

Université de Montréal

Mise au point d'une méthode d'isolement pour la détection de *Clostridium perfringens* entérotoxigène chez le poulet de chair

Par

Rosette Kakese Mukosa

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)

en sciences vétérinaires option hygiène vétérinaire et innocuité des aliments

Août, 2023

© Kakese Mukosa, 2023

Université de Montréal

Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

Mise au point d'une méthode d'isolement pour la détection de *Clostridium perfringens* entérotoxigène chez le poulet de chair

Présenté par

Rosette Kakese Mukosa

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Marion Allano

Présidente-rapporteuse

Marie-Lou Gaucher

Directrice de recherche

John M. Fairbrother

Codirecteur

Alexandre Thibodeau

Codirecteur

Mohamed Rhouma

Membre du jury

Résumé

Clostridium perfringens entérotoxigène figure parmi les principales causes de toxoinfection alimentaire dans le monde. L'utilisation d'une approche par culture bactérienne classique pour isoler *C. perfringens* entérotoxigène dans la viande de volailles est courante. Cependant, cette méthode d'isolement de ce microorganisme s'appuie sur le phénotype d'une double hémolyse attribuable, alors que peu des souches entérotoxigènes de *C. perfringens* n'en produisent. Cet aspect complique ainsi l'étude des réservoirs de cet important pathogène. Les objectifs de cette étude étaient de valider la capacité d'une sonde marquée à la digoxigénine à détecter le gène *cpe* codant pour l'entérotoxine de *C. perfringens* et de valider l'utilisation d'une approche d'isolement combinée à l'hybridation sur colonie pour détecter *C. perfringens* entérotoxigène. Des échantillons de liquides de rinçage de carcasses de poulets de chair ont été utilisés pour la réalisation de la présente étude. L'ADN et colonies lysées de souches entérotoxigènes de *C. perfringens*, et des échantillons de liquides de rinçage de carcasses de poulets de chair ont été soumis à la méthode d'hybridation sur colonie afin d'identifier la présence du gène *cpe* de *C. perfringens*. Les résultats de cette étude ont montré que la sonde d'ADN synthétisée est spécifique et sensible, permettant ainsi la détection du gène *cpe* de *C. perfringens* à partir de séquences d'ADN et de colonies lysées d'une souche contrôle de *C. perfringens* positifs au gène *cpe*, mais aussi à partir de colonies isolées des échantillons de liquides de rinçage de carcasses de poulets de chair contaminés artificiellement par *C. perfringens* entérotoxigène. Notre étude suggère que cette méthode d'isolement combinée à l'hybridation sur colonie permet de récupérer *C. perfringens* entérotoxigène à partir d'échantillons de liquides de rinçage de carcasses de poulets de chair.

Mots-clés: *Clostridium perfringens* entérotoxigène, gène *cpe*, hybridation sur colonie, carcasse de poulets de chair, liquide de rinçage.

Abstract

Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* is one of the main causes of foodborne illness worldwide. The use of a conventional bacterial culture approach to isolate enterotoxigenic *C. perfringens* from poultry meat is common. However, this method relies on the phenotype of attributable double hemolysis, whereas few enterotoxigenic strains of *C. perfringens* produce it. This aspect complicates the study of the reservoirs of this important pathogen. The objectives of this study were to validate the ability of a digoxigenin-labeled probe to detect the *cpe* gene encoding *C. perfringens* enterotoxin and to validate the use of an isolation approach combined with hybridization on colony to detect enterotoxigenic *C. perfringens*. DNA and pure colonies of enterotoxigenic strains of *C. perfringens*, and samples of broiler carcass rinses were subjected to the colony hybridization method to identify the presence of the *cpe* gene encoding the *C. perfringens* enterotoxin. The results of the present study revealed that the synthesized DNA probe is sensitive, thus allowing the detection of the *cpe* gene of *C. perfringens* from DNA sequences and from lysed colonies of a control strain of *C. perfringens* positive for the *cpe* gene. The probe also hybridized to the DNA of lysed colonies isolated from carcass rinsates artificially contaminated with *cpe*-positive *C. perfringens*. Our study suggests that this isolation method combined with colony hybridization allows the recovery of enterotoxigenic *C. perfringens* from broiler carcass rinse fluid samples.

Keywords: enterotoxigenic *C. perfringens*, *cpe* gene, colony hybridization, broiler carcass, rinse fluid.

Table des matières

Résumé	3
Abstract.....	4
Table des matières.....	5
Liste des tableaux	8
Liste des figures	9
Liste des sigles et abréviations	11
Remerciements	15
Introduction	16
Chapitre 1: Revue de la littérature	18
1. <i>Clostridium perfringens</i>	18
1.1 Caractéristiques de la bactérie.....	18
1.2 Virulence de <i>Clostridium perfringens</i>	19
1.2.1 Toxines.....	19
Toxine alpha (CPA)	20
Toxine bêta (CPB)	20
Toxine epsilon (ETX)	20
Toxine iota (ITX).....	21
Toxine de type B de l'entérite nécrotique (NetB)	21
Entérotoxine de <i>Clostridium perfringens</i> (CPE)	21
Autres toxines.....	22
Toxine perfringens large (TpeL)	22
L'entérotoxine binaire de <i>C. perfringens</i> (BEC).....	23
1.3 L'entérotoxine et sa production.....	23
1.3.1 L'entérotoxine (CPE).....	23
1.3.2 Activité biologique de CPE	23
1.3.3 Génétique du gène <i>cpe</i>	24
1.3.4 Lien entre la sporulation et la production d'entérotoxine chez <i>C. perfringens</i>	26
1.3.5 Facteurs influençant la sporulation et la production d'entérotoxine.....	27
1.3.6 Résistance des spores de <i>C. perfringens</i>	28

1.3.7 Épidémiologie de <i>Clostridium perfringens</i> entérotoxigène et sa présence dans la viande	29
1.4 Infections à <i>Clostridium perfringens</i> entérotoxigène chez l'humain	33
1.4.1 Toxi-infection alimentaire	33
1.4.2 Diarrhée associée à la prise d'antibiotiques (DAA)	35
1.4.3 Diarrhée sporadique (DS)	36
1.4.4 Syndrome de mort subite du nourrisson (SMSN)	36
1.5 Méthode d'isolement de <i>C. perfringens</i>	37
1.5.1 Milieux d'isolement et de sporulation	37
L'approche par filtration sur grilles hydrophobes et hybridation sur colonies (HGMF-CH)	38
1.5.2 Identification de l'espèce	39
Test de Nagler.....	39
Test de Reverse CAMP (Christie-Atkins-Munch-Peterson)	40
1.5.3 Caractérisation phénotypique et génotypique	40
1.6 Variabilité génétique de <i>Clostridium perfringens</i> entérotoxigène	41
Chapitre 2: Hypothèses et objectifs.....	43
Article en préparation pour le journal Pathogens: Addressing current challenges in poultry safety: Development of a cultivation and colony hybridization approach to recover enterotoxigenic <i>Clostridium perfringens</i> from broiler chicken carcasses	
44	
2.1 Abstract	45
2.2 Introduction.....	46
2.3. Materials and methods	48
2.3.1 Sampling.....	48
2.3.2 DNA extraction	49
2.3.3 Synthesis of the digoxigenin-labeled DNA probe targeting <i>cpe</i>	49
2.3.4 Hybridization of the labeled probe on bacterial genomic DNA and pure lysed colonies of enterotoxigenic <i>C. perfringens</i> AHL 311 control strain and <i>C. perfringens</i> ATCC 13124 reference strain	50
2.3.5 Detection of the <i>cpe</i> gene from sterile freezing medium artificially contaminated with <i>C. perfringens</i> AHL 311 control strain using hydrophobic membrane grid filtration and colony hybridization	51
2.3.6 Detection of the <i>cpe</i> gene from broiler chicken carcass rinsates artificially contaminated with <i>C. perfringens</i> AHL 311 control strain using hydrophobic membrane grid filtration and colony hybridization (HGMF-CH)	52

2.3.7	Detection of the <i>cpe</i> gene from broiler chicken carcass rinsates artificially contaminated with <i>C. perfringens</i> AHL 311 control strain using a combination of direct plating and colony hybridization (DP-CH)	53
2.4	Results	56
2.4.1	Sampling	56
2.4.2	DNA Extraction	57
2.4.3	Synthesis of the digoxigenin-labeled DNA probe targeting <i>cpe</i>	57
2.4.4	Hybridization between the labeled probe and the <i>cpe</i> gene from bacterial genomic DNA or pure lysed bacterial cells from <i>C. perfringens</i> AHL 311 control strain and <i>C. perfringens</i> reference strain ATCC 13124	59
2.4.5	Detection of the <i>cpe</i> gene from sterile freezing medium artificially contaminated with <i>C. perfringens</i> AHL 311 using a hydrophobic grid membrane filtration and colony hybridization (HGMF-CH) approach	60
2.4.6	Detection of the <i>cpe</i> gene from broiler chicken carcass rinsates artificially contaminated with <i>C. perfringens</i> AHL 311 control strain using hydrophobic grid membrane filtration and colony hybridization	61
2.4.7	Detection of the <i>cpe</i> gene from broiler chicken carcass rinsates artificially contaminated with <i>C. perfringens</i> AHL 311 using a combination of direct plating and colony hybridization (DP-CH)	65
2.5	Discussion	72
Chapitre 3:	Discussion générale.....	78
	Mise en contexte	78
	Conclusion générale	93
	Limites	93
	Perspectives	94
	Références Bibliographiques.....	95

