

Différenciation des *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* et *Campylobacter fetus* basée sur le profil des acides gras pariétaux obtenus par chromatographie gaz-liquide / spectrométrie de masse ainsi que sur l'hydrolyse de l'hippura...

Autor(en): Dennemont, J. / Roupas, A. / Heitz, M.

Objektyp: Article

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **83 (1992)**

Heft 2

PDF erstellt am: **29.06.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982255>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Différenciation des *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* et *Campylobacter fetus* basée sur le profil des acides gras pariétaux obtenus par chromatographie gaz-liquide / spectrométrie de masse ainsi que sur l'hydrolyse de l'hippurate

Differentiation of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter fetus* based on the Parietal Fatty Acids Profiles Obtained by Gaz-Liquid Chromatography / Mass Spectrometry as well as on the Hippurate Hydrolysis

J. Dennemont et A. Roupas
Laboratoire cantonal de chimie, Genève

M. Heitz
Institut universitaire de microbiologie, CHUV, Lausanne

Introduction

Le genre *Campylobacter* est formé par des espèces biochimiquement «paresseuses». La différenciation des espèces ne repose que sur un nombre restreint de caractères phénotypiques. Parmi ceux-ci, le comportement de ces bactéries envers l'acide nalidixique et la céphalotine est largement utilisé pour cette différenciation, *C. jejuni* et *C. coli* étant sensibles à l'acide nalidixique et résistants à la céphalotine, alors que *C. lari* est résistant aux deux substances. Par ailleurs, ces trois espèces font partie du groupe des *Campylobacter* thermorésistants. L'apparition de souches résistantes à l'acide nalidixique de *C. jejuni* et de *C. coli* pose donc un problème de différenciation. Un diagnostic précis a une importance clinique et épidémiologique du fait que *C. lari*, aussi, peut être un agent responsable d'infections de l'humain (6).

C. fetus est rarement incriminé comme agent infectieux pour l'humain. Nous l'avons néanmoins inclus dans cette étude à cause de son profil chromatographique en acides gras proche de *C. lari* (4).

La chromatographie gaz-liquide est une méthode spécifique, rapide et très sensible, supérieure à l'hybridation d'ADN (8). Elle est largement utilisée comme méthode complémentaire d'identification et de différenciation des bactéries (8). Nous avons donc appliqué cette méthode dans le but d'obtenir des profils en acides gras qui permettraient de différencier aisément ces quatre espèces bactériennes.

Nous avons pris en considération tout spécialement les différences qualitatives entre les profils, les différences quantitatives dépendant en bonne partie des conditions extrinsèques, milieux de cultures et conditions de cultures, méthodes d'extraction, conditions chromatographiques, etc.

Matériel et méthodes

Souches bactériennes

Espèce	Provenance	Résistance*	N° de souche
<i>C. jejuni</i>	Centre de collection du type microbien Lausanne	—	La 3331
<i>C. coli</i>	"	—	La 3029
<i>C. lari</i>	"	—	La 3336
<i>C. fetus ssp fetus</i>	"	—	La 3023
<i>C. jejuni</i>	Isolée de patients	NxAT	1**
<i>C. jejuni</i>	"	NxNoCiAT	1
<i>C. jejuni</i>	"	NxNoCiATE	1
<i>C. jejuni</i>	"	NxNoCi	2
<i>C. jejuni</i>	"	NxNoCi	3
<i>C. jejuni</i>	"	NxNoCi	4

* Abréviations: Nx = acide nalidixique, No = norfloxacin, Ci = ciprofloxacine, A = ampicilline, T = tétracycline, E = érythromycine.

** La référence 1 s'applique à des souches isolées subséquentement du même malade.

Conditions de culture

Toutes les souches sont cultivées sur une gélose *Campylobacter* «blood free selective agar base» (OXOID CM 739 + SR 125), les souches de référence, en outre, sur une gélose TSA (BBL) avec 5% de sang de mouton. Après 48 heures d'incubation à 37 °C dans une atmosphère micro-aérophile (jarre OXOID HP 11, Gas Generating Kit OXOID BR 60, anaerobic catalyst OXOID BR 42) une masse bactérienne correspondant au volume récolté sur une anse de 4 mm de diamètre est suspendue dans 1 ml d'une solution 50% V/V de 1 n NaOH et de méthanol.

