

GENOTIPADO DE CEPAS DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS EN CONEJOS AFECTADOS POR ENTEROPATÍA EPIZOOTICA

Menoyo, D., García, C., Jarava, M. y De Blas, C.

Departamento de Producción Animal, Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid, España. David.menoyo@upm.es

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades entéricas de origen bacteriano en las fases de crecimiento y cebo siguen siendo un factor importante que influye tanto en la sanidad como en la productividad de los animales domésticos, constituyendo la principal causa de morbilidad y mortalidad en conejos en crecimiento (Marlier et al., 2003). Desde su aparición en granjas europeas en 1997, la Enteropatía Epizootica del Conejo (EEC) ha constituido una fuente de pérdidas económicas importantes en el sector cunícola (Licois et al., 2006). Aunque no se ha identificado su etiología, investigaciones recientes sugieren una o varias bacterias como agentes causales (Huybens et al., 2008). Además, varios autores han mostrado que Clostridium perfringens puede jugar un papel principal en esta patología, debido a su elevada proliferación en el tracto de los animales afectados por EEC (Marlier et al., 2003). Romero et al. (2009) encontraron una correlación positiva entre elevados contenidos cecales de Clostridium perfringens ($> 2 \times 10^9$ ufc/g) y la aparición de síntomas de EEC durante el periodo de cebo. Asimismo, la frecuencia de detección de Clostridium perfringens en contenido digestivo (y también, en menor proporción, Campylobacter spp.) analizada por técnicas RFLP fue correlacionada positivamente con la mortalidad por ERE (Chamorro et al., 2007).

Clostridium perfringens es una bacteria Gram positiva anaerobia, capaz de formar esporas. Está ampliamente extendida en el ambiente y puede ser aislada a partir de suelo, aguas residuales, heces, alimento y tracto intestinal de humanos y animales. La patogenicidad del organismo se asocia con varias toxinas. Dependiendo de la producción y combinación de las distintas toxinas (alfa (α), beta (β), epsilon (ϵ), iota (ι), beta-2 (β -2) y enterotoxina (cpe)), las cepas de Clostridium perfringens se dividen en distintos toxinotipos, que presentan varios genotipos posibles según sean capaces de producir una combinación u otra de toxinas (Baums et al., 2004). El objetivo del presente trabajo es genotipar mediante la técnica de PCR los toxinotipos de Clostridium perfringens asociados a la EEC en muestras obtenidas de conejos enfermos. La identificación de los distintos toxinotipos es esencial para entender y prevenir la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales: Un total de 72 conejos Nueva Zelanda x California se incluyeron en este estudio. Tras el destete a los 35 días, se efectuó un seguimiento diario de los animales para detectar síntomas de EEC: disminución de la ingesta de alimento, diarrea acuosa, distensión de estómago e intestino delgado y contenido cecal compactado o líquido (Licois et al., 2006). Tanto de los animales que causaron baja durante el cebo como de aquellos sacrificados con síntomas claros de EEC se tomaron muestras de contenido cecal o ileal y/o cecotrofos y se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis. Todas las muestras fueron recogidas entre los meses de enero de 2008 y marzo de 2009 en las instalaciones del Departamento de Producción Animal de la E.T.S.I. Agrónomos que se encuentran afectadas y diagnosticadas de EEC.

Extracción de ADN: Se utilizaron dos métodos de extracción uno para las muestras recogidas durante enero-junio de 2008 y otro para las muestras de noviembre 2008 y marzo 2009. En el primer caso la muestras fueron diluidas (1/10) y homogeneizadas en agua de peptona (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Posteriormente se sembraron 0.5ml de la dilución en placas de agar sangre al 5% (bioMérieux). Las placas se incubaron en anaerobiosis a 37°C durante 24 horas. Las colonias resultantes que mostraban el doble halo característico de Clostridium perfringens fueron de nuevo sembradas en agar sangre bajo las mismas condiciones hasta obtenerse un cultivo puro. La extracción de ADN se realizó a partir de los cultivos puros utilizando cloroformo y tratamientos de shock térmico. Para el resto de las muestras se aplicó el método de extracción empleado por Gurjar et al. (2008) con pre-enriquecimiento de la muestra en medio reforzado para Clostridium y posterior

extracción de ADN con el kit de QIAGEN (QIAmp DNA Stool Mini Kit for Pathogen Detection).

