

Tossino-genotipizzazione di *Clostridium perfringens* mediante protocollo di reazione a catena della polimerasi

Pietro Badagliacca, Andrea Di Provvido, Silvia Scattolini, Giuliana Pompei & Elisabetta Di Giannatale

Riassunto

Il DNA estratto da due raccolte di ceppi di *Clostridium perfringens* è stato sottoposto a un protocollo di reazione a catena della polimerasi (PCR) mediante PCR multiplex per evidenziare la presenza di geni *cpa*, *cpb1*, *cpetx*, *cpi* e PCR duplex per i geni *cpe* e *cpb2* che codificano, rispettivamente, le tossine α , β 1, ϵ , ι , enterotossina e β 2. Le due raccolte hanno riguardato ceppi di *C. perfringens*, 19 di origine cunicola e 41 provenienti da specie animali differenti. Tutti i campioni di DNA sono risultati positivi per il gene *cpa*, rilevato singolarmente o in combinazione con il gene *cpb2*. L'evidenziazione del gene *cpa* ha caratterizzato il 63,2% dei ceppi di origine cunicola e il 76,9% dei ceppi isolati nelle altre specie animali. Il genotipo *cpa+cpb2* è risultato presente in 7 ceppi (36,8%) di origine cunicola e in 9 ceppi (21,9%) provenienti da specie animali differenti. Nel coniglio, le lesioni patologiche associate all'isolamento di *C. perfringens* sono risultate, principalmente, forme di enteropatie non infiammatorie. Nelle specie diverse dal coniglio, *C. perfringens* è stato isolato prevalentemente in animali con enteropatie a carattere congestizio-emorragico ma anche con lesioni traumatiche fatali, malattie degenerative e organi in autolisi *post-mortem*. Nessuna chiara correlazione è stata osservata tra la positività per il gene della tossina β 2 e quadri patologici specie-specifici.

Parole chiave

Animale, *Clostridium perfringens*, Genotipizzazione, PCR, Reazione a catena della polimerasi, Tossina clostridica.

Introduzione

I ceppi di *Clostridium perfringens* sono classificati all'interno di 5 tossinotipi (A, B, C, D e E) sulla base della produzione delle quattro maggiori tossine (α , β 1, ϵ e ι), del loro effetto letale in seguito a somministrazione intraperitoneale e della specifica sieroprotezione con anticorpi neutralizzanti in test di letalità nel topo (12).

Il tossinotipo A di *C. perfringens* è il più comune nell'ambiente, ubiquitario, responsabile di gangrene nell'uomo, enterotossitemia emorragica e necrotizzante nei ruminanti, abomasite nel vitello, enterite necrotica nel pollo ed estese enteriti nei mammiferi. È associato anche con intossicazioni alimentari dell'uomo (9). L'enteropatogenicità del tossinotipo A è mediata principalmente dall' α tossina, codificata dal gene *cpa* (*plc*) localizzato nella regione variabile del cromosoma in prossimità della zona di origine della replicazione. Le enteriti umane indotte da intossicazione alimentare in cui è coinvolto il tossinotipo A sono mediate da una tossina (enterotossina) prodotta durante la sporulazione di *C. perfringens*, codificata dal gene *cpe*, localizzato nel cromosoma. Lo stesso gene, localizzato in un plasmide, viene associato alle

enteriti di origine non alimentare dell'uomo e di altri animali (12).

