

Clostridier som årsag til spædgrisediarré

Betydningen af *Clostridium perfringens* type A - resultater fra forskningsprojekt på DTU Veterinærinstituttet. Hvilken betydning kan forekomst af *Clostridium difficile* tillægges?

Branko Kokotovic, Veterinærinstituttet, Bülowssvej 27, København V

Clostridier er en slægt af anaerobe bakterier, der danner varmeresistente sporer og derfor forekommer i alle slags miljøer. Clostridier udmærker sig desuden ved at producere særdeles potente toksiner (bl.a. botulinumtoksinet fra *C. botulinum* og stivkrampetoksinet fra *C. tetani*). Patogenesen af alle clostridierelaterede sygdomme er tæt knyttet til toksinproduktion og toksinernes lokale og systemiske effekter, idet selve bakterien kan forekomme i tarmene hos raske dyr uden at volde skade.

Clostridium perfringens er en almindeligt forekommende clostridieart, som ligeledes danner forskellige ekstracellulære toksiner og er årsag til f. eks. gasgangræn og levnedsmiddelforgiftning hos mennesker såvel som forskellige enterotoksæmi tilstande hos især ungdyr. *C. perfringens* isolater inddeles i fem hovedtyper (A-E) på grundlag af deres produktion af fire "major toxins" (alpha [α], beta [β], epsilon [ϵ] og iota [ι]). Type A stammer producerer kun α -toksin, mens typerne B-E danner et eller flere andre toksiner derudover.

De seneste år har der været en stigende interesse for *C. perfringens* type A og dens betydning for udviklingen af diarré hos spædgrise. Denne øgede opmærksomhed falder sammen med, at der ved mange indsendelser til Veterinærinstituttet med spædgrisediarré påvises type A som eneste potentielle patogene agens.

C. perfringens type A som isoleres fra pattegrise kan producere α - og β 2 toksin. Oprensat α toksin alene forårsager varierende grader af enteritis og villus ødem under eksperimentelle forhold, men typisk ingen dybtgående nekrose af tarmslimhinden. En forklaring på, at der i nogle sygdomsudbrud observeres mere alvorlige kliniske symptomer og patologiske forandringer kunne være, at der opstår en synergistisk effekt mellem α -toksinet og det for nylig beskrevne β 2-toksin. β 2-toksinet er hverken immunologisk eller strukturelt beslægtet med β -toksinet, som dannes af *C. perfringens* type C, men har lignende biologiske egenskaber: det er ligeledes letalt for mus, cytotoksisk for forskellige cellekulturer og inducerer hæmorrhagisk slimhindene nekrose hos marsvin under eksperimentelle forhold.

For at få bedre indblik i betydningen af *C. perfringens* for udvikling af diarre hos spædgrise, blev der ved Veterinærinstituttet foretaget undersøgelse af prævalens af *C. perfringens* type A og udbredelse af β 2-toksin genet blandt populationer af bakterien i forskellige besætninger. Undersøgelsen blev foretaget på fæcesprøver fra grise i alderen 1-7 dage. I alt 20 besætninger var omfattet af undersøgelsen – 10 besætninger, hvor der var klinisk diarre (case-besætninger), samt 10 besætninger uden diarre (kontrol-besætninger). Fra hver case-besætning blev der samlet 30 prøver – 20 fra syge og 10 fra raske dyr, hvorimod fra hver kontrol-besætning blev der samlet 10 prøver. Så, i alt blev der undersøgt 200 prøver fra grise med diarre og 200 prøver fra raske grise. Tilstedeværelse af *C. perfringens* blev undersøgt ved dyrkning, mens typning af isolater blev gennemført ved brug af en multipleks PCR som samtidigt kan detektere α -, β - og β 2-toksingenet.

C. perfringens blev påvist i alle de undersøgte besætninger. På besætningsniveau blev bakterien isoleret fra 75-100% af de undersøgte dyr. *C. perfringens* blev isoleret fra 92% af de undersøgte syge og 95% af de undersøgte raske dyr. I den efterfølgende PCR undersøgelse viste alle isolater et bånd specifikt for α -toksin genet, og da ingen af isolaterne viste et bånd specifikt for β -toksin genet, kunne alle identificeres som *C. perfringens* type A. β 2-toksin genet blev påvist i 98% af isolater fra syge dyr og 98% af isolater fra raske dyr.