Extraction des acides gras et transformation en esters méthyliques

Après homogénéisation sur Vortex de la suspension bactérienne, les acides gras sont extraits puis transformés en esters méthyliques selon la méthode de Miller (fig. 1) (5).

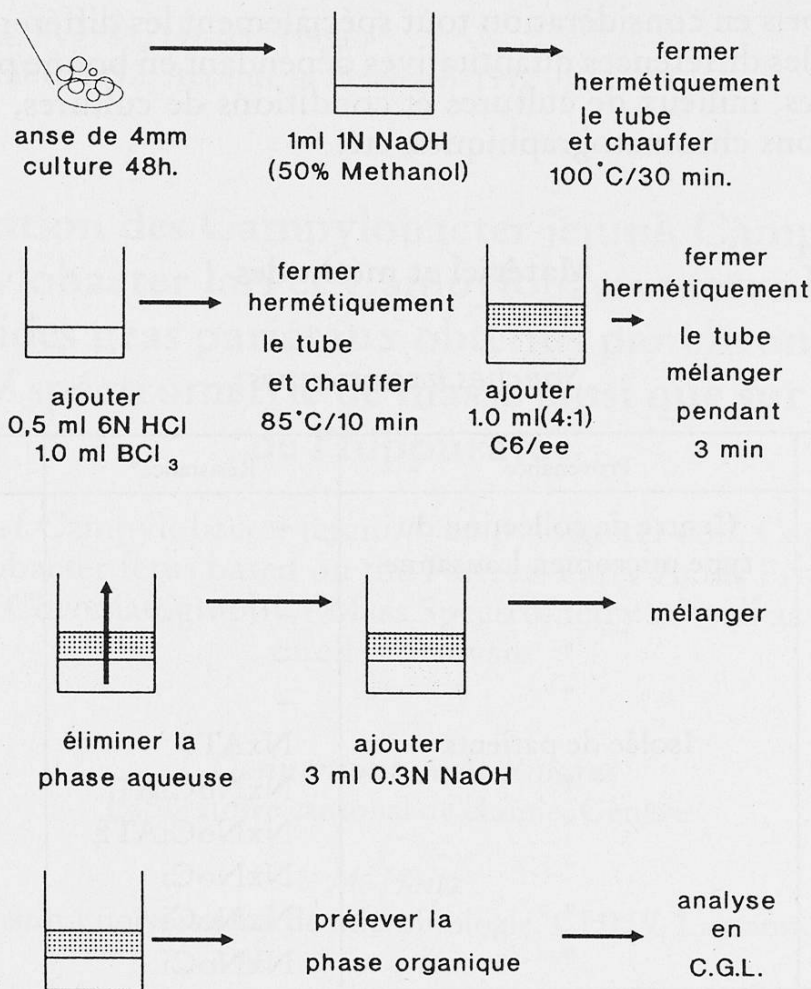


Fig. 1. Schéma de l'extraction des acides gras et de leur transformation en esters méthyliques

Identification des esters méthyliques

Les esters méthyliques sont analysés par la technique de chromatographie gaz-liquide couplée à la spectrométrie de masse. Chromatographe: Hewlett-Packard, modèle 5890, série II / Colonne capillaire: silice fondue 25 m de long x 0,2 mm de diamètre interne (Hewlett-Packard 19091 B-102) / Température de l'injecteur: 250 °C / Pression en tête de colonne de l'hélium (gaz vecteur): 0,914 kg/cm².) Pour l'analyse des échantillons, la température de la colonne est programmée de 150 °C à 280 °C avec une progression de 4 °C/min. Les esters méthyliques sont identifiés par leur temps de rétention, par comparaison avec celui obtenu avec les esters méthyliques étalons (Supelco CP MIX, réf. 4.7080). Chaque pic est également confirmé par spectrométrie de masse (Hewlett-Packard MSD 5971).

Hydrolyse de l'hippurate

L'hydrolyse de l'hippurate est mise en évidence par la méthode de *Piot* et col. (7).

Résultats et discussion

Comparant les profils chromatographiques en acides gras de *C. jejuni*, de *C. coli* et de *C. lari* (fig. 2), on note que le profil en acides gras de *C. lari* diffère nettement de ceux de deux autres *Campylobacter*, par l'absence de 19:0 cyc. En revanche, les profils de *C. jejuni* et de *C. coli* sont qualitativement semblables. Leur différenciation repose alors sur les résultats de l'hydrolyse de l'hippurate, positive pour la grande majorité >95% des souches de *C. jejuni*.