I tossinotipi B, C, D ed E di *C. perfringens* sono associati, rispettivamente, alla dissenteria degli esemplari giovani di molte specie animali, all'enterotossinemia emorragica della pecora (Struck), alla "malattia del rene molle" della pecora e alla morte improvvisa con dissenteria del vitello e dell'agnello (9). La necrosi emorragica della mucosa intestinale e l'edema dei parenchimi che caratterizzano la patogenesi dei tossinotipi B, C e D sono mediate dall'azione delle tossine β_1 ed ϵ codificate dai geni *cpb1* e *cpetx*, localizzati in plasmidi. Le tossine β_1 e ϵ in combinazione, sono associate al tossinotipo B, se individualmente espresse, sono associate rispettivamente con i tossinotipi C e D. La tossina ι , codificata dal gene *cpi* (*iap*), localizzato in un plasmide, è responsabile della destrutturazione della membrana cellulare e del citoscheletro actinico ed è propria del tossinotipo E. Tutti i tossinotipi citati sono produttori di α tossina mentre possono esserlo di enterotossina (12). Recentemente Gibert *et al.* (4) hanno descritto una nuova tossina, β_2 , codificata dal gene *cpb2* localizzato in un plasmide. La tossina β_2 è stata così denominata per differenziarla dalla tossina β_1 espressa da un ceppo di riferimento di *C. perfringens* tipo B e da un ceppo di campo tipo C isolato da un suinetto con enterocolite necrotizzante. Più recentemente, diversi studi hanno dimostrato l'ampia diffusione di *C. perfringens* β_2 -tossinogenici isolati da ruminanti, carnivori, pollo, pesci con clostridiosi manifesta e anche da animali sani (14).

In seguito alla recente diffusione dell'enteropatia epizootica del coniglio (ERE), il ruolo di *C. perfringens* è stato indagato da vari autori (11, 15). Sebbene l'eziologia dell'ERE rimane ad oggi sconosciuta, questi studi discutono sulla presenza dei genotipi *cpa*, *cpa+cpb2* e *cpe* di *C. perfringens* nell'ERE spontanea e sperimentale.

La reazione a catena della polimerasi (PCR), impiegata nella genotipizzazione di *C. perfringens*, è stata sviluppata e comunemente accettata come metodo pratico e affidabile che consente una più accurata e completa determinazione dei fenotipi

patologici di *C. perfringens* rispetto alla genotipizzazione delle tossine (12).

Lo scopo di questo studio è quello di contribuire alla conoscenza dei genotipi di *C. perfringens* presenti in Italia negli animali domestici e selvatici, in particolare nel coniglio, e di descrivere i principali quadri patologici associati all'isolamento di *C. perfringens*.

Materiali e metodi

Collezioni di *Clostridium perfringens*

Nel corso del biennio 2007-2008 sono state collezionate due raccolte di ceppi di *C. perfringens* provenienti, rispettivamente, da uno studio *ad hoc* sulle enteropatie del coniglio (13) e dall'attività ordinaria del servizio di necroscopia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" (IZS A&M), riguardante varie specie animali. La prima collezione è stata costituita da 19 ceppi isolati da cieco di conigli malati, la seconda da 41 ceppi isolati da fegato, rene e contenuto intestinale di animali domestici e selvatici.

Quadri patologici

I caratteri patologici dei conigli affetti da enteropatia sono stati classificati sulla base del carattere infiammatorio (enterotiflite) e non infiammatorio (contenuto liquido, costipazione del cieco, contenuto mucoide), i caratteri patologici riscontrati nelle altre specie sono stati raggruppati, sulla base del principale quadro patologico, all'interno della categoria di enteropatia (lesioni infiammatorie o degenerative) e ad altra patologia (trauma, sindrome emorragica o congestizia, malattia degenerativa o autolisi *post-mortem*).

Microbiologia

Isolamento e identificazione di *Clostridium perfringens*

Circa 0,5 g di materiale prelevato dagli organi colpiti o dal contenuto intestinale sono stati sospesi in 2 ml di brodo di carne. Un ml di sospensione è stato inoculato in brodo tioglicollato (BioMérieux sa, Marcy l'Etoile, France) e incubato a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore. Circa

0,1 ml della coltura è stato seminato, mediante ansa, in agar sangue (BioMérieux sa) e le piastre incubate, in anaerobiosi, a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore. Le colonie sospette di *C. perfringens* sono state ripassate in agar sangue, incubate in anaerobiosi e le colonie pure analizzate mediante colorazione di Gram e test della catalasi e dell'ossidasi. L'identificazione biochimica è stata eseguita con kit commerciale (API 20A™, BioMérieux sa). I ceppi isolati sono stati sospesi in microbank e conservati a -80°C .