Liste des tableaux

Table 1 - Hybridization steps, buffers and incubation times	55
Table 2 - Sample tubes used and their respective bacterial concentrations for generic <i>C. perfringens</i> and enterotoxigenic <i>C. perfringens</i> AHL 311 control strain used for the development of the HGMF-CH and DP-CH approaches in the current study.....	57
Table 3 - Synthesized probes and their respective concentration	58
Tableau 4 - Évaluation de l'efficacité des tampons d'hybridation et de détection faits au laboratoire par hybridation	90
Tableau 5 - Évaluation de l'efficacité des tampons de lavage et de blocage faits au laboratoire par hybridation	92

Liste des figures

- Figure 1** - Scheme of the hybridization method. Created with BioRender.com.....56
- Figure 2** - Probe typical results obtained on 1% agarose gels after electrophoresis following synthesis of a digoxigenin (DIG)-labeled DNA probe (Probe 2 in this case) used in this study. 1. DIG-labeled probe. 2. Unlabeled positive control, which corresponds to the amplification of the *cpe* gene without DIG. 3. Labeled positive control which corresponds to the labeled probe that recognizes tissue plasminogen activator (tPA) sequences used as a positive control (according to the Roche Diagnostics protocol).58
- Figure 3** - Nylon membrane after hybridization between the labeled probe and the DNA from *C. perfringens* control strains used in this study (AHL 311 and ATCC 13124); positive hybridization signals were observed for AHL 311 only. Red square is showing DNA demonstrating positive hybridization signal.59
- Figure 4** - Hybridization from pure lysed strains of *C. perfringens* reference strains positive and negative for the *cpe* gene (AHL 311 and ATCC 13124)..60
- Figure 5** - Hybridization from lysed colonies grown from sterile freezing medium artificially contaminated with *C. perfringens* AHL 311..61
- Figure 6** - Application of the HGMF-CH method using samples of broiler chicken carcass rinsates artificially contaminated with *C. perfringens* AHL311 (Tube 1, Table 2)..63
- Figure 7** - Application of the HGMF-CH method using samples of broiler chicken carcass rinsates artificially contaminated with *C. perfringens* AHL311 (Tube 3, Table 2)..63
- Figure 8** - Application of the HGMF-CH method using samples of broiler chicken carcass rinsates artificially contaminated with *C. perfringens* AHL311 (Tube 2, Table 2)..64
- Figure 9** - PCR analysis of the presumed *C. perfringens* colonies subcultured on sheep blood agar plates after recovery from TSC agar plates following the detection of corresponding positive hybridization signals on nylon membranes. The 233-bp fragments correspond to *C. perfringens* enterotoxin-encoding gene, *cpe* (Tube 2, Table 2).65

Figure 10 - Application of the DP-CH method using samples of broiler chicken carcass rinsates artificially contaminated with *C. perfringens* AHL311 (Tube 5, Table 2)..66

Figure 11 - Application of the DP-CH method using samples of broiler chicken carcass rinsates artificially contaminated with *C. perfringens* AHL311 (Tube 6, Table 2)..67

Figure 12 - Application of the DP-CH method using samples of broiler chicken carcass rinsates liquid artificially contaminated with *C. perfringens* AHL311 (Tube 7, Table 2)..70

Figure 13 - PCR analysis of the presumed *C. perfringens* colonies subcultured on sheep blood agar plates after recovery from TSC agar plates following the detection of corresponding positive hybridization signals on nylon membranes. Fragments of 233 bp correspond to *C. perfringens* enterotoxin-encoding gene, *cpe* (Tube 7, Table 2). 71

Figure 14 – Évaluation des paramètres ajustés d’hybridation. **A.** Membrane de Nylon avec bruit de fond avant l'ajustement de paramètres d’hybridation. **B.** Membrane de Nylon avec moins de bruit de fond après l'ajustement de paramètres d'hybridation.83

Figure 15 - Évaluation de grilles hydrophobes de filtration. **A.** Dénombrement réalisé sur les filtrats sur gélose TSC. **B.** Dénombrement réalisé sur les filtrats sur gélose au sang. 87

Liste des sigles et abréviations

AAD: Antibiotic-associated diarrhea ou diarrhée associée à la prise d'antibiotiques

ADN: Acide désoxyribonucléique

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism ou Polymorphisme de longueur de fragments amplifiés

AGP: Antibiotic growth promoters ou antibiotiques favorisant la croissance

Asp: Acide aspartique

ASPC: Agence de la santé publique du Canada

BCIP/NBT: 4-Nitroblue tetrazolium chloride and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate

BEC: Binary enterotoxin from *C. perfringens*

CAMP: Christie Atkins Munch Peterson

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CH: Complexe hexamétrique

CPA: *Clostridium perfringens* alpha toxin

CPB: *Clostridium perfringens* beta toxin

CPE: *Clostridium perfringens* enterotoxin

DPA: acide dipicolinique

DIG : Digoxigénine

ECL: Extracellulaire

EFSA: European Food Safety Authority

ETX: *Clostridium perfringens* epsilon toxin

FTG: fluid thioglycollate

Gr: gramme

GU: growth unit

HACCP: Hazard Analysis and Critical Control Point

HGMF-CH: Hydrophobic Grid Membrane Filtration-Colony Hybridization

HPP: High Pressure Processing

IS: Insertion sequences

ITX: *Clostridium perfringens* iota toxin

Kb: Kilobase

kDa: Kilodalton

Mb: Megabase

Mg: Milligramme

ml: Millilitre

MLEE: Multilocus Enzyme Electrophoresis

MLST: Multilocus Sequence Typing

NE: Necrotic enteritis

NetB: Necrotic enteritis toxin B

Ng: Nanogramme

NSM: New-Sporulation-Medium

PBS: Phosphate-buffered saline

PBSTS: Peptone-Bile-Theophylline-Starch

PBT: Peptone-Bile-Theophylline medium

PCR: Polymerase Chain Reaction

PEG: Polyéthylène glycol

PEM: Perfringens-Enrichment-Medium

PFGE: Pulsed-Field Gel Electrophoresis

pfoA: Perfringolysin O toxin gene

PLC: Phospholipase C

PPC: Producteurs de poulet du Canada

RPM: Rapid-Perfringens-Medium

rRNA: Ribosomal ribonucleic acid

SASP: Small acid soluble proteins

SD: Sporadic diarrhea ou diarrhée sporadique

SMSN: Syndrome de mort subite du nourrisson

Tcp: Transfer of clostridia plasmids

Tpel: Toxine Perfringens Large

TPG: Tryptone-proteose peptone-glucose

TSC: Tryptose Sulphite Cycloserine

TSN: Tryptose-sulfite neomycine

VTEC: Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*

WGS: Whole genome sequencing

Pour Mukosa, Mwape, Donrachel, Christian, Mariam, Michel, Prolah et Déogracias, pour votre amour, encouragement et confiance

Remerciements

En cette période où nous nous apprêtons à déposer ce travail de fin d'études, je tiens à témoigner toute ma gratitude à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation ce projet. Particulièrement, je voudrais d'abord exprimer toute ma reconnaissance à ma directrice de recherche, Dre Marie-Lou Gaucher, pour m'avoir acceptée comme étudiante et d'avoir cru en moi, en me confiant ce merveilleux projet. Merci pour sa disponibilité, sa patience, son encadrement, ses précieux conseils, ses encouragements et sa confiance et surtout pour ses judicieux conseils qui ont contribué à alimenter ma réflexion. Je n'aurais pas pu demander mieux en termes de direction. Qu'elle soit aussi remerciée pour le temps qu'elle a généreusement investi pour ma formation.

Également, mes remerciements s'adressent à mes co-directeurs dont, Dr Alexandre Thibodeau et Dr John Morris Fairbrother, pour m'avoir fourni et suivie sans faille dans ce projet et cela, à travers votre encadrement, votre disponibilité et vos conseils scientifiques et techniques.

Que les membres de la CRSV acceptent mes remerciements sincères pour le support moral, les commentaires et suggestions utiles qui ont contribué à l'avancement de mes travaux. Plus particulièrement, je pense à William Thériault ainsi qu'à Nicole Trottier. Sans vous, ce travail n'aurait évidemment pas pu exister.

Aux membres du jury d'évaluation de mon mémoire, pour l'intérêt porté à ce travail, car vos critiques, observations et recommandations m'ont permis d'avancer.

