

Technical: Development of multiplex PCR for identification of Clostridium chauvoei and Clostridium septicum

VETERINARIA (Montevideo) - Vol. 49 - # 192 - Año 2013 - P. 15 a 19

Autores: Cattáneo, M.[1],2, París, N.²; Campos, F.3, Bermúdez, J.^{1,2}

[1] Área de Bacteriología. Facultad de Veterinaria. UdelaR. Uruguay. catta1973uy@yahoo.es

2 Laboratorio de investigación y desarrollo. CCA. Laboratorios Santa Elena. Uruguay.

3 Facultad de Veterinaria de Porto Alegre. UFRGS. Brasil.

Recibido: 12/3/2012 - Aceptado: 13/4/2012



[ver versión PDF.](#)

[Introducción](#) | [Materiales y Métodos](#) | [Resultados](#) | [Discusión y Conclusión](#) | [Bibliografía](#)

Resumen

Se describe la puesta a punto de la técnica de PCR multiplex para detectar el gen que codifica para la flagelina de *Clostridium chauvoei* y el gen que codifica para la toxina alfa de *Clostridium septicum* a

partir de cultivos puros. Fueron utilizados primers específicos de los genes que codifican para la flagelina

Clostridium chauvoei

(516 pb) y la toxina alfa de

Clostridium septicum

(270 pb).

Las cepas estudiadas de

Clostridium chauvoei

y

Clostridium septicum

fueron detectadas por la técnica de PCR multiplex observándose solamente la amplificación de los productos esperados de 516 pb y 270 pb respectivamente. No se observaron reacciones cruzadas entre

Clostridium chauvoei

y

Clostridium septicum

ni con las otras especies de clostridios estudiadas. El PCR multiplex fue eficiente en detectar

Clostridium chauvoei

y

Clostridium septicum

en forma separada y en conjunto.

Palabras clave: *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, diagnóstico, PCR multiplex.

Summary

A multiplex PCR to detect the gene encoding the flagellin of *Clostridium chauvoei* and the gene encoding the alpha toxin from pure cultures was developed. Specific primers were used for genes encoding flagellin (516 bp) and alpha toxin (270 bp). The strains of *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei* were detected by multiplex PCR amplification. The expected products of 516 bp and 270 bp respectively were observed. There were no cross-reactions between *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei* or with other clostridial species studied. The multiplex PCR was efficient to detect *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei* separately and together.

Keywords: *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, diagnosis, PCR multiplex.

Introducción

Clostridium chauvoei (*C. chauvoei*) es el agente etiológico del carbunco sintomático y *Clostridium septicum*

(*C. septicum*)

es uno de los agentes etiológicos de la gangrena gaseosa. El diagnóstico de estas enfermedades se realiza en base a los hallazgos clínicos y patológicos, siendo difícil el diagnóstico etiológico a nivel de laboratorio debido a diferentes factores como son la no realización de necropsia, remisión de material en forma equivocada, falta de laboratorios, equipamiento y de personal capacitado para trabajar en bacterias anaerobias (Stern y Batty, 1978; Assis y col., 2002; Radostits y col., 2002). El diagnóstico de laboratorio de estos agentes es complicado y muchas veces lleva a confusión y al diagnóstico etiológico erróneo debido a que

C. septicum

tiene un crecimiento más rápido en los cultivos en placas de agar sangre que

C. chauvoei

lo que enmascara el diagnóstico final (Stern y Batty, 1978; Assis y col., 2001). Con la técnica de PCR multiplex se busca tener mayor precisión y rapidez en el diagnóstico de estos agentes (Takeuchi y col., 1997; Kojima y col., 2001). El objetivo de este trabajo es poner a punto la técnica de PCR multiplex para detectar el gen que codifica para la flagelina de

C. chauvoei

y el gen que codifica para la toxina alfa de

C. septicum

a partir de cultivos puros.

([Volver arriba](#))

Materiales y Métodos

Las cepas utilizadas en este trabajo se detallan en el cuadro 1.

Identificación	Precedencia
<i>Clostridium chauvoei</i> B017A	Laboratorio Santa Elena S.A. (SESA)
<i>Clostridium chauvoei</i> 10092	ATCC (American Type Culture Collection)
<i>Clostridium septicum</i> B023A	Laboratorio Santa Elena S.A. (SESA)
<i>Clostridium septicum</i> 61.10	Instituto Pasteur, París-Francia
<i>Clostridium novyi</i> tipo B IRP 307	CVB-APHIS, USA
<i>Clostridium novyi</i> 60.18	Instituto Pasteur, París-Francia
<i>Clostridium haemolyticum</i> IRP 315	CVB-APHIS, USA

Cuadro 1: Cepas utilizadas para la puesta a punto de la técnica de PCR multiplex

Las muestras de ADN fueron extraídas con dos métodos, por ebullición a 100 °C durante 20 minutos y con un kit marca SIGMA-NA2100 (Takeuchi y col., 1997; Kojima y col., 2001).