Analisi del DNA

L'estrazione di DNA è stata eseguita mediante UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, California, USA), secondo istruzioni della ditta produttrice, su cinque colonie di ciascun ceppo di *C. perfringens*.

Il DNA estratto è stato prima selezionato sulla base della conferma molecolare di *C. perfringens* mediante 16S rDNA PCR come descritto da Wang *et al.* (16) e successivamente testato per i geni *cpa*, *cpb1*, *cpb2*, *cpetx*, *cpj* e *cpe* mediante PCR secondo metodica descritta da

Baums *et al.* (3) e da Yoo *et al.* (17), come messa a punto da Drigo *et al.* (5), secondo le procedure di laboratorio dell'IZS A&M. In breve, è stata utilizzata una PCR multiplex per rilevare la presenza dei geni *cpa*, *cpb1*, *cpetx* e *cpj* e una PCR duplex per rilevare i geni *cpb2* e *cpe*. La PCR multiplex è stata realizzata in una miscela di 25 µl contenente 2,5 mM MgCl₂, 250 µM di ciascun dNTP, 0,05U/µl di AmpliTaq Gold® DNA polymerase (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA) e 0,1 µM di ognuno dei primer elencati in Tabella I. La PCR duplex è stata realizzata in una miscela di 25 µl contenente 1,5 mM MgCl₂, 250 µM di ciascun dNTP, 0,05 U/µl di AmpliTaq Gold® DNA polymerase e 0,1 µM di ognuno dei primer elencati in Tabella II. I cicli della reazione sono stati: denaturazione iniziale, comune ad entrambe le PCR, di 2 min e 30 sec a 95°C seguita da 35 cicli di 1 min a 95°C , 1 min a 60°C con PCR multiplex e 54°C con PCR duplex, 1 min 20 sec a 72°C , fase di estensione finale di 2 min a 72°C . I prodotti PCR sono stati separati mediante elettroforesi su gel di Agarosio 1,5% (Eppendorf Italia,

Tabella I

Multiplex PCR: sequenze nucleotidiche bersaglio dei geni delle tossine e lunghezza dei prodotti di amplificazione

| Gene | Sequenza nucleotidica (5'-3') | Lunghezza dell'amplicone (pb) | Riferimento bibliografico |
|------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| <i>cpa_for</i> | AGT CTA CGC TTG GGA TGG AA | 900 | Baums <i>et al.</i> (3) |
| <i>cpa_rev</i> | TTT CCT GGG TTG TCC ATT TC | | |
| <i>cpb1_for</i> | TCC TTT CTT GAG GGA GGA TAA A | 611 | Baums <i>et al.</i> (3) |
| <i>cpb1_rev</i> | TGA ACC TCC TAT TTT GTA TCC CA | | |
| <i>cpetx_for</i> | ACT GCA ACT ACT ACT CAT ACT GTG | 541 | Yoo <i>et al.</i> (17) |
| <i>cpetx_rev</i> | CTG GTG CCT TAA TAG AAA GAC TCC | | |
| <i>cpj_for</i> | AAA CGC ATT AAA GCT CAC ACC | 293 | Baums <i>et al.</i> (3) |
| <i>cpj_rev</i> | CTG CAT AAC CTG GAA TGG CT | | |

Tabella II

Duplex PCR: sequenze nucleotidiche bersaglio dei geni delle tossine e lunghezza dei prodotti di amplificazione

| Gene | Sequenza nucleotidica (5'-3') | Lunghezza dell'amplicone (pb) | Riferimento bibliografico |
|-----------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| <i>cpe_for</i> | TGG GAA CTT CGA TAC AAG CA | 396 | Baums <i>et al.</i> (3) |
| <i>cpe_rev</i> | TTA ACT CAT CTC CCA TAA CTG CAC | | |
| <i>cpb2_for</i> | CAA GCA ATT GGG GGA GTT TA | 200 | Baums <i>et al.</i> (3) |
| <i>cpb2_rev</i> | GCA GAA TCA GGA TTT TGA CCA | | |

Milano, Italia) addizionato con Sybr® Safe 1X (Invitrogen Ltd, Paisley, UK). Il gel è stato visualizzato con transilluminatore a UV e l'immagine è stata catturata mediante Chemilmager™ 5500 Version 3.4 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, California, USA).