Nos résultats, indépendamment du milieu utilisé, confirment ceux d'autres auteurs et constituent donc un critère aisé de différenciation (1,3,8).

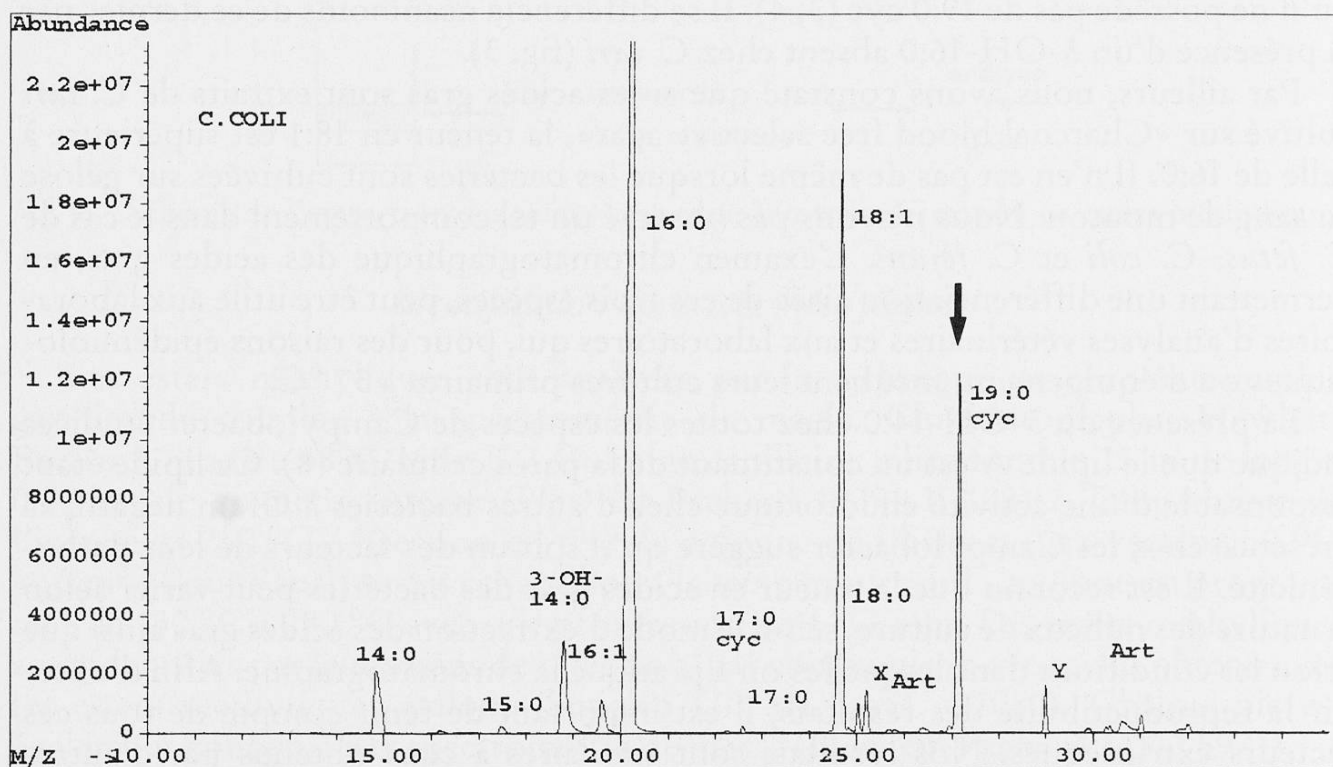
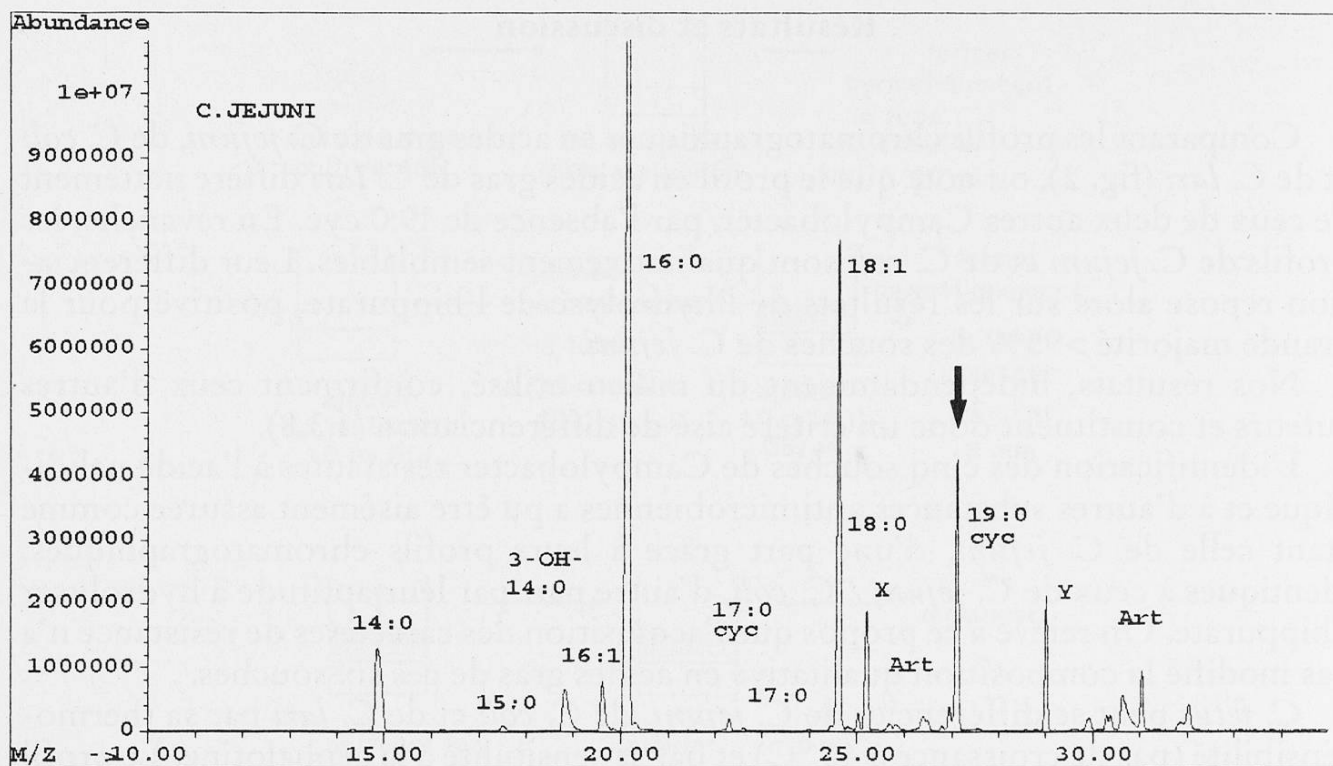
L'identification des cinq souches de *Campylobacter* résistantes à l'acide nalidixique et à d'autres substances antimicrobiennes a pu être aisément assurée comme étant celle de *C. jejuni*, d'une part grâce à leurs profils chromatographiques, identiques à ceux de *C. jejuni* / *C. coli*, d'autre part par leur aptitude à hydrolyser l'hippurate. On relève à ce propos que l'acquisition des caractères de résistance n'a pas modifié la composition qualitative en acides gras de ces six souches.

