

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* ISOLATI DA TACCHINO

Berto G.¹, Giovanardi D.², Drigo I.¹, De Vidi B.¹, Agnoletti F.¹, Viel L.¹, Capello K.³, Bano L.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Diagnostica di Treviso, Vicolo Mazzini 4, 31020, Villorba, Treviso

² Laboratorio Tre Valli, Viale Apollinare Veronesi 5, 37132 San Michele Extra, Verona

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Epidemiologia Veterinaria, Viale dell'Università 10, 35020, Legnaro

Summary

One hundred and six *Clostridium perfringens* field strains isolated from turkeys have been toxinogenotyped by PCR protocols previously described. Strains derived from intestines (87), livers (17) and subcutis (2). In addition to the four major toxins, strains have been screened also for NetB, enterotoxin and beta2 toxin encoding genes and the genotype was correlated with gross lesions and the presence of coccidia.

All the isolates resulted toxinotype A and NetB negative. Enterotoxin encoding gene has been detected in 2/106 (1.8%) strains and beta2 in 76/106 (71.6%). The Toxinotype results are consistent with the few published reports concerning genetic characterization of *C. perfringens* of turkey origin. On the contrary, results obtained for NetB and beta2 genes differ substantially from what obtained in other countries where they have been detected only in the 6.6% and in the 0.5% of the tested strains, respectively.

Necrotic enteritis in turkey resulted statistically correlated neither to the genetic virulence factors investigated, nor to the synergistic effect operated by coccidia, even if the majority of birds with NE lesions (68%) tested positive also for these protozoa.

INTRODUZIONE

L'enterite necrotica (NE) è la patologia ad eziologia clostridica più nota e studiata nel pollo a causa dell'ingente impatto economico da essa determinato, legato al decadimento delle performance zootecniche ed ai costi sostenuti per le terapie dei gruppi colpiti.

L'NE è causata da *Clostridium perfringens*, un bacillo Gram-positivo, anaerobio, sporigeno e ampiamente distribuito nell'ambiente e nell'intestino di uomo e animali. Viene storicamente classificato in 5 tossinotipi (A-E) a seconda della produzione delle tossine α , β , ϵ e ι definite "maggiori". Tutti i tossinotipi producono la tossina α e, in aggiunta a questa, il tossinotipo "B" produce la β e la ϵ , il "C" la β , il "D" la ϵ e il tossinotipo "E" la ι . Sebbene questa classificazione abbia permesso di individuare dei tossinotipi collegati a specifiche malattie dei mammiferi, nel pollame sia i ceppi in grado di produrre NE che quelli apatogeni appartengono unicamente al tossinotipo "A" (Keyburn *et al.*, 2006).

Tra i fattori di virulenza prodotti da *C. perfringens* responsabili di patologie

dell'apparato gastroenterico, vi sono la tossina $\beta 2$ e l'enterotossina. La prima sembra rivestire un ruolo importante nell'enterite necrotica del suino (Klasen *et al.*, 1999), nell'enterocolite del cavallo (Herholz *et al.*, 1999) e nell'enterotossinemia del bovino (Manteca *et al.*, 2002), mentre l'enterotossina è associata principalmente a casi di tossinfezione alimentare nell'uomo (Brynstad and Granum, 2002).

Nello studio dell'NE del pollo si è giunti ad individuare una "pore forming toxin" denominata NetB, che oggi appare fortemente coinvolta nella patogenesi della malattia (Keyburn *et al.*, 2008). In uno studio effettuato in Italia il gene codificante questa tossina (*netB*), è stato evidenziato in circa il 93% dei ceppi isolati da polli con NE (Drigo *et al.*, 2009), mentre in uno studio analogo condotto sul tacchino, non era stata individuata in nessuno dei 25 ceppi testati (Saita *et al.*, 2009). Gli studi di tossinotipizzazione eseguiti su ceppi di *C. perfringens* isolati da tacchino non sono molti, e riguardano prevalentemente ceppi provenienti da campioni di carne prelevata direttamente nei punti vendita (Erol *et al.*, 2008; Aras *et al.*, 2015). In tali lavori tutti i ceppi isolati appartenevano al solo tossinotipo "A" e veniva segnalata la sporadica presenza anche del gene codificante l'enterotossina mentre la tossina NetB e beta2 non erano state indagate.

In un lavoro condotto in allevamenti di tacchini era stato ricercato sia il gene *netB* che quello codificante la tossina beta2 (*cpb2*). Il primo era stato rilevato nel 6,6% (tutti i soggetti con NE) e il secondo nello 0,5 dei ceppi testati (n° 212) (Lyhs *et al.*, 2013).

