

Etude de l'antibiorésistance de *Clostridium perfringens* par l'emploi de sondes génétiques

G. DAUBE, J. MAINIL, B. LIMBOURG*, A. KAECKENBEECK

Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire
Service de Bactériologie et des Maladies Bactériennes
Sart-Tilman, Bât B43, 4000 Liège; *
Centre de Dépistage des Maladies animales
de la Province de Namur, 5010 Erpent, BELGIQUE.

* Manuscrit déposé le 12/12/1991.

INTRODUCTION

Clostridium perfringens est une bactérie à Gram positif, anaérobie, sporulée, et présente dans la flore intestinale de quasi toutes les espèces animales. Cette bactérie est pathogène pour l'homme et les espèces animales : gangrène gazeuse, entérocolites, entérotoxémies... Les facteurs de virulence incriminés sont des toxines dénommées toxines létales majeures et une entérotoxine (revue par Rood et Cole, 1991).

C. perfringens est traditionnellement considéré comme sensible à la pénicilline. Cependant, dans les conditions in vivo le recours à d'autres antibiotiques peut s'avérer nécessaire. Tester la sensibilité de *C. perfringens* à ces antibiotiques est donc indispensable. D'autre part, de nouveaux antibiotiques, pour lesquels il n'existe pas de données dans la littérature, doivent aussi être testés. Or il n'existe pas de standardisation de l'antibiogramme en conditions anaérobies (revue par Wexler, 1991). De plus, certaines conditions

de croissance en atmosphère anaérobie peuvent diminuer l'activité d'antibiotiques (Dibb et al., 1986). Des résistances aux tétracyclines, au chloramphénicol et aux macrolides-lincosamides-streptogramines ont été décrites chez *C. perfringens*. Des gènes qui président à ces résistances ont été clonés (revue par Rood et Cole, 1991).

Le but du travail présenté ici était de dériver des sondes génétiques à partir de quatre gènes de résistance aux antibiotiques cités ci-dessus et de comparer les résultats obtenus par hybridation ADN-ADN sur colonies de *C. perfringens* avec ceux obtenus par une technique classique d'antibiogramme en conditions anaérobies.

MATERIELS ET METHODES

Cent trente sept souches sauvages d'origine bovine et ovine et huit souches de référence de *C. perfringens* ont été étudiées phénotypiquement et génoty-

RESUME

La résistance de *Clostridium perfringens* a été étudiée par le test d'hybridation ADN-ADN sur colonies au moyen de sondes génétiques dérivées des gènes codant pour la résistance aux tétracyclines (sonde TetP), aux macrolides-lincosamides-streptogramines (sonde ErmBP) et au chloramphénicol (sondes CatP et CatQ). Les résultats d'hybridation (ou génotypiques) ont ensuite été comparés aux résultats phénotypiques obtenus par la méthode de diffusion en agar à partir de disques d'oxytétracycline (30 UI), d'érythromycine (15 UI) et de chloramphénicol (30 microg). Cent trente-sept souches sauvages et 8 souches de référence ont ainsi été étudiées. Ces quatre sondes génétiques montrent toutes un haut degré de spécificité (98 à 100%) mais diffèrent fortement dans leur sensibilité à détecter les résistances aux antibiotiques de *Clostridium perfringens*: 100% pour TetP, 82% pour les sondes CatP et CatQ (32% en incluant les souches à niveau intermédiaire de résistance au chloramphénicol) et 47% pour ErmBP (26% en incluant les souches à niveau intermédiaire de résistance à l'érythromycine). Ces souches à niveau intermédiaire de résistance peuvent en fait être des souches sensibles à l'antibiotique testé dont l'activité est parfois réduite en atmosphère enrichie en CO₂.

piquement. Ces souches furent identifiées comme *C. perfringens* sur base de l'aspect des colonies et de l'hémolyse, de l'aspect à la coloration de Gram et de l'hybridation avec une sonde génétique spécifique de la toxine létale majeure alpha (Daube et al., manuscrit soumis). L'antibiogramme a été réalisé sur milieu Isosensitest agar (Oxoid) par la méthode de diffusion à partir de disques (Institut Pasteur Production): oxytétracycline (30 UI), chloramphénicol (30 microg) et érythromycine (15 UI). Les sondes génétiques ont été dérivées à partir des gènes codant pour les résistances aux tétracyclines, sonde TetP (Abraham et Rood, 1985), au chloramphénicol, sondes CatP (Abraham et al., 1985) et CatQ (Berryman et Rood, 1989) et aux macrolides-lincosamides-streptogramines, sonde ErmBP (Rood et al., 1989) (Tableau 1). Ces quatre sondes d'ADN ont été hybridées avec les souches de *C. perfringens* dans un test d'hybridation sur colonies adapté de celui réalisé sur *Escherichia coli*. Les fragments sondes ont été marqués radioactivement (Random Hexanucleotide Primer Kit, Boehringer Mannheim) et les résultats de l'hybridation sur colonies ont été lus après autoradiographie (Mainil et al., 1990; Daube et al., manuscrit soumis pour publication).