Pour terminer, je voudrais remercier ma merveilleuse famille, en passant par mes défunts parents, Mukosa et Mwape; Mes sœurs Donrachel, Mariam et Prolah, sans oublier mes frères Christian, Michel et Deogracias. Merci pour votre éternel soutien qui, tout au long de mes études au Canada, m'a permis de vivre moins amèrement l'éloignement qui nous sépare. Je vous aime beaucoup.

Introduction

Clostridium perfringens a été identifié pour la première fois comme cause d'intoxication alimentaire dans les années 1940. Au fil des années, cette bactérie est devenue une cause importante de maladies d'origine alimentaire. De nombreux cas d'intoxications alimentaires dus à *C. perfringens* entérotoxigène sont désormais signalés chaque année, et l'intoxication alimentaire associées à ce pathogène se classe parmi les maladies d'origine alimentaire les plus courantes dans les pays industrialisés (1). Au Canada, il est actuellement la deuxième cause bactérienne la plus fréquente d'intoxication alimentaire avec un nombre de cas estimé à 544,5/100 000 habitants (2). D'après les données provenant des États-Unis, il est également la deuxième cause bactérienne de maladies d'origine alimentaire avec un million de cas qui surviennent chaque année, entraînant environ 400 millions de dollars de pertes économiques (3, 4). Aussi, cet agent pathogène figure parmi les principales causes d'intoxications alimentaires d'origine bactérienne dans d'autres pays à savoir au Royaume-Uni, en France, en Australie, au Japon, en Angleterre et au Pays de Galles (5).

La toxi-infection alimentaire à *C. perfringens* commence par l'ingestion d'aliments contaminés par des cellules végétatives d'une souche entérotoxigène de cette bactérie qui, lors de sa sporulation dans l'intestin du consommateur, libérera l'entérotoxine responsable des symptômes associés à l'infection (6). Celle-ci se traduit généralement par une diarrhée et des crampes abdominales qui se développent 8 à 16 heures après l'ingestion d'aliments contaminés (6). Dans la plupart des cas, les symptômes gastro-intestinaux persisteront pendant 12 à 24 heures avant de se résorber d'eux-mêmes. Cependant, il est reconnu que cette maladie peut être occasionnellement mortelle chez les personnes âgées ou dont le système immunitaire est affaibli. Il a été estimé qu'environ 177 000 cas de toxi-infection alimentaire à *C. perfringens* sont enregistrés chaque année au Canada (2). Les infections d'origine alimentaire à *C. perfringens* sont souvent rapportées être associées aux produits de viande et de volaille, lesquels peuvent être contaminés par cet agent pathogène lors de l'abattage (7).

C. perfringens est largement répandu dans l'environnement et dans le microbiote intestinal de plusieurs espèces d'animaux ainsi que celui de l'humain (6, 8). Selon les différentes

combinaisons de toxines que la bactérie va produire, les souches de *C. perfringens* se classeront en sept toxinotypes allant de A à G. L'importance des toxines pour la pathogénicité de *C. perfringens* ressort clairement de l'association de types de toxines spécifiques avec différentes maladies qu'elles causeront. Par exemple, les souches de type A produisant la toxine alpha provoquent une gangrène gazeuse (myonécrose) et d'autres infections histotoxiques. Celles appartenant au type F sont reconnues pour causer la toxi-infection alimentaire compte tenu qu'elles sont porteuses du gène *cpe* codant pour une entérotoxine agissant au niveau intestinal (9). Des nombreuses études ont été réalisées pour isoler *C. perfringens* de type F dans différents échantillons (10-18). Cependant, il a été récemment démontré que la majorité des souches de *C. perfringens* de type F sont dépourvues du gène *pfoA* codant pour la toxine thêta, responsable de la zone interne caractéristique de la double hémolyse observable sur milieu gélosé au sang lors de l'isolement classique (11). De ce fait, cette difficulté d'isolement est fortement susceptible de fausser la compréhension de l'épidémiologie des souches de *C. perfringens* de type F et suggère qu'il est nécessaire de réévaluer les procédures de diagnostic standard afin de mettre au point des méthodes plus ciblées permettant de reconnaître toutes les souches entérotoxigènes de *C. perfringens*. Le présent projet vise donc à mettre au point une méthode de détection qui permettra d'isoler *C. perfringens* entérotoxigène particulièrement à partir de liquides de rinçage de carcasses de poulets de chair.

Chapitre 1: Revue de la littérature

1. *Clostridium perfringens*

1.1 Caractéristiques de la bactérie

Appartenant à la famille des *Clostridiaceae*, le genre *Clostridium* spp., est placé dans l'ordre des Clostridiales, classe des *Clostridia* (19). Dans l'ensemble, les clostridies forment des bacilles Gram positifs anaérobies, sporulants et caractérisés également par la production de puissantes toxines extracellulaires. Le genre *Clostridium* compte actuellement environ 300 espèces dont environ un cinquième sont pathogènes pour les animaux et les humains (19). Chez la volaille, il existe de nombreuses espèces de *Clostridium* spp. identifiées dans le microbiote intestinal de ces animaux dont *Clostridium perfringens*. En effet, cette bactérie est l'agent causal de l'entérite nécrotique aviaire, une maladie digestive souvent mortelle faisant résurgence dans les troupeaux de poulets de chair au Canada où l'usage des antibiotiques est drastiquement réduit (20). Il a été estimé que cette pathologie coûte à l'industrie avicole plus de 6 milliards de dollars par an en pertes économiques à l'échelle mondiale (21). Chez l'humain, plusieurs espèces appartenant à ce genre bactérien sont impliquées dans plusieurs cas de maladies, permettant ainsi de les classer en trois catégories à savoir: (1) les espèces entérotoxiques associées à des entérotoxémies et des diarrhées, telles que *Clostridium perfringens*, *Clostridium colinum*, *Clostridioides difficile*, *Clostridium piliforme*, *Clostridium septicum*, *Clostridium spiroforme* et *Paeniclostridium sordellii*; (2) les espèces histotoxiques représentées par *C. perfringens*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi*, *C. septicum* et *P. sordellii*; et (3) les espèces neurotoxiques telles que *Clostridium botulinum* et *Clostridium tetani* (19).

Clostridium perfringens, décrit pour la première fois comme *Bacillus aerogenes* en 1892 pour ensuite être nommé *Clostridium welchii*, est un agent microbien omniprésent, fréquemment retrouvé entre autres dans le microbiote intestinal normal des humains et des animaux (6, 22). La bactérie est non-motile, encapsulée, en forme de bâtonnets et produit des

toxines protéiques en plus de former des spores résistantes à divers stress environnementaux tels que la dessiccation et la chaleur(23). Les cellules végétatives de cette bactérie se multiplient à des températures allant de 6 à 50°C, mais préfèrent une température optimale entre 43 et 47°C. La croissance exige une activité de l'eau (a^w) minimum de 0,93, une concentration de chlorure de sodium inférieure à 5-8%, et un pH variant de 5,0 à 9,0 bien qu'un intervalle de pH de 6,0 à 7,2 soit idéal (23).

Les colonies de *C. perfringens* atteignent généralement 1 à 3 mm après une nuit d'incubation en conditions d'anaérobiose sur gélose au sang, mais deviennent souvent beaucoup plus grosses avec une période d'incubation plus longue. Du fait de la production de toxines hémolytiques (α -toxine et θ -toxine également appelées «perfringolysine O»), cette bactérie produit, typiquement, une double zone d'hémolyse caractéristique sur des plaques de gélose au sang. La toxine alpha a également une activité phospholipase C/lécithinase, de sorte que les colonies de *C. perfringens* présentent généralement une activité lécithinase lorsqu'elles sont placées sur agar sélectif contenant du jaune d'œuf (24).

1.2 Virulence de *Clostridium perfringens*

1.2.1 Toxines

La pathogénicité de *C. perfringens* se reflète en grande partie par la capacité productrice de toxines de cette bactérie. Bien qu'une seule souche ne produise généralement qu'un nombre limité de toxines, plus de 20 toxines distinctes ont été décrites à ce jour pour ce pathogène, la majorité d'entre elles exerçant leur activité dans le tractus gastro-intestinal (25, 26). Cette variabilité permet la classification des isolats de *C. perfringens* en fonction de leur capacité de production de toxines. Historiquement, cinq toxinotypes de *C. perfringens*, allant de A à E, étaient reconnus en fonction de la production de quatre principales toxines, soit les toxines alpha (CPA), bêta (CPB), epsilon (ETX) et iota (ITX) (22). Deux types supplémentaires ont été récemment ajoutés à ce système de typage, dont *C. perfringens* de type F et G produisant l'entérotoxine de *C. perfringens* (CPE) et la toxine de type B de l'entérite nécrotique (NetB), respectivement (9).

