribuzione dei tossinotipi, già evidenziata da Cocchi *et al.* (2008), ma anche uniformità nella distribuzione allelica del gene *cpb2*.

L'applicazione del protocollo biomolecolare descritto ha quindi permesso di caratterizzare in modo rapido i ceppi di *C. perfringens* isolati da coniglio; ulteriori approfondimenti si rendono comunque necessari (tramite ad esempio l'applicazione di protocolli sperimentali sia *in vivo* che *in vitro*), al fine di comprendere l'esatto ruolo delle varianti alleliche nella patogenesi dell'enterite/enterotossitemia del coniglio.

BIBLIOGRAFIA – **Cocchi**, M., Drigo I., Bacchin C., Bano L., Marcon B., Agnoletti F., 2008. Toxin-genotyping of *Clostridium perfringens* strains isolated from rabbits with enteric disease. Proc.9th World Rabbit Congr., Verona, Italia, 274. **Fisher**, D.J., Miyamoto, K., Harrison, B., Akimoto, S., Sarker, M.R., McClane, B.A., 2005. Association of beta2 toxin production with *Clostridium perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene. Mol. Microbiol. 56: 747-762. **Jost**, B.H., Billington S.J., Trinh H.T., Bueschel D.M., Songer J.G., 2005. Atypical *cpb2* genes, encoding beta2 toxin in *Clostridium perfringens* isolates of non-porcine origin. Infect. Immunol. 73: 652-656. **Jost**, B.H., Trinh H.T., Songer J.G., 2006. Clonal relationships among *Clostridium perfringens* of porcine origin as determined by multilocus sequence typing. Vet. Microbiol. 116:158-165. **Lebrun**, M., Filee, P., Mousset, B., Desmecht, D., Galleni, M., Mainil, J.G., Linden, A., 2007. The expression of *Clostridium perfringens* consensus beta2 toxin is associated with bovine enterotoxaemia syndrome. Vet. Microbiol. 120:151-157. **Songer**, J.G., 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clin. Microbiol. Rev. 9: 216-234. **Yoo** H.S., Lee S.U., Park K.Y., Park Y.H., 1997. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 35: 228-232.