RESULTATS

Les résultats obtenus par l'antibiogramme et par l'hybridation sur colonies sont présentés et comparés dans le tableau 2.

DISCUSSION

Bien que diverses classes de gènes de résistance aux tétracyclines soient connues (Lévy et al., 1989), seul le gène *tetP* a été décrit jusqu'à présent chez *C. perfringens*. Cette résistance peut être constitutive (le gène *tetP* est présent sur le chromosome) ou inductible (le gène *tetP* est présent sur des plasmides conjuguatifs) (revue par Rood et Cole, 1991). Toutes les souches de notre étude qui possèdent un niveau de résistance aux tétracyclines sont positives avec la sonde TetP (Tableau 2) en accord avec les données mentionnées ci-dessus. Le grand nombre de souches dont la résistance est intermédiaire peut être dû à la présence d'un gène inductible. Cette hypothèse devrait cependant être confirmée. Des études de localisation du fragment d'ADN montrant de l'homologie avec la sonde TetP doivent être menées. La sonde TetP représente actuellement un excellent outil pour rechercher les résistances aux tétracyclines (100% de sensibilité et de spécificité) parmi les souches de *C. perfringens*.

Au contraire de la sonde sonde TetP, la sonde ErmBP présente une sensibilité de seulement 47%, si l'on tient compte des souches résistantes, ou de 26%, si l'on inclut les souches à niveau intermédiaire de résistance. Par contre, aucune des souches sensibles n'est positive à la sonde (100% de spécificité). En fait, le gène *ermBP* n'est présent que chez une faible proportion des souches de *C. perfringens* résistantes à l'érythromycine (Berryman et Rood, 1989). Un autre gène de résistance à l'érythromycine *ermQ* a été récemment décrit et cloné (In Rood

et Cole, 1991). Il est donc possible que les souches possédant un niveau de résistance à l'érythromycine, mais négatives à la sonde ErmBP, contiennent en fait le gène *ermQ*. Cependant, certaines de ces souches peuvent aussi être des souches sensibles à l'érythromycine qui montrent un certain niveau de résistance suite à la réduction de l'activité de l'érythromycine en présence de CO₂ (Dibb et al., 1986).

En ce qui concerne la résistance au chloramphénicol, deux gènes différents ont également été décrits: *catP* et *catQ* (revue par Rood et Cole, 1991). Les sondes dérivées de ces deux gènes ne montrent pas d'hybridation croisée (Rood et al., 1989). De fait, la souche positive à la sonde CatQ n'hybride pas avec la sonde CatP et vice-versa. Malgré l'emploi de ces deux sondes génétiques, il reste trois souches phénotypiquement résistantes au chloramphénicol mais négatives aux sondes CatP et CatQ (Tableau 2). Toutes les souches à niveau intermédiaire de résistance sont aussi négatives avec les deux sondes CatP et CatQ (Tableau 2). Ces souches sont intéressantes car elles peuvent contenir un autre type de gène de résistance au chloramphénicol, soit présent dans d'autres bactéries (*catA* ou *catB* par exemple), soit totalement nouveau. D'autre part, les résultats intermédiaires d'hybridation de cinq souches avec la sonde CatP peuvent s'expliquer soit par la contamination de la sonde par de l'ADN du plasmide vecteur, soit par la présence dans le fragment sonde d'une séquence d'ADN externe au gène *catP*.

TABLEAU 1
Dérivation des sondes génétiques

Souche d'origine	Plasmide recombinant	Enzyme(s) de restriction ^o	Taille* de la sonde	Nom de la sonde	Résistance
CW92	pJIR39	<i>Sph</i> I + <i>Eco</i> R1	800 pb	TetP	Tétracyclines
CP590	pJIR62	<i>Hin</i> f1 + <i>Eco</i> R1	631 pb	CatP	Chloramphénicol
CW92	pJIR260	<i>Dra</i> 1 + <i>Pst</i> 1	350 pb	CatQ	Chloramphénicol
JIR237	pJIR233	<i>Eco</i> R1 + <i>Hin</i> d3	500 pb	ErmBP	M L S [†]

^o Enzymes de restriction à utiliser pour dériver le fragment sonde

* pb = paires de base

[†] MLS = macrolides-lincosamides-streptogramines

En conclusion, la technique de l'hybridation ADN-ADN sur colonies représente un moyen d'investigation des résistances de *C. perfringens* vis à vis des tétracyclines. En ce qui concerne le chloramphénicol, cinq souches (3,5%) donnent des résultats discordants, dont 3 souches résistantes (2% des souches testées) qui ne répondent ni à la sonde CatP, ni à la sonde CatQ. Par contre, une autre sonde génétique est nécessaire pour l'étude de la résistance vis à vis des macrolides-lincosamides-streptogramines.

Corollairement, la comparaison des résultats des deux techniques per-

met de considérer les souches à niveau intermédiaire de résistance aux tétracyclines comme des souches résistantes. Par contre, il est possible que les souches à niveau intermédiaire de résistance vis à vis du chloramphénicol et de l'érythromycine soient à classer en tout ou en partie comme souches ne possédant en fait pas de gènes de résistance à ces antibiotiques. Des travaux ultérieurs permettront de répondre à cette question.