Disse resultater viser tydeligt at *C. perfringens* type A er meget udbredt i danske svinebesætninger, samt at β 2-toksin genet er vidt spredt i naturlige populationer af bakterien. Desuden kan der på baggrund af de opnåede resultater konkluderes, at tilstedeværelse af β 2-toksin genet i en bakteriel population i tarmen medfører ikke ubetinget udvikling af sygdommen. Derfor er det nødvendigt at

undersøge, hvorvidt *C. perfringens* isolater udtrykker β 2-toksin genet samt hvorvidt β 2-toksinet kan påvises direkte i fæcesprøver.

For at teste toksinproduktion blev fæcesprøver fra syge og raske dyr, samt bouillon kulturer af *C. perfringens* isolater, undersøgt ved en sandwich-ELISA. β 2-toksin kunne ikke påvises i hverken prøver fra de syge dyr eller prøver fra de raske dyr. Derimod viste undersøgelsen, at toksinet produceres in vitro af de fleste *C. perfringens* isolater.

Den manglende påvisning af β 2-toksin i fæcesprøver ved ELISA kan skyldes flere årsager, herunder: (i) ustabilitet af toksin, (ii) længere tids opbevaring og utilstrækkelig prøveforberedelse, (iii) lavt mængde af toksin i prøver, (iv) en ikke optimal analysepræstation. Studier fra udlandet har vist at β 2-toksin er følsom overfor varme, oxidation og trypsin. Desuden blev der tidligere rapporteret, at β 2-toksin kan miste aktivitet i løbet af oprensingsprocessen. Disse kendsgerninger kan tyde på, at β 2-toksin skal have ideale forhold for at være biologisk aktivt in vivo, og det skal tages i betragtning, når nye metoder for toksinpåvisning bliver udviklet.

Undersøgelse af bouillon kulturer af *C. perfringens* har derimod demonstreret at den brugte ELISA metode var i stand til at detektere toksinet så længe en tilstrækkelig mængde af et intakt protein er tilstedet. Men, interessant nok, blev toksinet ikke påvist i alle bouillon kulturer, selvom alle isolater havde vist positiv PCR resultat for β 2-toksin genet. For at finde forklaring på denne observation, blev der foretaget sekventering af β 2-toksin gener af isolater, som producerede, og isolater som ikke producerede toksin in vitro.

Sekvensanalyse har vist at β 2-toksingenet er ret konserveret – der blev kun fundet et enkelt nukleotid, ud fra de 765 nukleotider som genet består af, som var forskelligt mellem de undersøgte stammer. Til gengæld var sekvenserne i overensstemmelse med stammernes evner til at producere toksin, idet alle stammer, der producerede toksin, havde indbyrdes identisk gensekvens, og det samme gjaldt for stammer der ikke producerede toksin.

Sekvensforskellen bestod af sletning af et adenosin nukleotid fra en såkaldt poly-A-trakt lige umiddelbart efter start kodon i β 2-toksin genet af stammer, der ikke producerede toksin. Med andre ord, havde toksin producerende stammer 7 adenosin nukleotider i poly-A-trakten, mens stammer, der ikke producerede toksin, havde 6 adenosin nukleotider i den same region. Selvom forskellen kunne synes lille, har den afgørende betydning for genekspression og dermed toksinproduktion. Da en gensekvens læses ved tre nukleotider af gangen, mens den oversættes til protein, vil sletning af én nukleotid betyde at gensekvensen oversættes forkert på og efter sletningsstedet. En forkert oversættelse kan medføre at forkerte aminosyrer tilføjes til det nydannede protein og/eller at oversættelse afbrydes, som endelig resulter i et biologisk inaktivt produkt.

