

Puesta a punto de la técnica de PCR multiplex para la identificación de *Clostridium chauvoei* y *Clostridium septicum*

Development of multiplex PCR for identification of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*

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

Recibido: 12/03/2012
Aprobado: 13/04/2012

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

ABSTRACT

A multiplex PCR to detect the gene encoding the flagellin of *Clostridium chauvoei* and the gene encoding the *Clostridium septicum* alpha toxin from pure cultures was developed. Specific primers were used for genes encoding for *Clostridium chauvoei* flagellin (516 bp) and *Clostridium septicum* 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.

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.

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.

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

KEYWORDS:

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

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.

MATERIALES Y MÉTODOS

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

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

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

| Identificación | Procedencia |
|---|---|
| <i>Clostridium chauvoei</i> B017A | Laboratorios Santa Elena S.A. (SESA) |
| <i>Clostridium chauvoei</i> 10092 | ATCC (American Type Culture Collection) |
| <i>Clostridium septicum</i> B023A | Laboratorios 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 sordellii</i> 60.18 | Instituto Pasteur, París-Francia |
| <i>Clostridium haemolyticum</i> IRP 315 | CVB-APHIS, USA |

3'-5'CCTGCCCAACTTCTCTTTT 3'. El tamaño de los fragmentos esperados de la amplificación serían 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) / B017A (SESA) y *C. septicum* 61.10 (Instituto Pasteur, Francia) / B023A (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.

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* (Figura 1 y 2).

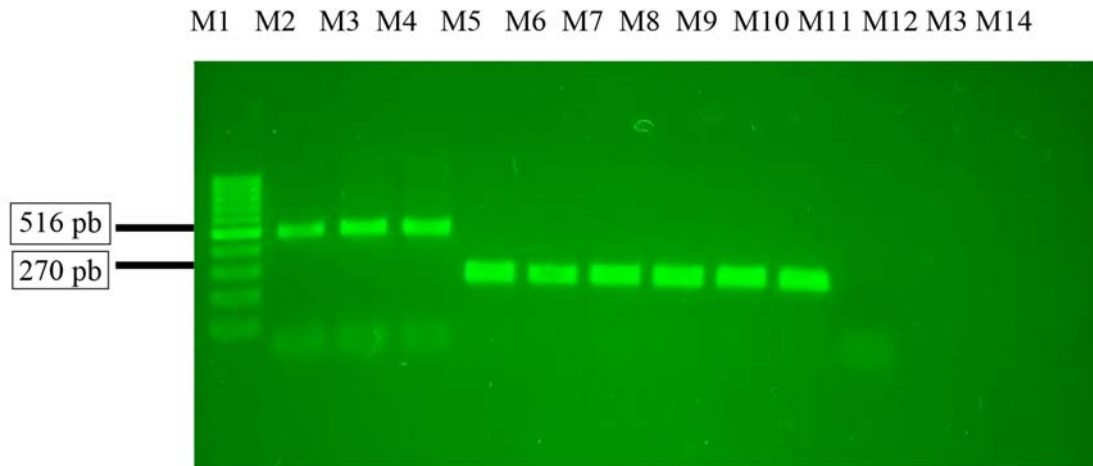


Figura 1:

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 *C. septicum* con ADN de *C. septicum* B023A y *C. chauvoei* B017A; M11 primers de *C. chauvoei* con ADN de *C. novyi* tipo B;

M12 primers de *C. septicum* con ADN de *C. sordelli*;

M13 primers de *C. septicum* con ADN de *C. haemolyticum*;

M14 Control negativo.

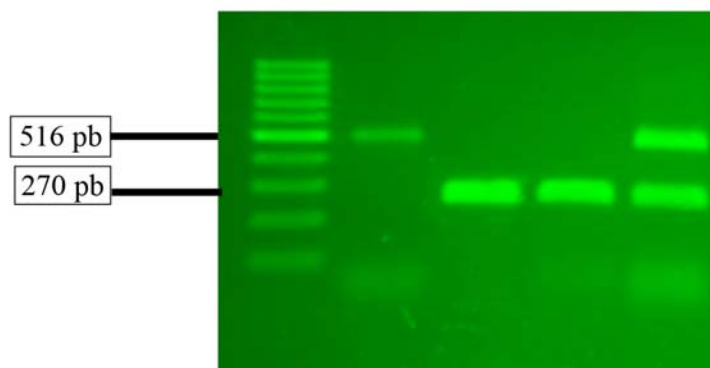


Figura 2:

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.

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.

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.

BIBLIOGRAFÍA

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).