La PCR fue realizada en un volumen final de 25 µl, donde se variaron las concentraciones y volúmenes de MgCl₂ (Invitrogen), primers (ALFA), *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), y ADN

genómico hasta la puesta a punto de la técnica. Los primers utilizados para

C. chauvoei

fueron 5'ATCGGAAACATGAGTGCTGC 3' - 5'AGTCTTTATGCTTCCGCTAG 3'

y para

C. septicum

5'AATTCAGTGTGCGGCAGTAG 3'-5'CCTGCCCCAACTTCTCTTTT 3'

El tamaño

de los fragmentos esperados de la amplificación serian de 516 bp para

C. chauvoei

y de 270 bp para

C. septicum.

Fue utilizado un ciclo de desnaturalización de 94 °C / 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C / 30 segundos; 54 °C/ 30 segundos; 72 °C/ 1 minuto, y un ciclo de extensión de 72 °C / 7

minutos. Se trabajó con un termociclador INFINIGEN modelo TC-96CG. Se utilizaron como controles positivos las cepas de

C. chauvoei

10092 (ATCC) / BO17A (SESA) y

C. septicum

61.10 (Instituto Pasteur, Francia) / BO23A (SESA). Para evaluar la especificidad se utilizaron las cepas de

Clostridium sordellii

60.18 (Instituto Pasteur, Francia),

Clostridium novyi

tipo B IRP 307 (CVB-APHIS-USA) y

Clostridium haemolyticum

IRP 315 (CVB-APHIS-USA). Después de la PCR el material amplificado y separado por electroforesis fue visualizado en gel de agarosa al 1,5 % coloreado con Goodview

(Beijing SBS Genetech Co. Ltd) Fue usado un marcador de peso molecular de 100 pb DNA

Leader (Generuler – Fermentas). Todas las cepas fueron trabajadas con el mismo protocolo.

([Volver arriba](#))

Resultados

La técnica de PCR se estandarizó para las siguientes concentraciones y volúmenes: PCR buffer 1 x, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 20 pmol de cada primers de *C. chauvoei* y *C. septicum*, 2 ul de

ADN genómico de

C. chauvoei,

1 ul de ADN genómico de

C. septicum

y 1.0 U de Taq DNA polimerase. No se obtuvieron resultados satisfactorios utilizando la extracción de ADN por ebullición para el caso de

C. chauvoei

y si para

C. septicum

. La extracción con kit de SIGMA-NA2100 fue positivo para

C. chauvoei

y

C. septicum

(Figura1 y 2)

.

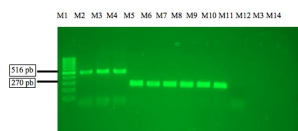


Figura 1:

- M1: marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder);
- M2 cepa *C. chauvoei* 10092;
- M3 cepa *C. chauvoei* B017A;
- M4 primers de *C. chauvoei* con ADN de *C. chauvoei* B017A y ADN de *C. septicum* 61.10;
- M5 cepa *C. septicum* 61.10;
- M6 cepa *C. septicum* B023A;
- M7 primers de *C. septicum* con ADN de *C. septicum* 61.10 y *C. chauvoei* 10092;
- M8 primers de *C. septicum* con ADN de *C. septicum* 61.10 y *C. chauvoei* B017A;
- M9 primers de *C. septicum* con ADN de *C. septicum* B023A y *C. chauvoei* 10092; M9

primers de

septicum

con ADN de

C. septicum

B023A y

C. chauvoei

B017A; M11 primers de

C. chauvoei

con ADN de

C. novyi

tipo B;

C.

- M12 primers de *C. septicum* con ADN de *C. sordelli*;
- M13 primers de *C. septicum* con ADN de *C. haemolyticum*;
- M14 Control negativo.

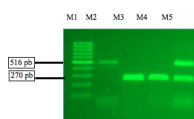


Figura 2:

- M1: marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder);
- M2 cepa de *C. chauvoei* B017A;
- M3 cepa de *C. septicum* 61.10;
- M4 cepa de *C. septicum* B023A;
- M5 primers de *C. chauvoei* y *C. septicum* con ADN de *C. chauvoei* B017A y *C. septicum* B023A.

([Volver arriba](#))

Discusión y Conclusión

Las cepas estudiadas de *C. chauvoei* y *C. septicum* fueron detectadas por la técnica de PCR multiplex observándose solamente la amplificación de los productos esperados de 516 pb y 270

pb respectivamente. No se observaron reacciones cruzadas entre

C. chauvoei

y

C. septicum

ni con las otras especies de clostridios estudiadas. El PCR multiplex es eficiente para detectar

C. chauvoei

y

C. septicum

en forma separada y en conjunto. Esta técnica complementará los procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de las enfermedades clostridiales y la identificación molecular de cepas utilizadas en la producción de biológicos. El objetivo a futuro es mejorar esta técnica para la identificación de

C. chauvoei

y

C. septicum

directamente de muestras clínicas.

([Volver arriba](#))

Referencias Bibliográficas

1. Assis RA, Lobato FCF, Martins NE et al. (2002). Surto de gangrena gaseosa em bovinos. Rev Port Cienc Vet 7:13-14.
2. Assis RA, Lobato FCF, Dias LD et al. (2001) Producción y evaluación de conjugados

fluorescentes para el diagnóstico de mancha y gangrena gaseosa. Rev Med Vet 82:68-70.

3. Kojima A, Uchida I, Sekisaki T. et al. (2001). Rapid detection and identification of *Clostridium chauvoei* by PCR based on flageline gene sequence. Vet Microbiol 78:363-371.

4. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. (2002). Medicina Veterinaria. 9a. ed. Ed. McGraw. Enfermedades causadas por bacterias-II. Vol. I, p. 902-907.

5. Sterne M, Batty I. (1978). Clostridios patógenos. Editorial Acriba. Zaragoza. España.

6. Takeuchi S, Hashizume N, Kinoshita T. et al. (1997). Detection of *Clostridium septicum* hemolysin gene by polymerase chain reaction. J Vet Med Sci 59:853-855.

([Volver arriba](#))