C. fetus peut se différencier de *C. jejuni*, de *C. coli* et de *C. lari* par sa thermosensibilité (pas de croissance à 42 °C) et par sa sensibilité à la céphalotine. Le profil chromatographique en acides gras de *C. fetus* est proche de celui de *C. lari* en ce qu'il ne possède pas de 19:0 cyc (3, 4). Il se différencie néanmoins de ce dernier par la présence d'un 3-OH-16:0 absent chez *C. lari* (fig. 3).

Par ailleurs, nous avons constaté que si les acides gras sont extraits de *C. lari* cultivé sur «Charcoal blood free selective agar», la teneur en 18:1 est supérieure à celle de 16:0. Il n'en est pas de même lorsque les bactéries sont cultivées sur gélose au sang de mouton. Nous n'avons pas observé un tel comportement dans le cas de *C. fetus*, *C. coli* et *C. jejuni*. L'examen chromatographique des acides gras, en permettant une différenciation aisée de ces trois espèces, peut être utile aux laboratoires d'analyses vétérinaires et aux laboratoires qui, pour des raisons épidémiologiques ou d'équipement, incubent leurs cultures primaires à 37 °C.

La présence du 3-OH-14:0 chez toutes les espèces de *Campylobacter* étudiées indique que le lipide A est un constituant de la paroi cellulaire (8). Ce lipide étant responsable d'une activité endotoxique chez d'autres bactéries à Gram négatif, sa présence chez les *Campylobacter* suggère qu'il soit un des facteurs de leur pathogénicité. Il est reconnu que la teneur en acides gras des bactéries peut varier selon la nature des milieux de culture, selon le mode d'extraction des acides gras ainsi que selon les conditions dans lesquelles on a pratiqué la chromatographie. Afin d'obtenir la reproductibilité des résultats, il est important de tenir compte de tous ces facteurs extrinsèques. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par d'autres auteurs (1-4, 6, 8) et démontrent que par la mise en application de deux examens: la chromatographie gaz-liquide/spectrométrie de masse complétés par le test de l'hydrolyse de l'hippurate, on peut obtenir une différenciation nette, aisée et rapide des quatre espèces de *Campylobacter*: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* et *C. fetus* (tableau 1).

Il est intéressant de relever que la masse bactérienne nécessaire à l'accomplissement tant de la chromatographie que du test de l'hydrolyse de l'hippurate est



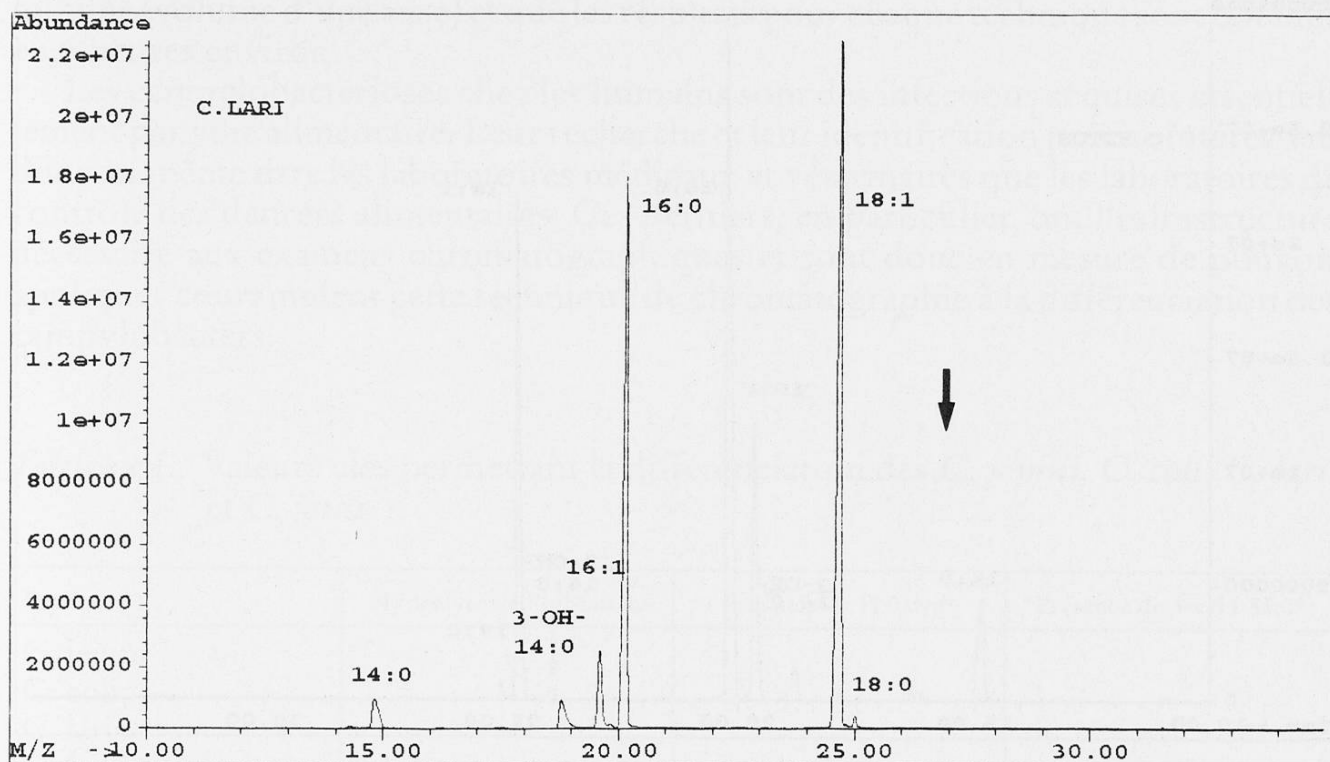


Fig. 2. Profil chromatographique des esters méthyliques des *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*. Le pic C15:0 est également présent chez *C. lari*, mais la normalisation du chromatogramme par rapport au pic le plus important (18:1) rend le pic 15:0 non visible.