Toxine alpha (CPA)

Produite par la plupart des isolats de *C. perfringens*, la toxine CPA est également connue sous le nom de PLC ou phospholipase C. Cette toxine hydrolyse les phospholipides et la sphingomyéline qui composent la membrane de la cellule hôte (19). Elle est une métalloenzyme qui nécessite du zinc et qui agit comme une lécithinase. Pour extraire les nutriments, CPA décompose les tissus de l'hôte. Cette toxine est codée par le gène *cpa*, également appelé *plc*, trouvé dans une région stable du chromosome de la bactérie (19). Il y a lieu de souligner que l'action de cette toxine est associée à la gangrène gazeuse chez l'humain, ainsi qu'à l'entérotoxémie chez les moutons et les bovins, l'entérocolite chez les porcs et les chevaux et l'abomasite chez les bovins, les moutons et les chèvres. Également, elle peut être la cause de gastro-entérites hémorragiques chez les chiens et les chevaux (27).

Toxine bêta (CPB)

La toxine bêta est encodée par le gène *cpb* retrouvé sur un plasmide de taille moléculaire de 65 à 110 kb (28, 29). Bien que CPB soit une toxine porogène mortelle pour les souris, elle nuit également à certaines cellules cibles de l'hôte, notamment les cellules épithéliales et endothéliales intestinales. Cette toxine a un effet sur les tissus nerveux en affectant la distribution des ions calcium à travers leurs membranes, entraînant une interruption anormale de la conduction nerveuse (19). Il a été démontré aussi que CPB était responsable de l'entérite nécrohémorragique du mouton (dysenterie pour l'agneau) (27).

Toxine epsilon (ETX)

Trouvé sur un plasmide, le gène *etx* peut varier en taille de 50 kb à 110 kb et code pour la toxine ETX (30, 31). Cette toxine cible les radeaux lipidiques constitués de cholestérol et de sphingolipides dans les membranes des cellules eucaryotes (19). Il est intéressant de noter l'affinité particulière de la toxine pour les tissus cérébraux dans lesquels elle cible précisément les cellules granulaires neuronales, induisant ainsi la sécrétion de glutamate (19). Son importance réside principalement dans le fait qu'elle provoque l'entérotoxémie chez les bovins, les caprins et les ovins, ainsi que l'entérite hémorragique chez les ovins (32).

Toxine iota (ITX)

Produite sous forme d'une prototoxine inactive dans le tractus intestinal, la toxine ITX est codée par les gènes *iap* et *ibp*, retrouvés sur de grands plasmides potentiellement conjugatifs d'environ 65 kb ou 135 kb (19, 33). La toxicité de l'ITX dépend d'une activation de nature protéolytique. Cette activation est induite par l'élimination des séquences N-terminales via des protéases de l'hôte, telles que la chymotrypsine, ou via la lambdatoxine de *C. perfringens* (34, 35). Associée à des entérites, ITX constitue une préoccupation pour les bovins, les lapins et les moutons (32).

Toxine de type B de l'entérite nécrotique (NetB)

Bien qu'aucun facteur définitif de virulence de *C. perfringens* n'ait été associé à l'entérite nécrotique aviaire, la toxine NetB, une toxine porogène apparentée à la toxine CPB a été identifiée comme un contributeur important à la virulence des souches causant la maladie (19). Le gène *netB*, codant pour la toxine NetB, se trouve sur un locus de pathogénicité de 42 kb nommé NELoc1, présent sur de grands plasmides conjugatifs de 80 à 85 kb de taille (36-39).

Entérotoxine de Clostridium perfringens (CPE)

L'entérotoxine (CPE) est l'une des toxines les plus importantes produites par *C. perfringens*. Les souches possédant le gène *cpe*, codant pour l'entérotoxine, sont à l'origine de diverses maladies gastro-intestinales humaines, incluant la toxi-infection alimentaire et des maladies gastro-intestinales d'origine non alimentaire qui comprennent la diarrhée associée aux antibiotiques, la diarrhée sporadique, et le syndrome de mort subite du nourrisson. Elle constitue ainsi une menace importante pour la santé publique (40-44). Le gène *cpe* peut être présent sur le chromosome ou sur de grands plasmides de *C. perfringens*, soit les plasmides pCPF4969 et pCPF5603, d'une taille de 70 et 75 kb respectivement (24, 45, 46). Cette toxine porogène est produite pendant la sporulation des souches de *C. perfringens* de type F (9). Dans certaines souches de type C, D et E, il est aussi possible de retrouver des gènes *cpe* complets. Les souches de type E portent parfois un gène *cpe* silencieux ou produisent un variant du gène *cpe* codé sur un plasmide de 65 kb (47, 48). Bien que le gène *cpe* soit également présent sur les plasmides des souches de type C, D et E, ces plasmides ont tendance à être plus grands que

ceux trouvés dans les souches de type F (49). Typiquement, les souches de type C présentent des plasmides portant le gène *cpe* d'une taille allant de 85 à 110 kb (50).

Chez l'humain, la toxi-infection alimentaire associée à *C. perfringens* de type F a été confirmée par les postulats moléculaires de Koch (51). Les signes les plus reconnaissables de maladie d'origine alimentaire associée à l'action de CPE sont la diarrhée, les crampes abdominales et les vomissements occasionnels, mais ces symptômes disparaissent naturellement en un jour ou deux (6). La létalité de la toxine peut considérablement augmenter si certains facteurs, comme la constipation ou l'impaction fécale, sont présents. Plus précisément, des éclosions d'intoxication alimentaire de *C. perfringens* de type F dans des établissements psychiatriques ont entraîné la mort de personnes relativement jeunes et en bonne santé (27). Ces décès surviennent chez ceux qui souffrent de constipation sévère ou d'impaction fécale en raison de l'utilisation de médicaments psychoactifs. En conséquence, ces personnes n'ont pas développé de diarrhée induite par la CPE, qui évacue normalement cette toxine. De ce fait, la CPE serait beaucoup plus susceptible d'être absorbée dans la circulation sanguine et de se loger dans divers organes comme le foie et les reins, conduisant finalement à une entérotoxémie potentiellement mortelle.(52, 53). Chez les animaux, CPE est responsable de la gastro-entérite hémorragique canine et de la colite des chevaux (32).

Autres toxines

Toxine perfringens large (TpeL)

Situé sur un grand plasmide conjugatif de 90 kb ou 60 à 65kb, le gène *tpel* code pour la toxine TpeL (28, 29). De manière similaire à la toxine CPE, cette toxine est fortement exprimée au cours de la sporulation, contrairement à sa production qui demeure relativement faible au cours de la croissance végétative (19). Certaines études suggèrent que la toxine TpeL pourrait avoir un rôle auxiliaire important dans l'entérite nécrotique aviaire puisque des souches de *C. perfringens* positives pour la présence du gène *tpel* ont été isolées chez des poulets de chair atteints d'entérite nécrotique (19).

L'entérotoxine binaire de C. perfringens (BEC)

Partageant certaines similitudes avec ITX, BEC est une toxine récemment décrite qui appartient à la famille des toxines binaires ADP-ribosylantes (19). Formée de deux composants, les deux gènes *BecA* et *BecB* codant pour la toxine BEC, peuvent être trouvés sur le même plasmide d'environ 54 kb (54). Particulièrement, le Japon a connu récemment deux épidémies de gastro-entérites humaines d'origine alimentaire liées à cette toxine (55).

1.3 L'entérotoxine et sa production

1.3.1 L'entérotoxine (CPE)

D'un poids moléculaire de 35 kDa, CPE est un polypeptide composé de 319 acides aminés. Structuellement, elle appartient à la famille des toxines formant des pores β de type aérolysine (β -PFT), mais n'a aucune similitude de séquence primaire d'acides aminés avec d'autres toxines (56, 57). La protéine CPE comprend un domaine N-terminal cytotoxique formant des pores bêta et un domaine C-terminal liant les protéines claudines de l'intestin humain et qui facilite l'oligomérisation et l'insertion membranaire lors de la formation des pores (58). En perturbant les jonctions serrées intercellulaires dans le tractus intestinal humain, CPE induit entre autres la formation de petits et grands complexes avec les protéines occludines et claudines, respectivement (59).

1.3.2 Activité biologique de CPE

La toxine CPE peut être inactivée par une chaleur de 60°C pendant 5 minutes, ou par des pH extrêmes, soit sous 5,0 ou plus grand que 8,3. La trypsine ou la chymotrypsine peuvent entraîner une augmentation de deux à trois fois l'activité de CPE en stimulant les protéases intestinales (60). Des chercheurs ont découvert que la protéine CPE émerge sous la forme d'un brin de 319 acides aminés avec un point isoélectrique de 4,3 (61). Le séquençage a indiqué que la séquence d'acides aminés pour CPE était relativement inchangée parmi la majorité des *C. perfringens* type F (45). Contrairement à d'autres protéines, la séquence de CPE ne présente aucune homologie avec d'autres toxines, à l'exception d'une ressemblance limitée avec une protéine non neurotoxique produite par *C. botulinum* (62). De plus, les souches de type E

gènèrent une variante de CPE présentant une variation pour dix acides aminés par rapport aux CPE qui sont générées par les souches de type F, C et D (48, 50, 63).