Controlli positivi di *C. perfringens* sono stati: il ceppo enterotossina-tossinogeno ATCC 27324 Tipo E, il ceppo NCTC 3180 Tipo C, il ceppo NCTC 8346 Tipo D e un ceppo β2-tossinogeno Tipo A di campo.

Risultati

Collezione ceppi di origine cunicola

I ceppi di *C. perfringens* di origine cunicola sono risultati del genotipo che esprime il gene *cpa* o del genotipo che esprime il gene *cpa* in combinazione con il gene *cpb2*. La Tabella III

mostra la distribuzione dei ceppi di *C. perfringens* di origine cunicola per profilo patologico e per risultato della genotipizzazione delle tossine. Diciassette ceppi su diciannove esaminati sono associati con enteropatie non infiammatorie. Nessuno dei due genotipi ha prevalso nella distribuzione per profilo patologico.

Collezione ceppi provenienti da altri animali

I ceppi di *C. perfringens* provenienti da altri animali, come quelli di origine cunicola, sono risultati del genotipo che esprime il gene *cpa* o del genotipo che esprime il gene *cpa* in combinazione con il gene *cpb2*. La Tabella IV mostra la distribuzione dei due genotipi per profilo patologico. *C. perfringens* è stato isolato prevalentemente in animali morti per enteropatia congestizio-emorragica e, in minor

Tabella III
Profili patologici associati a isolamento di *Clostridium perfringens* nel Coniglio e risultati della tossino-genotipizzazione

| Profilo patologico | No. | Genotipo (n) | |
|---|-----|--------------|-----------------|
| | | <i>cpa</i> | <i>cpa+cpb2</i> |
| Enterotiflite | 2 | 1 | 1 |
| Gonfiore addominale, fluidificazione del contenuto del cieco, assenza di flogosi intestinale | 8 | 5 | 3 |
| Dilatazione dell'intestino tenue, costipazione del cieco, contenuto mucoide nel colon, assenza di flogosi intestinale | 9 | 6 | 3 |
| Totale | 19 | 12 | 7 |

Tabella IV
Profili patologici associati a isolamento di *Clostridium perfringens* da animali oggetto di attività autoptica e risultati della tossino-genotipizzazione

| Profilo patologico | Animali coinvolti (n) | No. | Genotipo (n) | |
|--|--|-----|--------------|-----------------|
| | | | <i>cpa</i> | <i>cpa+cpb2</i> |
| Enteropatia a carattere infiammatorio | | | | |
| Sindrome emorragica | Bovino (4), cane (7), pollame (2), pecora (2), capra, ratto, suino | 18 | 12 | 6 |
| Congestione, necrosi | Bovino, cane, pecora, pollame | 4 | 4 | 0 |
| Altre patologie | | | | |
| Morte traumatica | Fauna selvatica (2), cane, pecora | 4 | 3 | 1 |
| Sindrome congestizio-emorragica | Cane (2), suino (2) | 4 | 3 | 1 |
| malattia degenerative o autolisi post-mortem | Cane (2), capra (2), pollame (2), suino (2) gatto, fauna selvatica, bovino | 11 | 10 | 1 |
| Totale | | 41 | 32 | 9 |

misura, in animali morti per trauma o malattia degenerativa e in organi con autolisi *post-mortem*. Il genotipo *cpa* + *cpb2* è stato rilevato nel 27,3% di animali morti per lesioni intestinali e nel 15,8% di quelli con altre patologie. Questo genotipo è stato isolato in cane (3 casi con enteropatia emorragica e 3 casi con altre patologie), bovino, pecora e capra (3 casi con enteropatia emorragica).