Abréviations:

- 14:0 = tétradécanoate
- 15:0 = pentadécanoate
- 3-OH-14:0 = 3-hydroxytétradécanoate
- 16:1 = hexadécenoate
- 16:0 = hexadécanoate
- 17:0 cyc = Cis-9,10-méthylènehexadécanoate
- 17:0 = heptadécanoate
- 3-OH-16:0 = 3-hydroxyhexadécanoate
- 18:1 = octadécenoate
- 18:0 = octadécanoate
- 19:0 cyc = Cis-9,10-méthylèneoctadécanoate
- X = acide gras non saturé – non identifié
- Y = méthoxy méthyle ester – non identifié
- Art. = Artefacts.

La flèche indique l'endroit où existe la différence qualitative entre le groupe «*C. jejuni*-*C. coli*» et *C. lari*.

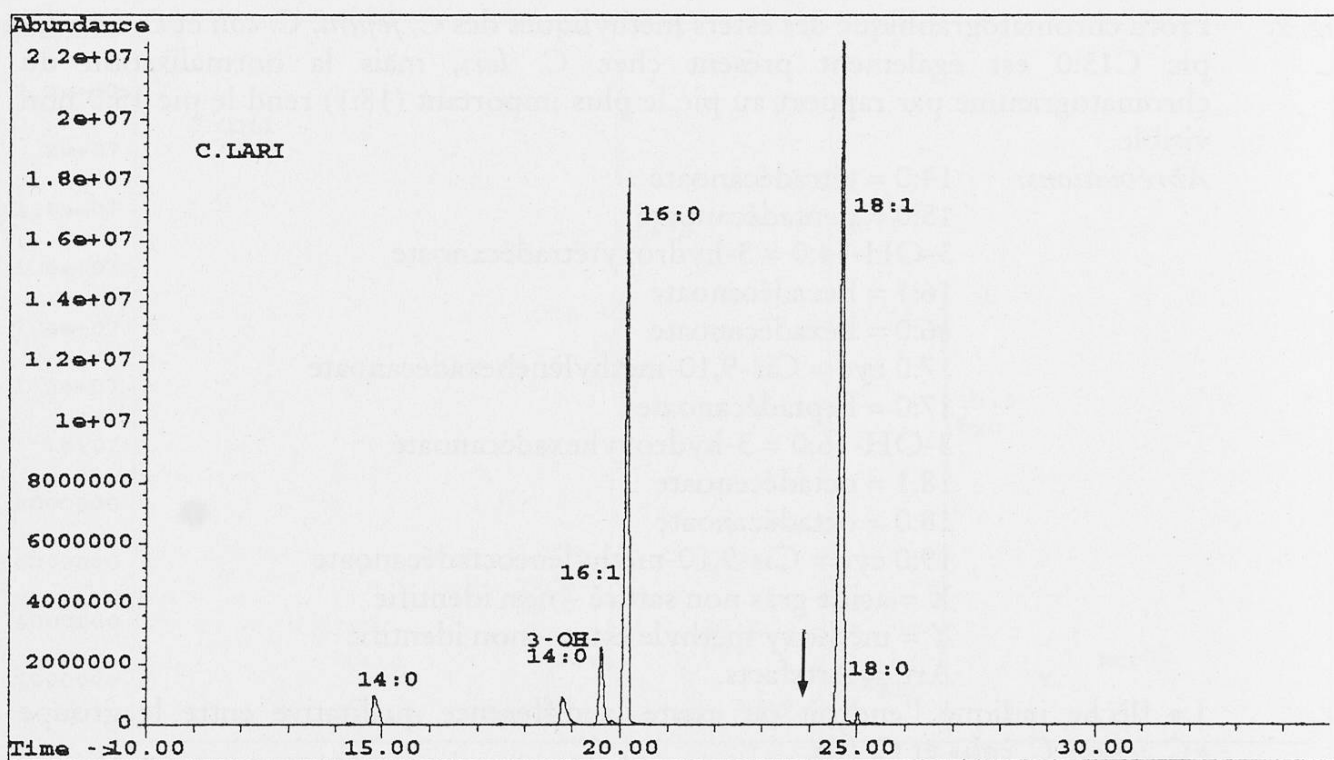
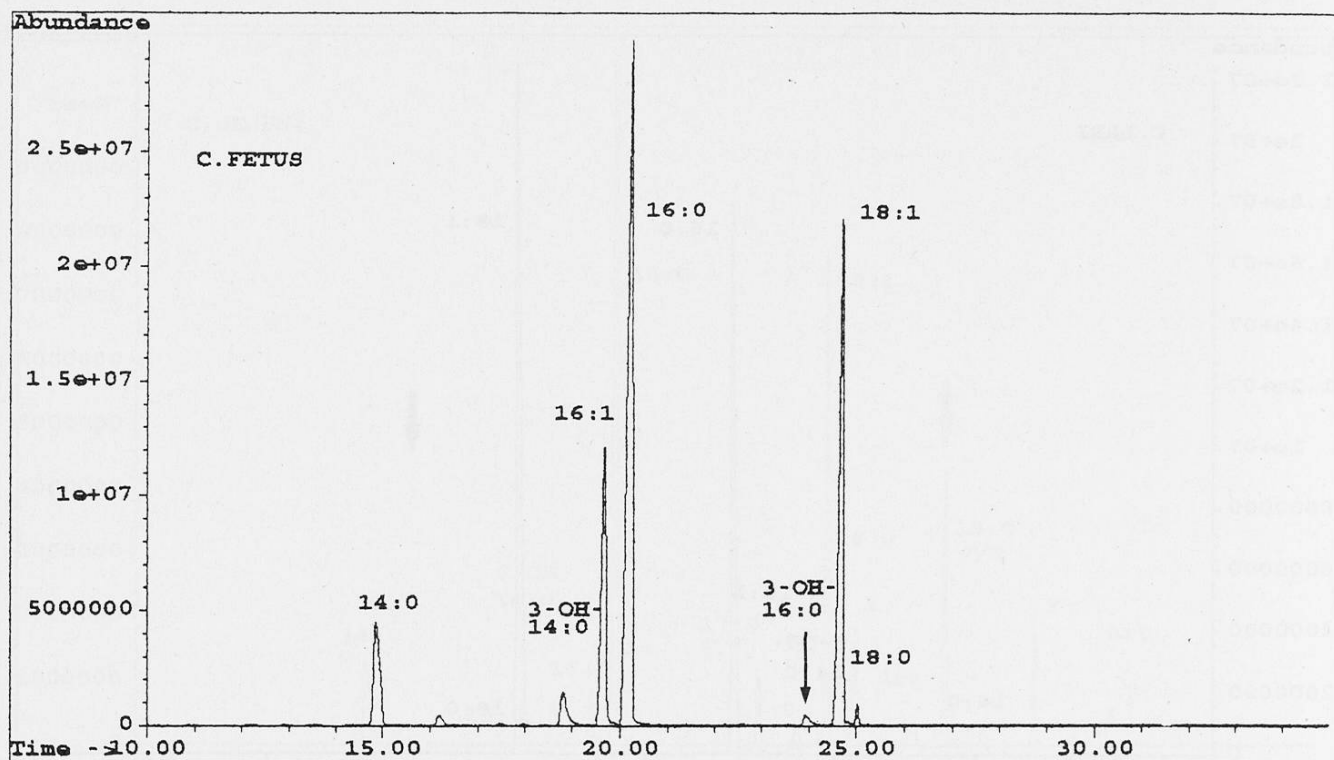