Les claudines, une famille de protéines cruciales essentielles au maintien de l'architecture et de la fonction des jonctions serrées formées par les cellules endothéliales et épithéliales, agissent comme des récepteurs CPE (64, 65). En commençant par la liaison à des claudines spécifiques, CPE initie une cascade d'événements qui entraînent la disparition des cellules épithéliales intestinales (59). La mesure dans laquelle les claudines se lient à CPE peut varier considérablement. Les claudines -3 et -4 sont liées par la CPE avec une affinité élevée, alors que les claudines -8 et -14 ne sont liées qu'avec une affinité modérée. Les claudines -1 et -2, à l'inverse, présentent peu ou pas de capacité de liaison (65). L'activité de liaison de CPE implique les deux boucles extracellulaires (ECL) trouvées dans les claudines et pour lesquelles il a été démontré qu'elles participaient au processus de liaison (66). Les claudines sont largement similaires pour ce qui est d'ECL1. Cependant, ECL2 est plus diversifiée et détermine si une claudine peut servir de récepteur pour CPE. La clé de la liaison claudine-CPE est un résidu Asp dans la séquence ECL2 qui est essentiel pour une affinité modérée à élevée (67).

Une fois que la CPE se lie au récepteur de la claudine, un complexe d'environ 90 kDa se forme (68, 69). Après la formation d'environ six petits complexes, un plus gros complexe d'environ 450 kDa nommé CH-1 est créé à la surface de la membrane plasmique (68). Après sa formation, le complexe CH-1 s'intégrant dans la membrane cellulaire cytoplasmique crée un pore qui augmente la perméabilité de la membrane (70). Suite à cela, un afflux de calcium se produit, entraînant une apoptose ou une oncose à l'origine de la mort cellulaire subséquente (71, 72). Cette mort cellulaire entraîne la formation d'un complexe de 600 kDa nommé, CH-2, par la formation de pores qui exposent également la surface cellulaire basolatérale des cellules, provoquant ainsi des dommages cellulaires considérables (68, 73).

1.3.3 Génétique du gène *cpe*

Il est rapporté que le gène responsable de la production d'entérotoxine, *cpe*, n'est détecté que dans 1% à 5 % des souches de *C. perfringens* (74). Une preuve concluante à l'appui de cette affirmation a été faite en utilisant des méthodes d'immunotransfert Western comparé

aux tests PCR et tests réalisés à l'aide de sondes marquées à la digoxigénine pour déterminer l'entérototoxicité des isolats de *C. perfringens*. Les résultats ont montré que les trois tests présentaient une sensibilité et une spécificité de 100 % pour distinguer les souches de référence non entérotoxigènes de celles qui étaient entérotoxigènes (74). Sa présence est limitée aux types C, D, E et F (33, 61). Alors que certaines souches de type F portent *cpe* au niveau de leur chromosome, d'autres le transportent sur des plasmides (24). Toutefois, dans aucune publication n'a été signalée la situation où un gène *cpe* chromosomique et plasmidique existaient dans la même souche entérotoxigène (22). La mobilisation et le transfert du gène *cpe* sont probablement facilités par son association avec des éléments génétiques mobiles. Cet élément génétique mobile joue un rôle crucial dans l'évolution de la virulence (46, 48, 50, 58, 75-77).

L'organisation des loci chromosomique et plasmidique de *cpe* a été comparée dans des isolats de type F. Le gène *cpe* chromosomique s'est avéré être étroitement associé à des séquences d'insertion, y compris une séquence IS1469 située à 1,3 kb en amont du gène *cpe*. De plus, deux séquences IS1470 ont été trouvées, dont l'une était située à 3 kb en amont du gène *cpe* et l'autre située à 1,2 kb en aval du gène *cpe* (75, 76). Bien qu'il ait été suggéré que ce gène *cpe* chromosomique, avec ses séquences IS1470 adjacentes, est un transposon, cela n'a pas encore été définitivement prouvé (75). Cependant, il y a eu des découvertes indiquant que des formes circulaires portant le gène *cpe* détectées par PCR dans la souche de type F NCTC8239 portant un gène *cpe* chromosomique pouvaient représenter des intermédiaires de transposition (77).

Caractérisée par la présence de séquences d'insertion IS1470, l'organisation génétique du locus *cpe* plasmidique comporte ces séquences situées à 3 kb en amont et 1,2 kb en aval du gène *cpe*. De plus, une seconde séquence d'insertion, IS1469, est détectée à 1,3 kb en amont de *cpe* à ce locus. Parmi les souches de type F, les familles de plasmides pCPF4969 ou pCPF5603 abritent exclusivement tous les plasmides portant le gène *cpe* (46). En possédant le gène *cpe*, les plasmides de la famille pCPF4969 sont typiquement flanqués en 3' par IS1470, tandis que les plasmides de la famille pCPF5603 sont flanqués par IS1151 (46). La présence de *cpe* sur des

plasmides de conjugaison comprenant ses séquences d'insertion pourrait contribuer à leur mobilisation (78).

1.3.4 Lien entre la sporulation et la production d'entérotoxine chez *C. perfringens*

C. perfringens est un microorganisme remarquable en raison de sa capacité à survivre dans des environnements peu propices à sa croissance. Ceci est largement attribuable à la formation de spores. Ces spores jouent également un rôle crucial dans la transmission de la bactérie de divers environnements aux hôtes, entraînant des infections telles que des toxi-infections alimentaires chez l'humain (79). La recherche indique que certaines spores de *C. perfringens*, en particulier celles de souches liées à une toxi-infection alimentaire, possèdent une résistance plus élevée aux températures extrêmes, telles que 100 °C pour des durées allant jusqu'à 60 minutes. Cela permet à *C. perfringens* de survivre pendant la préparation et la transformation inadéquates des aliments et, par conséquent, de contaminer le consommateur (80, 81).

Après l'activation des gènes impliqués dans le processus de sporulation, notamment *spo0A*, *SigF*, *ccpA* et *codY*, qui codent respectivement pour les régulateurs transcriptionnels Spo0A, SigF, CcpA et CodY, la synthèse de CPE qui partage ces mêmes gènes régulateurs est initiée. Cette sporulation nécessitera environ 6 à 8 heures pour que des niveaux maximaux d'entérotoxine soient atteints (1, 82, 83). Le gène *cpe* est transcrit à partir des promoteurs P1, P2 et P3, associés aux facteurs sigE (σ E) ou sigK (σ K) (82). Ces promoteurs semblent n'être actifs que dans les cellules-mères de *C. perfringens*. La production de CPE étant limitée au cytoplasme de ces cellules-mères de *C. perfringens* où la toxine peut s'accumuler et engendrer la formation de corps d'inclusion (84, 85). Cette CPE pourra s'accumuler jusqu'à représenter 20% des protéines totales de la cellule-mère de *C. perfringens* (85). C'est au moment de la lyse de celle-ci que CPE est libérée dans le milieu extérieur correspondant à la lumière intestinale (85). Bien que les quatre facteurs sigma spécifiques à la sporulation de *C. perfringens* soient nécessaires pour que celle-ci s'opère, seuls σ F, σ E et σ K sont essentiels pour la transcription et la production de CPE (79, 86).

1.3.5 Facteurs influençant la sporulation et la production d'entérotoxine

Limitée à des températures comprises entre 27 et 50 °C, des valeurs de pH de 6,0 à 8,0 et un $a^w > 0,96$, la sporulation de *C. perfringens* est un processus qui implique la formation de spores dans des conditions défavorables pour la croissance de cet pathogène. Ces conditions sont plus restreintes que celles requises pour la croissance (87). Dans des conditions optimales, il faut moins de trois heures pour que les spores se forment. Par conséquent, la composition du milieu affecte nettement la sporulation (88). La sporulation de *C. perfringens* peut être obtenue avec plusieurs milieux partiellement définis, y compris le New-Sporulation-Medium (NSM) et le D-medium (89). Les milieux de culture des microorganismes contiennent souvent divers ingrédients en association avec des sels, tels que le sulfate de manganèse ou le phosphate de sodium, et des agents réducteurs, dont le thioglycolate, la résazurine ou la cystéine-HCl (90). Quelques exemples de ces milieux comprennent le milieu Peptone-Bile-Theophylline-Starch (PBTS), le Duncan Strong medium et Peptone-Bile-Theophylline medium (PBT) (90). Les composants trouvés dans chaque milieu peuvent modifier considérablement le temps requis pour la sporulation. Fait intéressant, le sulfate de manganèse a été associé avec une amélioration de la sporulation de *C. perfringens* SM101, tandis que les sources de carbone telles que le raffinose, le mannitol, le glycérol et le glucose ont eu un effet plus varié selon la souche cultivée (91).