Nel presente studio vengono riportati i dati di caratterizzazione molecolare di ceppi di *C. perfringens* isolati da tacchini commerciali. I dati ottenuti da soggetti con lesioni dell'apparato gastroenterico sono stati messi in relazione alla gravità delle lesioni osservate e alla presenza di coccidi.

MATERIALI E METODI

Campionamento

L'indagine ha riguardato 106 ceppi di *C. perfringens* isolati tra il 2006 e il 2015 da 88 tacchini da carne e 23 riproduttori conferiti presso il laboratorio diagnostico per i consueti accertamenti.

I soggetti avevano un'età compresa tra 1 e 55 settimane ed erano stati selezionati sulla base di manifestazioni diarroiche e/o anomalo aumento della mortalità, osservati in allevamenti diversi o in cicli produttivi diversi.

Gli isolamenti erano stati ottenuti da organi/tessuti con lesioni macroscopicamente evidenti. In particolare: 87 ceppi erano stati isolati da tratti intestinali interessati da enterite (catarrale o necrotica), 17 da fegati con lipidosi/degenerazione epatica, 2 da essudato sottocutaneo di soggetti con dermatite gangrenosa.

I contenuti intestinali, i fegati e il liquido siero emorragico sottocutaneo sono stati seminati singolarmente in terreno agarizzato addizionato con sangue di montone al 5 % (OXOID). Le piastre sono state incubate a 37 °C per 24 ore in condizioni di anaerobiosi. L'identificazione su base biochimica è stata ottenuta impiegando la galleria miniaturizzata rapid ID 32 A (bioMerièux).

Accertamenti diagnostici collaterali

In presenza di lesioni dell'apparato gastroenterico si era proceduto alla valutazione semiquantitativa delle oocisti coccidiche attraverso l'osservazione microscopica (100X) diretta del raschiato intestinale. In base al numero di oocisti presenti in ciascun campo visivo, il grado di parassitosi coccidica era stato classificato in 3 categorie: grado 1 (1-10 oocisti), grado 2 (11-50 oocisti), grado 3 (> 50 oocisti).

Caratterizzazione molecolare

I ceppi di *C. perfringens* sono stati sottoposti ad estrazione automatica del DNA attraverso il kit Mag Max Total Nucleic Acid Extraction Kit (Ambion).

Si è quindi proceduto alla tossinotipizzazione degli isolati ricercando i geni *cpa*, *cpb1*, *cpetx*, e *cpi* codificanti rispettivamente le tossine maggiori α , β , ϵ , ι . Inoltre è stata ricercata la presenza dei geni codificanti l'enterotossina (*cpe*), la tossina NetB (*netB*) e la tossina β_2 (*cpb2*) utilizzando protocolli di PCR pubblicati (Yoo *et al.*, 1997; Garmony *et al.*, 2000; Baums *et al.*, 2004; Keyburn *et al.*, 2006). I ceppi di *C. perfringens* di riferimento utilizzati come controllo positivo per i geni target indagati sono stati: ATCC 27324 (tossinotipo E + enterotossina), CCUG 2036 (tossinotipo C), CCUG 2037 (tossinotipo D), ATCC 10543 (tossinotipo A+ b2).

Come controllo positivo per il gene *netB* è stato utilizzato il ceppo cortesemente fornito dal Prof. Van Immerseel (Università di Ghent), confermato mediante sequenziamento dell'amplificato.

Analisi statistica

Il test di Fisher è stato applicato per studiare possibili associazioni tra NE e i gradi 2 e 3 di infestazione coccidica. Lo stesso test è stato utilizzato per indagare possibili correlazioni tra la gravità del quadro gastroenterico osservato e l'infezione da parte di ceppi *cpb2*-positivi.

RISULTATI

Tutti gli isolati appartenevano al tossinotipo A, 76/106 sono risultati *cpb2* positivi e 2 erano positivi anche al gene *cpe*. La positività a *cpb2* non è risultata significativamente associata alla gravità della lesione (enterite catarrale vs necrotica). Nessun ceppo è risultato *netB* positivo.

La presenza di coccidi è stata rilevata in tacchini d'età compresa tra 21 e 98 giorni, e solo in soggetti da carne, con le infestazioni più gravi (score "3") riscontrate tra il 22° e il 35° giorno di vita. Sebbene la presenza di coccidi sia stata osservata in un maggior numero di soggetti con NE rispetto a quelli con enterite catarrale (68% vs 32%), tale differenza non è risultata essere statisticamente significativa, nemmeno considerando i diversi gradi di coccidiosi.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il risultato di tossinotipizzazione ottenuto è in accordo con quanto già riportato in altri studi condotti su ceppi di *C. perfringens* isolati da tacchino in cui era stato rilevato il solo tossinotipo "A" (Erol *et al.*, 2008; Saita *et al.*, 2008; Lyhs *et al.*, 2013; Aras and Hadimli, 2015).