I principali risultati del nostro studio sono stati i seguenti:

- soltanto il tossinotipo A di *C. perfringens* è stato trovato in 60 ceppi provenienti da conigli (19 ceppi), bovini (6 ceppi) pecore e capre (7 ceppi), maiali (5 ceppi), polli (5 ceppi), cani (13 ceppi), animali selvatici (3 ceppi), gatto e topo (1 ceppo ciascuno);
- il genotipo che possiede il gene *cpa* che codifica la tossina α è stato trovato in circa il 73% dei ceppi;
- il genotipo che possiede i geni *cpa* + *cpb2* che codificano le tossine α e β 2 è stato riscontrato in circa il 27% dei ceppi;
- nessuna chiara associazione è stata rilevata tra il genotipo *cpb2* e specifici quadri patologici nelle varie specie;
- circa il 90% dei ceppi di *C. perfringens* isolati da conigli con enteropatia è stato associato a forme di enteropatie non infiammatorie.

Discussione

Il protocollo PCR usato in questo studio è risultato adeguato per determinare il potenziale genetico di produzione delle tossine da parte dei ceppi di *C. perfringens*. Al fine di stabilire la capacità di *C. perfringens* di causare enterotossitemia fatale, sarebbe opportuno considerare i relativi quadri patologici. È probabile, infatti, che circa il 46% dei ceppi di *C. perfringens* isolati con l'attività di necroscopia non siano da considerare causa primaria di malattia fatale dell'animale (casi mortali di malattia traumatica, sindrome emorragica e degenerativa). I risultati di questa ricerca confermano l'ampia diffusione del tossinotipo A tra le specie animali. Il genotipo che esprime solo il gene *cpa* ha caratterizzato il 73,3% dei ceppi esaminati (63,2% di origine cunicola, 78,1% provenienti da altre specie). Il 36,8% dei ceppi di conigli e il 21,9% dei ceppi

delle altre specie animali hanno espresso anche il gene *cpb2*. Simili dati epidemiologici sono riportati anche da autori italiani in recenti studi riguardanti il coniglio (4) e altre specie animali (K. Forti & M. Cagiola, dati non pubblicati). I ceppi di *C. perfringens* tipo A β 2-tossinogeni mostrano un'azione sinergica delle tossine α e β 2 determinante un aumento delle lesioni intestinali emorragiche e necrotiche nell'enterotossitemia del bovino (10).

Al contrario, il rilievo dei genotipi *cpb2* e *cpa* in ceppi di *C. perfringens* isolati in animali sani rafforza il ruolo dei fattori predisponenti nella patogenesi dell'enterotossitemia clostridica, quali il cambiamento improvviso di alimentazione o presenza di fattori alimentari inattivanti la tripsina (14). La rapida moltiplicazione di *C. perfringens* nell'intestino tenue è essa stessa fattore di patogenicità del batterio con l'acquisizione di elementi extracromosomiali contenenti geni addizionali di tossine (12). Queste considerazioni possono supportare la discussione riguardo al ruolo di *C. perfringens* nelle enteropatie non infiammatorie del coniglio. I quadri patologici associati a circa il 90% dei ceppi di *C. perfringens* di origine cunicola esaminati in questo studio sono, infatti, compatibili con l'enteropatia epizootica del coniglio. Questa enteropatia non infiammatoria del coniglio in accrescimento, diffusa in Europa fin dal 1998 (7), ha richiesto, per il suo controllo, la medicazione del mangime con antibiotici efficaci verso i batteri gram positivi, quali la Zn-bacitracina e l'avilamicina (1, 2). Anche se ad oggi l'eziologia dell'ERE rimane sconosciuta, in un recente articolo Licois & Marlier (8) hanno suggerito che nella malattia potrebbe essere coinvolto un batterio anaerobio che produce una tossina sconosciuta, attiva nella prima fase dell'infezione. *C. perfringens* avrebbe il ruolo di agente responsabile nei casi di elevata mortalità osservata in corso di ERE spontanea.

Ringraziamenti

Si ringrazia il dottor Fabrizio Agnoletti dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Treviso, Italia per aver fornito il ceppo β 2-tossinogeno Tipo A di campo.