La production d'un facteur favorisant la sporulation a été démontrée pour les souches entérotoxigènes de *C. perfringens* et d'autres souches de *C. perfringens* (92-94). Le poids moléculaire de ce facteur de sporulation varie de 100 à 500 Da, et celui-ci est produit dans les milieux de culture sporulant et non sporulant à un stade précoce du cycle de croissance (92). Bien que seules les souches entérotoxigènes soient responsables de toxi-infections alimentaires, d'autres souches de *C. perfringens* peuvent également contribuer aux maladies gastro-intestinales via le facteur sporulant. La production de facteur de sporulation par les souches entérotoxigènes négatives pour le gène *cpe* peut provoquer la libération d'entérotoxine dans les intestins en induisant la sporulation chez les souches entérotoxigènes positives au gène *cpe*, entraînant une toxi-infection alimentaire (93, 95). Compte tenu de leur prévalence estimée entre 1% et 5 %, à la fois dans les aliments et dans l'intestin humain, ces

souches pourraient avoir un impact plus important qu'on ne le pensait auparavant (93). La sporulation des souches entérotoxigènes peut être induite par le facteur de sporulation produit par des souches qui ne sont pas entérotoxigènes. L'environnement acide de l'estomac et les sels biliaires du duodénum peuvent stimuler la sporulation et conséquemment, la production d'entérotoxine (94, 96).

1.3.6 Résistance des spores de *C. perfringens*

Au cours de la sporulation, *Clostridium* spp. produit plusieurs petites protéines que l'on nomme *small acid soluble proteins* (SASP) qui se lient à l'ADN des spores et qui offrent ainsi une protection contre diverses formes de stress tels que la chaleur et la dessiccation. Des études ont rapporté que *C. perfringens* produit trois SASP, nommées SASP-1, -2 et -3, et que la production de ces trois SASP est importante pour la résistance des spores de *C. perfringens* (97).

En investiguant le génome de la souche référence SM101, une souche entérotoxigène de *C. perfringens* formant des spores présentant une résistance augmentée à la chaleur, Li et McClane (2008) ont identifié un ORF codant pour une protéine possédant les caractéristiques de séquence d'une SASP qu'ils ont alors nommée SASP-4. Des variations de séquence de SASP-4 ont par la suite été identifiées dans de nombreuses souches de *C. perfringens* entérotoxigène portant le gène *cpe* sur le chromosome, contribuant ainsi à préciser le rôle de cette protéine dans la résistance augmentée des spores de ces souches par rapport aux autres souches de *C. perfringens* (81). C'est ainsi qu'il a été démontré que les souches de *C. perfringens* entérotoxigènes portant un gène *cpe* chromosomique présentaient systématiquement un variant de SASP-4 chez laquelle un résidu Asp remplaçait le résidu Gly en position 36. Des études de mutation et complémentation réalisées en lien avec ce résidu ont d'ailleurs confirmé son rôle (97). Bien que très importante, SASP-4 n'est pas le seul facteur contribuant aux propriétés de résistance exceptionnelles des spores de la plupart des souches de *C. perfringens* entérotoxigène portant un gène *cpe* chromosomique. Deux groupes de recherche ont, entre autres, suggéré que des différences ultrastructurales au niveau des spores formées par des souches entérotoxigènes portant un gène *cpe* plasmidique et chromosomique pourraient également contribuer au phénotype de résistance au stress pour ces dernières (80, 98). D'autres facteurs tels que la taille du noyau des spores, la concentration de l'acide dipicolinique (DPA) et

d'ions métalliques et le rapport protoplaste/sporoplaste ont également été impliqués dans la résistance à la chaleur des spores de *C. perfringens* entérotoxigène (80, 98).

1.3.7 Épidémiologie de *Clostridium perfringens* entérotoxigène et sa présence dans la viande

Au cours des dernières années, les recherches en épidémiologie moléculaire se sont concentrées sur l'identification des réservoirs de *C. perfringens* de type F et leur mode de transmission. Ces recherches visent à mieux comprendre l'épidémiologie des souches entérotoxigènes de *C. perfringens* portant un gène *cpe* situé dans le chromosome bactérien, ou sur des plasmides (99). Jusqu'à présent, il a été rapporté que les isolats de type F abritant le plasmide renfermant le gène *cpe* semblent être responsables de 30 % des incidents de toxi-infection alimentaire (100). Ces isolats se trouvent dans l'intestin des individus qui les portent sans aucune complication sanitaire et le sol (100, 101). En revanche, l'écologie des isolats de type F portant un gène *cpe* chromosomique et responsables de 70 % des cas de toxi-infection alimentaire reste encore mal comprise. Ces isolats n'ont pas été identifiés dans le sol et sont rarement portés par des humains sains (100-102). Une étude utilisant des isolats provenant d'échantillons humains, animaux, environnementaux et alimentaires a révélé que les souches avec un gène *cpe* plasmidique sont répandues et adaptées à l'intestin des mammifères. Au contraire, les souches possédant un gène *cpe* chromosomique semblent confinées à des environnements plus spécifiques, impliquant la dégradation de la matière végétale (10). Dans une étude récente menée en Angleterre et au Pays de Galles, 109 isolats de *C. perfringens* obtenus à partir de sources humaines ou alimentaires ont été analysés. L'étude a montré que 96,3 % des isolats de *C. perfringens* contenaient le gène *cpe* de l'entérotoxine et 82,6 % de ces isolats possédaient le gène *cpe* plasmidique, tandis que 17,4 % de ces isolats comprenaient une copie de *cpe*, sans détection d'aucun plasmide (103). En Finlande, une autre étude portant sur les fèces de manipulateurs sains d'aliments a rapporté que 18 % des souches de *C. perfringens* portaient le gène *cpe* codant pour l'entérotoxine. La majorité d'entre elles possédaient le gène *cpe* plasmidique. Plus précisément, 3,7 % des souches possédaient le plasmide IS1151-*cpe*, 2,9 % portaient le plasmide IS1470-like-*cpe* et seulement 0,7 % possédaient le gène *cpe* chromosomique IS1470-*cpe*. (102). Ces résultats suggèrent que les maladies d'origine

alimentaire causées par *C. perfringens* sont causées par deux populations distinctes, soit les souches portant un gène *cpe* plasmidique capables de contaminer les aliments entre autres par contact humain, puis les souches chez lesquelles un gène *cpe* chromosomique est identifié semblent plus probablement associées à du matériel végétal (10). Également, *C. perfringens* s'est révélé entérotoxigène chez les animaux domestiques, dont 17 % des chiens et 3 % des chats (104).

De plus, il a été rapporté que jusqu'à 12 % des aliments d'origine animale et 10 à 40 % des intestins d'animaux destinés à l'alimentation contiennent *C. perfringens* positif pour la présence du gène *cpe* (99). Une étude examinant une variété de viandes crues vendues dans les magasins de détail américains, y compris le jambon, le porc, le bœuf, la dinde, la saucisse, les crevettes et l'agneau, a révélé la présence d'isolats de type F porteurs du gène *cpe* chromosomique dans environ 1,4 % de 900 échantillons testés par analyse PCR multiplex après une culture bactérienne (105). L'enquête a, en outre, révélé que sur 27 % des échantillons de porc contaminés par *C. perfringens*, 1 % étaient positifs pour la présence du gène *cpe* alors que parmi 28% des échantillons de dinde pour lesquels *C. perfringens* a été identifié, 2 échantillons ont révélé la présence du gène *cpe* (105). Parmi d'autres études menées dans le monde, il y en a eu une recherche en Corée du Sud qui a utilisé l'approche culture bactérienne suivie d'une PCR pour examiner des échantillons de viande distribués dans les cantines scolaires. Ces échantillons provenaient de différentes viandes comme le bœuf, le porc, le poulet et le canard. En effet, à partir de 232 échantillons de viande, 8,19 % des échantillons de viande se sont révélés positifs à *C. perfringens*. De ces échantillons positifs, 12,9 % ont permis l'isolement de *C. perfringens*. Parmi les souches isolées, 90,0 % étaient porteuses du gène *cpe* (106). Au total, 45,5 % et 42,9 % des isolats provenant des échantillons des viandes de bœuf et de porc, respectivement ont révélé la présence de *cpe*. De tous les isolats, un seul a révélé la présence d'un gène *cpe* chromosomique (106). Une étude similaire réalisée au Japon qui a également appliqué la méthodologie de culture bactérienne suivie d'une PCR à partir de la viande de bœuf, de porc, de poulet, de canard et d'agneaux, a rapporté que sur 200 échantillons de viande analysés, 71 % se sont révélés contaminés par *C. perfringens*. L'étude a réussi à isoler un total de 212 isolats. De ceux-ci, 5,7 % récupérés des échantillons de bœuf étaient porteurs de *cpe*, contre 2,4 % en

provenance des échantillons de viande de porc (13). Aussi, dans une autre enquête effectuée en Inde et portant sur la prévalence de *C. perfringens* dans 211 échantillons de viande de différents animaux via une culture bactérienne suivie d'une PCR, il a été rapporté que des 175 échantillons positifs pour *C. perfringens*, 116 isolats de *C. perfringens* ont été identifiés. Alors que la présence de souches entérotoxigènes n'a pu être mise en évidence qu'à partir des échantillons de viande de buffle et de chèvre, l'étude a révélé que 9,3 et 32,4 % des isolats récupérés de ces viandes portaient le gène codant pour l'entérotoxine, respectivement (107). En utilisant une sonde marquée à la digoxigénine (DIG), une étude en Suisse a rapporté une prévalence de 14 %, 22 % et 0 % des souches entérotoxigènes à partir des échantillons fécaux de chevaux, de bovins et de porcs respectivement, tandis qu'une autre étude effectuée au Royaume-Uni a relevé que seulement 6 % des 98 isolats de *C. perfringens* obtenus à partir des fèces de différents animaux asymptomatiques portaient le gène *cpe* (108, 109).