Le differenze maggiori riguardano principalmente il gene *cpb2* che, in uno studio

condotto su 212 *C. perfringens* isolati da tacchini, era stato rilevato solo in 1 ceppo (Lyhs *et al.*, 2013). E' possibile che la discordanza dei risultati ottenuti nel nostro studio rispetto a quelli di Lyhs e coll. (2013) sia imputabile al differente protocollo di PCR da noi adottato (Garmory *et al.*, 2000); d'altra parte quest'ultimo si era dimostrato capace di individuare alcuni ceppi di referenza *cpb2* positivi, come anche confermato dal successivo sequenziamento genico, non rilevati, invece, con il protocollo proposto da Baums nel 2004 (3).

Il gene *cpb2* non è risultato significativamente correlato alla gravità della lesione osservata macroscopicamente ed è stato rilevato anche in ceppi isolati da fegato e muscolo di soggetti non interessati da sintomatologia enterica. Questo lascia sospettare un ruolo marginale della tossina β_2 nelle forme enteriche del tacchino.

Nel presente studio il gene *netB* non è stato rilevato in alcun ceppo mentre nella ricerca condotta su ceppi finlandesi di tacchino il 6,6% era risultato *netB*-positivo e tali ceppi erano stati isolati tutti da soggetti con NE (Lyhs *et al.*, 2013). Anche in quello studio non tutti i ceppi isolati da NE erano risultati *netB*-positivi, lasciando ipotizzare l'implicazione di altri fattori di virulenza, forse non ancora noti, nell'eziopatogenesi dell'NE del tacchino. Come nel pollo anche nel tacchino non si esclude che fattori predisponenti alimentari, parassitari o immunodepressivi (es. adenovirus dell'enterite emorragica) possano agire sinergicamente a *C. perfringens* e causare l'NE.

BIBLIOGRAFIA

1. Aras Z., Hadimli H. H. 2015. Detection and molecular typing of *Clostridium perfringens* isolates from beef, chicken and turkey meats. *Anaerobe* 32, 15-17.
2. from beef, chicken and turkey meats
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. Brynestad S., Granum P. E. 2002. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology* 74, 195– 202.
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. Erol I., Goncuoglu M., Ayaz N. D., Bilir Ormanci F. S., Hildebrandt G. 2008. Molecular typing of *Clostridium perfringens* isolated from turkey meat by multiplex PCR. *Letters in Applied Microbiology* 47, 31–34.
7. Garmory HS, Chanter N, French NP, Bueschel D, Songer JG, Titball RW. 2000. Occurrence of *Clostridium perfringens* b2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiol Infect.*, 124, 61-67.
8. Herholz, C., Miserez, R., Nicolet, J., Frey, J., Popoff, M.R., Gibert, M., Gerber, H., Straub, R., 1999. Prevalence of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. *J. Clin. Microbiol.* 37, 358–361.
9. Keyburn, A.L., Sheedy, S.A., Ford, M.E, Williamson, M.M., Award, M.M, Rood, J.I., Moore, R.J., 2006. Alpha Toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infect. Immun.* 74:6496-6500.

10. Keyburn, L., Boyce, J.D, Vaz, P., Bannam., T. L., Ford, M.E., Parker, D., Di Rubbo, A., Rood, J. I, Moore, R. J., 2008. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog.* 4: 0001-0011.
11. Klaasen, H.L.B.M., Molkenboer, M.J.C.H., Bakker, J., Miserez, R., Hani, H., Frey, J., Popoff, M.R., van den Bosch, J.F., 1999. Detection of the beta2 toxin gene of *Clostridium perfringens* in diarrheic piglets in The Netherlands and Switzerland. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 24, 325–332.
12. Lyhs U., Perko-Mäkelä P., Kallio H., Brockmann A., Heinikainen S., Tuuri H., Pedersen K. 2013. Characterization of *Clostridium perfringens* isolates from healthy turkeys and from turkeys with necrotic enteritis. *Poultry Science* 92 :1750–1757.
13. Manteca, C., Daube, G., Jauniaux, T., Linden, A., Pirson, V., Dettileux, J., Ginter, A., Coppe, P., Kaeckenbeeck, A., Mainil, J.G., 2002. The role of *Clostridium perfringens* beta2-toxin in bovine enterotoxemia? *Vet. Microbiol.* 86, 191–202.
14. Saita, M., Bano, L., Gallazzi, D., 2008. Pathogenicity markers of *Clostridium* spp. in commercial turkeys. *Ital.J.Anim.Sci.* vol. 8, 781-784.
15. 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.