Condiciones de PCR: Para la identificación de las secuencias diana de cada una de las toxinas se utilizaron los juegos de cebadores publicados por Baums et al. (2004) y Gurjar et al. (2008). En la Tabla 1 podemos ver las secuencias nucleotídicas de los cebadores empleados indicándose además el tamaño del amplicón. Por cada muestra se hicieron 3 PCR Duplex, uno para amplificar las toxinas α e ι , otro para la amplificación de β y $\beta 2$, y el último para detectar las toxinas ε y enterotoxina. La concentración de magnesio, cebadores y ADN polimerasa (Applied Biosystems) así como el programa de temperaturas del termociclador se ajustaron experimentalmente en base a lo indicado en Baums et al. (2004) y Gurjar et al. (2008).

Análisis de los productos de PCR: Los fragmentos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se visualizaron bajo luz UV con el analizador de imágenes Gel Doc 1000 System (Bio-Rad, Munich, Germany).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos del genotipado de las 72 muestras recogidas en animales con síntomas de EEC. En el 34.72 % de los aislados no se detectó ningún tipo de toxinas. Este resultado coincide con lo observado por Marlier et al. (2006) que no fueron capaces de detectar la toxina alfa en algunos animales afectados por EEC. El 62.5% de las cepas aisladas correspondieron al toxinotipo A de *C. perfringens* siendo la mayoría positivas para la toxina α exclusivamente (58.33%), encontrándose además una muestra con genotipo α - $\beta 2$ y dos con genotipo α -cpe. Estos datos coinciden con lo observado por Licois et al. (2006) en conejos diagnosticados con enteropatía mucoide. Estos autores detectaron la presencia de ambos genotipos siendo el más común el toxinotipo A con toxina α en animales con contenido cecal líquido y el genotipo α - $\beta 2$ en animales con ciego compactado. Resultados similares fueron observados por Cocchi et al. (2007) en un muestreo de campo con 150 animales afectados por la enteropatía. El gen para la enterotoxina (cpe) también ha sido identificado en conejos afectados por EEC (Licois et al. 2006). La presencia de este gen en cepas de toxinotipo A esta muy relacionada con la aparición de diarreas en animales domésticos (Songer, 1996), por lo que sería necesario estudiar en profundidad el papel de las distintas toxinas α , $\beta 2$ y cpe asociadas al toxinotipo A en conejos afectados por EEC. En el presente estudio un 2.77% de las muestras fueron identificadas como toxinotipo E al mostrar genotipos α - ι y α , ι -cpe. La presencia de estos genotipos se ha identificado con enterotoxemias en animales domésticos incluido el conejo (Songer, 1996). Sin embargo, cabe destacar la similitud funcional de la toxina ι de *C. perfringens* con la toxina letal producida *Clostridium spiriforme* el cual ha sido aislado en conejos afectados por EEC (Marlier et al., 2006). En conclusión, en conejos afectados por EEC el toxinotipo A de *C. perfringens* es el más frecuente siendo el genotipo α el predominante encontrándose presentes también los genotipos α - $\beta 2$ y α -cpe.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baums, C.G., Schotte, U., Amsberg, G., Goethe, R. 2004. *Vet. Microbiol.* 100, 11-16. • Chamorro, S., Gómez-Conde, M.S., Pérez de Rozas, A.M., y col. 2007. *Animal* 1, 651-659. • Cocchi, M., Agnoletti, F., Bacchin, C., y col. 2007. *Atti Convegno Nazionale ASIC. Forlì*, 26-27th 67-69. • Gurjar, A.A., Hedge, N.V., Love, B.C., Jayarao, B.M. 2008. *Mol. Cel. Prob.* 22: 90-95. • Huybens, N., Houeix, J., Szalo, M., y col. 2008. 9th World Rabbit Congress. Verona, Italy: 500. • Licois, D., Coudert, P., Marlier, D. 2006. *Recent advances in rabbit sciences* (Maertens L., Coudert P. ed). Ed. Ilvo, Merelbeke, Belgium. pp. 163-170. • Marlier, D., Dewrée, R., Licois, D. y col. 2003. 10èmes Journées de la Recherche Cunicole, INRA-ITAVI, Paris, ITAVI éd. Paris: 247-250. • Marlier, D., Dewrée, R., Lassence, C., y col. 2006. *Vet. J.*, 172: 493-50. • Romero, C., Nicodemus, N., García-Rebollar, P., y col. 2009. *Anim. Feed Sci. Tech.* 153, 131-140. • Songer, J.G., 1996. *Clin. Microbiol. Rev.* 9, 216-234.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por CICYT: CICYT AGL 2008-00627 y por la UPM-CM: CCG07-UPM/AGR-1677.