Enfin, ces travaux montrent qu'il est envisageable d'utiliser la technique d'hybridation ADN-ADN sur colonies pour suivre l'évolution de l'antibiorésistance des bactéries difficiles

à tester de manière classique. Ce genre de test peut facilement se réaliser sur un très grand nombre de souches dans un laboratoire spécialisé et à intervalles réguliers de temps.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier de l'IRSIA (Institut pour l'encouragement de la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture) et avec l'aide technique précieuse de Mlles K. Renier et P. Simon.

TABLEAU 2
Comparaison des résultats de l'antibiogramme classique et de l'hybridation sur colonies pour les résistances aux tétracyclines, au chloramphénicol et à l'érythromycine de 145 souches de *C. perfringens*.

Antibiotique :		Oxytétracycline			
Génotype/Phénotype		Résistantes	Intermédiaires	Sensibles	Total
Sonde TetP	+	10	89	0	99
	-	0	0	46	46
Total		10	89	46	
		Chloramphénicol			
Génotype/Phénotype		Résistantes	Intermédiaires	Sensibles	Total
Sonde CatP	+	10	0	0	10
	+/-	3	0	2	5
	-	4*	26	100	130
Total		17	26	102	
Sonde CatQ	+	1	0	0	1
	-	16	26	102	144
Total		17	26	102	
		Erythromycine			
Génotype/Phénotype		Résistantes	Intermédiaires	Sensibles	Total
Sonde ErmBP	+	8	0	0	8
	-	9	13	115	137
Total		17	13	115	

* L'une de ces quatre souches est celle qui est positive à la sonde CatQ.

SUMMARY

Study of antibiotic resistance of *Clostridium perfringens* with gene probes.

Resistance of *Clostridium perfringens* isolates was investigated by the colony hybridization assay with four gene probes derived from *Clostridium perfringens* genes coding for resistance to chloramphenicol (CatP and CatQ probes), macrolide-lincosamide-streptogramin (ErmBP probe) and tetracyclin (TetP probe). Genotypic results were compared with the phenotypic results obtained by the paper disc method using discs for chloramphenicol (30 microg), erythromycin (15 IU) and oxytetracyclin (30 IU). One hundred thirty-seven wild-type isolates and eight control strains of *C. perfringens* were studied. If the probes of this study showed a high degree of specificity (98 to 100%), their sensitivity to detect the resistance of *C. perfringens* to antibiotics differed: 100% for TetP, 82% for CatP and CatQ (32% including the isolates with intermediate level of resistance to chloramphenicol), 47% for ErmBP (26% including the isolates with intermediate level of resistance to erythromycin). Isolates with intermediate level of resistance may be sensitive isolates because antibiotic activity can be reduced in a CO₂ atmosphere.

REFERENCES

- ABRAHAM L.J., ROOD J.I. Cloning and analysis of the *Clostridium perfringens* tetracycline resistance plasmid. *Plasmid*, 1985, **13**, 155-162.
- ABRAHAM L.J., WALES A.J., ROOD J.I. Worldwide distribution of the conjugative *Clostridium perfringens* tetracycline resistance plasmid, pCW3. *Plasmid*, 1985, **14**, 37-46.
- BERRYMAN D.I., ROOD J.I. Cloning and hybridization analysis of *ermP*, a macrolide-lincosamin-streptogramin B resistance determinant from *Clostridium perfringens*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1989, **33**, 1346-1353.
- DAUBE G., SIMON P., LIMBOURG B., MAINIL J., KAECKENBEECK A. Location, cloning, and sequencing of the *Clostridium perfringens* epsilon-toxin gene. *Infect. Immun.*, manuscript soumis.
- DIBB W.L., DIGRANES A., BOTTOLSFEN K.L. Effects of carbon dioxide upon the *in vitro* activity of erythromycin. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B*, 1986, **94**, 173-176.
- LEVY S.B., McMURRAY L.M., BURDETT P., COURVALIN P., HILLEN W., ROBERTS M.C., TAYLOR D.E. Nomenclature for tetracycline resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1989, **33**, 1373-1374.
- MAINIL J.G., BEX F., JACQUEMIN E., POHL P., COUTURIER M., KAECKENBEECK A. Prevalence of four enterotoxin (STaP, STaH, STb, and LT) and four adhesin subunit (K99, K88, 987P, and F41) genes among *Escherichia coli* isolates from cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 1991, **51**, 187-190.
- ROOD J.I., COLE S.T. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Rev.*, 1991, **55**(4), in press.
- ROOD J.I., JEFFERSON S., BANNAM T.L., WILKIE J.M., MULLANY P., WREN B.W. Hybridization analysis of three chloramphenicol resistance determinants from *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1989, **33**, 1569-1574.
- WEXLER H.M. Susceptibility testing of anaerobic bacteria : myth, magic, or method ? *Clin. Microbiol. Rev.*, 1991, **4**, 397-410.