Tout comme les plats préparés à base de viande, ceux contenant de la viande de poulet sont considérés comme la première cause de maladie d'origine alimentaire à *C. perfringens* dans le monde (110). Étonnamment, la toute première étude liée aux observations relatives à certains épisodes d'infections alimentaires impliquant la viande de poulet rapporte des épisodes s'étant produits entre décembre 1943 et février 1945, et lors desquels *Clostridium perfringens* a été le seul microorganisme isolé à la fois des consommateurs malades et de la viande de poulet qui leur avait été servie (111). Malgré cette constatation, les réservoirs et voies de contamination de la viande de poulet par *C. perfringens* capable de causer des toxi-infections alimentaires demeurent encore très peu documentés. Comme avec la plupart des agents pathogènes d'origine alimentaire tels que *Salmonella* spp. et *Campylobacter* spp., les souches de type F de *C. perfringens* semblent représenter un contaminant important des volailles entrant dans les abattoirs (112). Ainsi, la viande de poulet peut être considérée comme une source d'intoxication alimentaire par *C. perfringens* (113). Plus récemment, une étude réalisée au Canada a rapporté une prévalence variant entre 10 % et 25 % pour la présence de *C. perfringens* entérotoxigène sur des carcasses de poulets échantillonnées aux grandes étapes de la chaîne d'abattage des volailles (18). De plus, un autre travail menée en Suisse portant sur

des échantillons intestinaux et fécaux de volailles a révélé que 10 % et 80 % de ces échantillons étaient positifs pour *C. perfringens* entérotoxigène respectivement (108).

De plus, des recherches effectuées sur de la viande de volaille crue vendue au Japon, en Inde, au Canada et aux États-Unis ont révélé que *C. perfringens* était présent dans 6 à 97 % des échantillons de viande testés. Cependant, la prévalence des souches entérotoxigènes de *C. perfringens* variait entre 0 et 15,5 % parmi ces échantillons (12, 13, 15, 107, 114). Plus spécifiquement, une étude portant sur la fréquence de *C. perfringens* entérotoxigène dans des viandes choisies au hasard et qui combinait la méthode du nombre le plus probable (NPP) et une PCR de type *nested* après la culture bactérienne, a révélé la présence de *C. perfringens* dans 84 % des échantillons de viande de poulet analysés. De tous les isolats récupérés, 12.0 % portaient le gène *cpe* (12). Également une enquête similaire utilisant la PCR après une culture bactérienne sur 33 de produits de viande de poulet vendus au détail au Japon a démontré que 97.0 % des échantillons étaient positifs à *C. perfringens* et que 6.1 % des isolats provenant de ces échantillons portaient le gène *cpe* (13). En Inde, une autre étude portant sur 71 échantillons de viande de volaille a rapporté que 70,4 % des échantillons analysés étaient positifs à *C. perfringens* et que 15,5 % des isolats récupérés portaient le gène *cpe* (107). Plus récemment, une étude réalisée en Corée du Sud sur 45 échantillons de viande de poulets a rapporté que sur 9 isolats de *C. perfringens*, 6 d'entre eux possédaient le gène *cpe* (106).

1.3.8 Secteur avicole canadien et son rôle dans l'exposition des consommateurs à *Clostridium perfringens* et à *Clostridium perfringens* entérotoxigène.

Le poulet étant une source de protéine de choix pour les consommateurs canadiens, la consommation de poulet par habitant a augmenté de façon constante entre 2016 et 2019, selon le rapport annuel des Producteurs de poulet du Canada (PPC), en 2019. Comme résident normal du tractus gastro-intestinal des poulets à griller, *C. perfringens* colonise le microbiote digestif des oiseaux à partir de diverses sources telles que l'eau, la nourriture ou même l'environnement d'élevage (115).

Les programmes d'alimentation sans l'ajout d'antibiotiques sont à la base d'une incidence accrue d'entérite nécrotique aviaire, une maladie entérique associée à *C. perfringens*

de type G produisant la toxine netB (116-118). En plus des défis par rapport à la santé des oiseaux, il y a aussi la question liée à la salubrité des aliments. Avec l'abandon progressif de l'usage prophylactique et comme promoteur de croissance des antibiotiques, des questions ont été soulevées quant à une augmentation possible de la population globale de *C. perfringens* dans l'intestin des oiseaux et conséquemment sur la viande de volailles, pouvant ainsi représenter pour l'humain un risque important de maladies d'origine alimentaire (115, 119).

Par conséquent, des stratégies alternatives aux antibiotiques, comprenant l'utilisation de probiotiques, de prébiotiques, de symbiotiques, de phytogènes, d'acides organiques et de modifications alimentaires, telles que l'inclusion dans les aliments de composants botaniques comme des herbes, des épices et des huiles essentielles, sont utilisées dans les exploitations avicoles (115-117).

1.4 Infections à *Clostridium perfringens* entérotoxigène chez l'humain

Dans l'ensemble, *C. perfringens* entérotoxigène constitue une source de préoccupations sur le plan médical. Bien que cette sous-population entérotoxigène ne représente que moins de 5 % de la population de *C. perfringens*, celle-ci est à la base de conditions cliniques variées chez l'humain. Elle est, entre autres, à la base de cas de toxi-infections alimentaires qui se retrouvent parmi les causes les plus courantes de ces cas de toxi-infections dans la plupart des pays industrialisés. Il est aussi rapporté qu'entre 5 et 20 % de tous les cas de gastro-entérites d'origine non-alimentaire observés chez l'humain, comprenant la diarrhée associée à la prise d'antibiotiques et la diarrhée de nature sporadique, seraient liés à cette sous-population entérotoxigène (6, 63).

1.4.1 Toxi-infection alimentaire

La toxi-infection alimentaire à *C. perfringens* de type F est actuellement classée comme la deuxième des maladies bactériennes d'origine alimentaire les plus courantes (4). Au Canada, *C. perfringens* entérotoxigène figure en tête de liste des principaux agents responsables de toxi-infections alimentaires après *Salmonella* spp. et *Campylobacter* (2, 120).

Environ 75% des cas d'infections alimentaires sont causés par des isolats porteurs de gène *cpe* sur le chromosome, alors que 25% sont causés par des souches porteuses de *cpe* sur un plasmide. Étant donné que *C. perfringens* est omniprésent, les spores d'isolats de *C. perfringens* de type F peuvent potentiellement contaminer les aliments à tout niveau de la chaîne de transformation et de service des aliments à une densité variable (121). En raison d'une mauvaise manipulation des aliments, de la préparation à l'ingestion, ainsi que de la résistance remarquable des spores des souches de *C. perfringens* de type F, la charge de *C. perfringens* peut rapidement atteindre plus de 10^6 CFU/g d'aliment, qui est la dose infectante liée à des cas d'intoxication alimentaire (121). Lorsque les aliments sont insuffisamment cuits et gardés à des températures inadéquates ou encore, lentement refroidis après la cuisson, les bactéries peuvent se multiplier rapidement. Lors de l'ingestion des cellules végétatives de *C. perfringens*, les bactéries mourront probablement, à la suite de l'exposition à l'acidité gastrique. Cependant, si l'aliment est contaminé par plus de 10^6 CFU de *C. perfringens* par gramme d'aliment, certaines cellules ingérées survivront au passage dans l'estomac et resteront viables jusqu'à leur arrivée dans l'intestin grêle où elles seront en mesure de sporuler sous l'influence de certaines conditions adverses incluant les fortes concentrations de phosphate inorganique ou de sodium (53, 121). L'entérotoxine CPE est alors produite à l'intérieur de la cellule-mère, lors de la sporulation. Une fois libérée par la cellule-mère à la fin du cycle de la sporulation, CPE se liera rapidement aux cellules épithéliales intestinales et exercera son action de formation de pores, déclenchant ainsi une perte de liquide intestinal se manifestant cliniquement par la diarrhée (122). Cette dernière, caractéristique de l'intoxication alimentaire de type F, est observée chez près de 100% des patients, tandis que les crampes abdominales surviendront chez 95 à 70% de ceux qui ont consommé des aliments contaminés par des souches de type F (122). L'apparition des symptômes est généralement observée dans les 10 h suivant l'ingestion de l'aliment contaminé (121, 123). La toxi-infection alimentaire associée au type F fait appel à la présence de la bactérie dans l'intestin pour y sporuler pour provoquer une gastro-entérite. Généralement, la maladie disparaît spontanément dans les 24 h suivant son apparition, probablement suite à l'expulsion de la toxine dans les intestins par les selles diarrhéiques. Les décès dus à une intoxication alimentaire secondaire à *C. perfringens* de type F sont très rares,

survenant dans moins de 0,03% des cas. Souvent, la mort est causée par la déshydratation et survient chez les très jeunes, les personnes âgées ou encore les patients qui ont un déficit immunitaire ou qui sont affaiblis par la maladie (52, 124).