Bibliografia

1. Anon. 2002. Ordinanza del Ministro della Salute (OM) del 7 Maggio 2002. Piano controllato d'impiego sperimentale della Zincobacitracina per l'enterocolite enzootica dei conigli. *Gazz Uff*, SG **137** del 13 Giugno 2002.
2. Anon. 2006. Circolare del Ministro della Salute del 4 Agosto 2006. Disposizioni in merito alla sperimentazione multicentrica dell'Avilamicina nel coniglio per il controllo dell'enterotossiemia da *Clostridium* spp. Documento No. DGVA/XV28658/P del 4 Agosto 2006, Roma.
3. 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.
4. 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. In Proc. 9th World Rabbit Congress, 10-13 June, Verona. World Rabbit Science Association, Valencia, 921-924.
5. Drigo I., Agnoletti F., Bacchin C., Bettini F., Cocchi M., Ferro T., Marcon B. & Bano L. 2008. Toxin genotyping of *Clostridium perfringens* field strains isolated from healthy and diseased chickens. *Ital J Anim Sci*, **7**, 397-400.
6. Gibert M., Jolivet-Renaud C. & Popoff M.R. 1997. Beta 2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene*, **203**, 65-73.
7. Licois D., Wyers M. & Coudert P. 2005. Experimental rabbit enteropathy: experimental transmission and clinical characterisation. *Vet Res*, **36**, 313-601.
8. Licois D. & Marlier D. 2008. Pathologies infectieuses du lapin en élevage rationnel. *INRA Prod Anim*, **21** (3), 257-268.
9. Mainil J.G. (ed.) 2006. *Clostridia* in medical, veterinary and food microbiology. Diagnosis and typing. Quality validation date: 2006-06-22. European concerted action QLK2-CT2001-01-01267. European Commission, Cordis, Brussels, EUR 21463 EN, 214 pp (cordis.europa.eu/search/index.cfm?fuseaction=lib.document&DOC_LANG_ID=EN&DOC_ID=82935402&pid=0&q=F585833AB64D3954991DE8C5A50960D2&type=sim ultimo accesso il 6 Febbraio 2010).
10. Manteca C., Daube G., Jauniaux T., Linden A., Pirson V., Detilleux J., Ginter A., Coppe P., Kaeckenbeeck A. & Mainil J.G. 2002. A role for the *Clostridium perfringens* β 2 toxin in bovine enterotoxaemia? *Vet Microbiol*, **86** (3), 191-202.
11. Marlier D., Dewrée R., Lassence C., Licois D., Mainil J., Coudert P., Meulemans L., Ducatelle R. & Vindevogel H. 2006. Infectious agents associated with epizootic rabbit enteropathy: isolation and attempts to reproduce the syndrome. *Vet J*, **172** (3), 493-500.
12. Petit L., Gibert M. & Popoff M.R. 1999. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol*, **7** (3), 104-110.
13. Scacchia M. (ed.) 2008. Studio sull'Enterocolite Epizootica del Coniglio. Programma di miglioramento della qualità della gestione dell'offerta delle produzioni cunicole e di rafforzamento dei rapporti di filiera, action 4.3. Avitalia/IZS A&M, Forlì, Teramo, 34 pp (www.coniglionline.com/Documenti/enterocolite_epizootica.pdf ultimo accesso il 6 Febbraio 2010).
14. Schotte U., Truyen U. & Neubauer H. 2004. Significance of β 2-toxigenic *Clostridium perfringens* infections in animals and their predisposing factors – a review. *J Vet Med B*, **51**, 423-426.
15. Szalo I.M., Lassence C., Licois D., Coudert P., Poulipoulis A., Vindevogel H. & Marlier D. 2007. Fractionation of the reference inoculum of epizootic rabbit enteropathy in discontinuous sucrose gradient identifies aetiological agents in high density fractions. *Vet J*, **173** (3), 652-657.
16. Wang R.F., Cao W.W., Franklin W., Campbell W. & Cerniglia C.E. 1994. A 16S rDNA-based PCR method for rapid and specific detection of *Clostridium perfringens* in food. *Mol Cell Probes*, **8** (2), 131-137.
17. 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** (1), 228-232.