Fig. 3. Profil chromatographique des esters méthyliques de *C. fetus* et *C. lari* (abréviations: cf légende fig. 2). La flèche indique l'endroit où existe la différence qualitative entre *C. fetus* et *C. lari*

minime (volume d'une anse) et que les résultats pour chaque technique sont obtenus en 6 heures environ.

Les campylobactérioses chez les humains sont des infections acquises essentiellement par voie alimentaire. Leur recherche et leur identification précise intéressent donc au même titre les laboratoires médicaux et vétérinaires que les laboratoires de contrôle des denrées alimentaires. Ces derniers, en particulier, ont l'infrastructure nécessaire aux examens chromatographiques et sont donc en mesure de pouvoir appliquer couramment cette technique de chromatographie à la différenciation des campylobacters.

Tableau 1. Valeurs clés permettant la différenciation des *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* et *C. fetus*

Espèces	Hydrolyse de l'hippurate	Présence de 19:0 cyc*	Présence de 3-OH-16:0*
<i>C. jejuni</i>	+	+	-
<i>C. coli</i>	-	+	-
<i>C. lari</i>	-	-	-
<i>C. fetus</i>	-	-	+

* Abréviations voir légende figure 2

Remerciements

Nous tenons à remercier très vivement le Dr *M.F. Paccaud* pour sa participation fort appréciée à la rédaction de ce texte.