Et normalt β 2-toksingen (med 7 adenosin nukleotider i poly-A-trakten) vil blive oversat til et biologisk aktivt protein på 265 aminosyrer, mens sletning af en adenosin i poly-A-trakten resulterer i en alt for tidlig standsning af oversættelsen (efter kun 9 tilføjede aminosyrer) og dannelsen af et biologisk inaktivt produkt. For tiden undersøges udbredelsen af det kryptiske gen blandt de Danske *C. perfringens* type A isolater, samt om der er kobling mellem en bestemt genvariant og forekomsten af diarre.

Clostridium difficile en vigtig årsag til tarmlidelser hos mennesker og dyr. De seneste års udvikling med et stigende antal udbrud af *C. difficile* relateret diarre på hospitaler verden over, inklusive Danmark, samt øget forekomst af antibiotika resistente og hypervirulente stammer, har medført en tiltagende opmærksomhed på bakteriens forekomst og betydning.

C. difficile er en almindeligt forekommende clostridieart og kan danne toksin A (enterotoksin) og toksin B (cytotoxin), som er bakteriens vigtigste virulensfaktorer. Desuden kan nogle stammer danne et binært toksin.

På baggrund af sekvensforskelle i toksingenerne kan *C. difficile* stammer inddeles i 25 forskellige toksintyper, og på baggrund af sekvensforskelle i regionen mellem 16S og 23S rRNA gener kan *C. difficile* inddeles i over 150 forskellige PCR ribotyper. Toksintypning og PCR ribotypning danner grundlag for præcis identifikation af forskellige varianter af bakterien blandt de kliniske isolater.

Seks ud af de 25 kendte toksintyper er for tiden påvist i dyr, og én af de seks (toksintype V) fremstår som særdeles adapteret til dyr og er p.t. påvist i tre forskellige dyrearter, bl. a. grise.

Infektion af grise med *C. difficile* blev første gang beskrevet i 1994 i USA og er efterfølgende rapporteret fra adskillige lande verden over. I USA anses infektionen som én af de vigtigste årsager til enteritis i spædgrise. I én tidligere undersøgelse var *C. difficile* toksiner påvist i tarmindehold af 29% af spædgrise med diarre. En anden undersøgelse af 10 besætninger fra North Carolina har vist at en overordnet prævalens af *C. difficile* i spædgrise var på over 47% mens i de enkelte besætninger var tæt på 100%.

I en ny Spansk undersøgelse blev der undersøgt tilstedeværelse af *C. difficile* i rektalsvaber af 780 nyfødte og 1-2 måneder gamle grise. Bakterien blev fundet i 26% af de undersøgte nyfødte grise, mens prøver fra de ældre grise var negative.

På den anden side viser undersøgelser at *C. difficile*, ligesom *C. perfringens* type A, ofte kan findes hos raske dyr. I den ovenfor nævnte Spanske undersøgelse var *C. difficile* isoleret fra 28% dyr uden diarre og 23% af dyr med diarre. Desuden har 90% af isolater fra raske dyr haft gener for både A og B toksin. I én nyere Amerikansk undersøgelse blev *C. difficile* toksiner påvist i tarmindeholdet af 79% af undersøgte grise uden diarre, dog i et generelt lidt lavere niveau end grise med diarre.

Betydningen af *C. difficile* til diarre hos spædgrise i Danmark er i høj grad ukendt. I et samarbejde mellem Danske Slagteriers laboratorium i Kjællerup og Veterinærinstituttet blev der undersøgt ca. 100 spædgrise med diarre, og der blev isoleret ca. 20 *C. difficile* isolater. Det var første gang *C. difficile* blev påvist i grise i Danmark. Fem isolater blev yderligere undersøgt ved toksintypning og ribotypning, og disse undersøgelser viste, at alle isolater har ribotype 045 og toksintype VI. Disse resultater er noget overraskende, da de fleste isolater fra spædgrise beskrevet hidtil har toksintype V og ribotype 078 (isolater fra USA og Holland) eller ribotype 066 (isolater fra Slovenien). I USA er *C. difficile* ribotype 078 den hyppigst isolerede ribotype fra grise, og i Holland er den samme ribotype næsthyppest årsag til infektion af mennesker. Yderligere undersøgelser af andre danske *C. difficile* stammer er undervejs.