Tabla 1. Secuencias nucleotídicas de los cebadores empleados para la amplificación por PCR de los genes de las toxinas α , ι , β , $\beta 2$, ϵ y enterotoxina de *Clostridium perfringens* tomadas de Baums et al. (2004) (2) y Gurjar et al. (2008) (1).

Toxina	Gen	Cebadores	Secuencia (5' - 3')	Amplificación (pb)
α	Cpa (1)	CPA 5F	TGCACTATTTTGGAGATATAGATAC	129
		CPA 5R	CTGCTGTGTTTATTTTATACTGTTTC	
ι	lap (2)	CPIF	AAACGCATTAAAGCTCACACC	293
		CPIR	CTGCATAACCTGGAATGCT	
β	Cpb (2)	CPBF	TCCTTTCTTGAGGGAGGATAAA	611
		CPBR	TGAACCTCCTATTTTGTATCCCA	
β -2	Cpb2 (2)	CPB2F	CAAGCAATTGGGGGAGTTTA	200
		CPB2R	GCAGAATCAGGATTTTGACCA	
enterotoxina	Cpe (2)	CPEF	GGGGAACCCTCAGTAGTTTCA	506
		CPER	ACCAGCTGGATTTGAGTTTAAATG	
ϵ	Etx (2)	CPETXF	TGGGAACTTCGATACAAGCA	396
		CPETXR	TTAACTCATCTCCATAACTGCAC	

Tabla 2. Frecuencia de toxinas y toxinotipos detectados en 72 muestras fecales aisladas de conejos con sintomatología de ERE.

Toxinas detectadas	Muestras	Toxinotipos
Ninguna	25/72(34.72%)	
.α	42/72 (58.33%)	A (62.5%)
.α , β-2	1/72 (1.38%)	
.α , cpe	2/72 (2.77%)	
.α , ι	1/72 (1.38%)	E (2.77%)
.α , ι, cpe	1/72 (1.38%)	

GENOTYPING OF CLOSTRIDIUM PERFRINGENS STRAINS IN RABBITS AFFECTED BY EPIZOOTIC ENTEROPATHY

ABSTRACT: Epizootic Rabbit Enteropathy (ERE) has become a major disease affecting intensive European farms. Although, the economic losses due to this disease are considerable, the aetiological agent or agents remain to be identified. *Clostridium perfringens* has been shown to play an important role in the development of ERE. *Clostridium perfringens* is an anaerobic, Gram-positive spore-forming bacterium that produces several pathogenic toxins associated with enteric diseases in domestic animals and humans. In the present work *Clostridium perfringens* toxin genes (α , β , ϵ , ι , β -2 and the enterotoxin) were studied by duplex PCR in DNA extracts from contents of the rabbit gastrointestinal tract and soft faeces to identify toxinotypes associated with the ERE. To this end a total of 72 rabbits displaying ERE symptoms were used. Most of the *Clostridium perfringens* isolated from diseased animals were classified as toxinotype A (62.5% of samples). The genotype α was the most abundant (58.3%) but also α - β 2 and α -cpe genotypes were found. Finally two strains of *Clostridium perfringens* isolated were classified as toxinotype E having the gene encoding the iota toxin. It is concluded that strains of *Clostridium perfringens* isolated from rabbits affected by ERE are mainly classified as toxinotype A.

Keywords: Epizootic Rabbit Enteropathy, *Clostridium perfringens*, genotyping, PCR.