Résumé

L'analyse des acides gras pariétaux par chromatographie gaz-liquide et spectrométrie de masse permet la différenciation entre *C. fetus*, *C. lari* et le groupe «*C. jejuni-C. coli*». Le groupe «*C. jejuni-C. coli*» contient un 19:0 cyc tandis que *C. fetus* et *C. lari* n'en contiennent pas. La présence d'un 3-OH-16:0 chez *C. fetus* et son absence chez *C. lari* permet la différenciation entre ces deux espèces. Le test de l'hydrolyse de l'hippurate permet en outre, la différenciation entre *C. jejuni* et *C. coli*. Les six souches de *C. jejuni* résistantes à l'acide nalidixique aussi bien qu'à d'autres antibiotiques, ont la même composition en acides gras qu'une souche de référence sensible.

Zusammenfassung

Gaschromatographie, kombiniert mit Massenspektrometrie, erlaubt die Unterscheidung der Zellwandfettsäuren von *C. fetus*, *C. lari* und der Gruppe «*C. jejuni-C. coli*». Die Gruppe «*C. jejuni-C. coli*» enthält eine 19:0-cyc-Säure, die in *C. fetus* und *C. lari* abwesend ist. Die

Anwesenheit einer 3-OH-16:0-Säure in *C. fetus* und ihre Abwesenheit im *C. lari* ermöglicht die Unterscheidung dieser beiden Arten. Der Hippurat-Hydrolysetest erlaubt ausserdem die Unterscheidung zwischen *C. jejuni* und *C. coli*. Sechs Stämme von *C. jejuni* mit Resistenz gegen Nalidixinsäure und weitere Antibiotika haben die gleiche Fettsäurezusammensetzung wie ein empfindlicher Referenzstamm.

Summary

The analysis of parietal fatty acids by gas liquid chromatography and mass spectrometry allows the differentiation between *C. fetus*, *C. lari* and the group «*C. jejuni*-*C. coli*». The group «*C. jejuni*-*C. coli*» contains a 19:0 cyc whereas *C. fetus* and *C. lari* do not. The presence of 3-OH-16:0 in *C. fetus* and the absence in *C. lari* allow the differentiation between these two species. The hippurate hydrolysis test allows, moreover, the differentiation between *C. jejuni* and *C. coli*. The six strains of *C. jejuni* resistant to nalidixic acid as well as to other antibiotics have the same composition in fatty acids as a sensitive reference strain.

Bibliographie

1. Brondz, I. and Olsen, I.: Multivariate analyses of cellular fatty acid in *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Wolinella*, and *Campylobacter* spp. J. Clin. Microbiol. **29**, 183-189 (1991).
2. Coloe, P.J., Cavanaugh, P. and Vaughan, J.: The cellular fatty acid composition of *Campylobacter* species isolated from cases of enteritis in man and animals. J. Hyg. **96**, 225-229 (1986).
3. Lambert, M.A., Patton, C.M., Barrett, T.J. and Moss, C.W.: Differentiation of *Campylobacter*-like organisms by cellular fatty acid composition. J. Clin. Microbiol. **25**, 706-713 (1987).
4. Martin, J.B., Moss, C.W. and Weaver, R.E.: Cellular fatty acid composition of *Campylobacter fetus*. J. Clin. Microbiol. **11**, 448-451 (1980).
5. Miller, L.T.: Single derivatization method for routine analysis of bacterial esters, including hydroxy acids. J. Clin. Microbiol. **16**, 584-586 (1982).
6. Penner, J.L.: The genus *Campylobacter*: a decade of progress. Clin. Microbiol. Rev. **1**, 157-172 (1988).
7. Piot, P., Dyck, E.V., Totten, P.A. and Holmes, K.K.: Identification of *Gardnerella* (*Haemophilus*) *vaginalis*. J. Clin. Microbiol. **15**, 19-24 (1982).
8. Welch, D.F.: Applications of cellular fatty acid analysis. Clin. Microbiol. Rev. **4**, 422-438 (1991).

Dr J. Dennemont
Dr A. Roupas
Laboratoire cantonal de chimie
22, Quai Ernest-Ansermet
CH-1211 Genève 4