1.4.2 Diarrhée associée à la prise d'antibiotiques (DAA)

Reconnue sous le terme *antibiotic-associated diarrhea* ou AAD, la diarrhée associée à la prise d'antibiotiques est une complication grave qui demeure un problème de santé majeur, tant chez les patients hospitalisés que dans la collectivité (125). *Clostridioides difficile* est une cause étiologique bien connue de l'AAD, représentant 10-33% de tous les cas (126, 127). Cependant, d'autres pathogènes bactériens, y compris *C. perfringens* entérotoxigène, ont été impliqués dans le développement de l'AAD (127-129).

La découverte de *C. perfringens* comme responsable de la diarrhée nosocomiale en 1984 a été attribuée à Borriello et al (41). De plus, diverses recherches indiquent que *C. perfringens* joue un rôle important dans l'apparition de la diarrhée chez les patients qui ont pris des antibiotiques (41, 130, 131). Il demeure toutefois incertain si l'exposition aux antibiotiques permet principalement la prolifération de souches résidentes de *C. perfringens* entérotoxigènes ou si elle favorise plutôt leur acquisition. Chose certaine, les preuves soutenant un rôle causal pour *C. perfringens* entérotoxigène dans la maladie diarrhéique d'origine non-alimentaire incluent la présence d'entérotoxine dans les excréments des patients atteints de AAD (132, 133). Sparks et al. (2001) ont mené une étude pour identifier les isolats nord-américains impliqués dans ce type de tableau clinique. Dans leur rapport, il ressort que les formes entérotoxigènes de *C. perfringens* portant un gène *cpe* plasmidique sont celles associées à l'AAD dans la plupart des cas, quelle que soit leur origine géographique ou leur date d'isolement (134). Une équipe de chercheurs s'est récemment intéressée à l'épidémiologie moléculaire et à la prévalence de *C. perfringens* dans 2280 échantillons fécaux prélevés sur des patients diarrhéiques iraniens suspectés d'avoir une AAD. Parmi les échantillons fécaux, 68 isolats de *C. perfringens* ont été cultivés et 16 % de ces isolats appartenaient au type F (135). Certaines études suggèrent que *C. perfringens* est responsable de 10 à 15 % des cas de AAD (136). Cliniquement, les patients atteints de ce type de diarrhée signalent fréquemment des symptômes tels que des douleurs abdominales, des périodes prolongées de diarrhée allant de

trois jours à plusieurs semaines, et des selles contenant du sang (137, 138). Bien qu'un rétablissement complet soit typique, les personnes peuvent souffrir d'une maladie grave (139). Un scénario probable serait l'augmentation de l'incidence de la diarrhée associée à *C. perfringens*, à mesure que la population vieillissante augmente (134).

1.4.3 Diarrhée sporadique (DS)

En plus des toxi-infections d'origine alimentaire et de la diarrhée associée à la prise d'antibiotiques, *C. perfringens* entérotoxigène a également été signalé comme cause des cas de diarrhée sporadique, reconnue aussi sous le terme de *sporadic diarrhea* ou SD chez l'humain (132, 133).

La SD est considérée comme étant causée par un petit inoculum de cellules végétatives de *C. perfringens* entérotoxigène portant une forme plasmidique du gène *cpe* qui, suite à un transfert conjugatif de ce plasmide vers des populations intestinales non-entérotoxigènes de *C. perfringens* adaptées à l'environnement intestinal, entraîneraient des symptômes similaires à ceux d'une toxi-infection alimentaire causée par *C. perfringens*. La SD se développerait ainsi indépendamment de tout traitement antimicrobien (102, 134).

1.4.4 Syndrome de mort subite du nourrisson (SMSN)

C. perfringens, un habitant naturel de l'environnement, a le potentiel de se propager aux nouveau-nés hospitalisés par voie orale ou via l'environnement de soins, entraînant des maladies intestinales (140). Son lien avec le syndrome de mort subite du nourrisson (SMSN) remonte aux années 1970, car des souches de type F ont été récupérées à partir de tissus nécrotiques dans plusieurs cas de SMSN (141). Selon une étude britannique, le SMSN qui est responsable des décès inattendus de nourrissons de moins d'un an détient une prévalence de 14 % chez les bébés prématurés qui pesaient moins de 1 000 g à la naissance, avec des taux de mortalité allant de 30 % à 50 % (142, 143) . Dans les unités de soins intensifs néonatales, une étude réalisée au Royaume-Uni a révélé que 10 % des décès étaient liés au syndrome de mort subite du nourrisson (SMSN). Connue comme l'urgence gastro-intestinale néonatale la plus meurtrière au monde, le SMSN constitue une menace sérieuse (144, 145).

Le lien entre le syndrome de mort subite du nourrisson (SMSN) et *C. perfringens*, par opposition à *Klebsiella* spp., est un sujet à discussion. Certaines études montrent qu'au cinquième jour de vie, *C. perfringens* peut être trouvé dans le microbiote de la plupart des nouveau-nés, soutenant l'hypothèse selon laquelle la colonisation d'agents pathogènes conduit à une invasion microbienne (146). Ce processus invasif peut provoquer une pneumatose intestinale, insinuant fortement que les bactéries à Gram positif productrices de gaz comme *Clostridium* spp. seraient responsables (147, 148). Deux études récentes explorant le SMSN chez les bébés prématurés ont découvert une concentration élevée de *C. perfringens* dans le microbiote intestinal du nourrisson avant que la maladie ne se manifeste (146, 149).

1.5 Méthode d'isolement de *C. perfringens*

Dans l'ensemble, les méthodes disponibles pour détecter *C. perfringens* sont classées en méthodes d'isolement, tests biochimiques basés sur la production de métabolites, méthodes immunologiques basées sur les antigènes, principalement pour l'entérotoxine, ou encore, sur les techniques moléculaires pour détecter la présence du gène *cpe* (150).

1.5.1 Milieux d'isolement et de sporulation

De nombreux milieux ont été décrits pour isoler et dénombrer *C. perfringens*, à savoir le milieu au sulfure de tryptose, au citrate de fer, à la cyclosérine et la gélose aux perfringens, qui sont le sulfure de tryptose, le citrate de fer, la gélose cyclosérine et la gélose Perfringens (150, 151). Cependant, de nos jours, le milieu d'ensemencement sélectif le plus recommandé est le milieu gélosé tryptose sulfite cyclosérine, communément appelé TSC (152). Ainsi, *C. perfringens*, lorsque l'émulsion de jaune d'œuf est ajoutée à la gélose TSC, produit une zone blanche opaque entourant les colonies en raison de l'activité de la lécithinase (150). La confirmation à l'aide de tests biochimiques tels que la fermentation du lactose, la réduction des nitrates et la motilité, à partir de 10 colonies noires présumées, est recommandée (152).

Étant donné que la sporulation bactérienne est nécessaire à la production de l'entérotoxine, la détection de *C. perfringens* entérotoxigène à l'intérieur d'une population de *C. perfringens* peut s'avérer difficile, car toutes les souches entérotoxigènes ne sporulent pas

bien dans certains milieux et ne sont pas toutes présentes en quantité suffisante pour être détectées (88). Ainsi, pour surmonter ce problème, divers milieux, notamment les milieux Duncan Strong et Ellner, ont été développés pour favoriser la sporulation bactérienne (22). De plus, une étape d'enrichissement de la culture est nécessaire afin d'augmenter le nombre de cellules de *C. perfringens*, car il est rapporté que les souches entérotoxigène de *C. perfringens* sont généralement présentes en petite quantité dans les ingrédients alimentaires ou dans les environnements contaminés. Parmi ces milieux d'enrichissement, le bouillon fluid thioglycolate et le bouillon cooked meat sont les plus fréquemment utilisés (153).

L'approche par filtration sur grilles hydrophobes et hybridation sur colonies (HGMF-CH)

En 1970, Sharpe et Michaud (148) ont introduit une technique appelée filtration sur grilles hydrophobes et hybridation sur colonies, désignée en anglais par l'acronyme HGMF-CH pour hydrophobic grid membrane filtration-colony hybridization, qui consiste à utiliser des grilles hydrophobes pour la filtration d'un échantillon contenant les bactéries recherchées et une approche d'hybridation sur colonie à l'aide d'une sonde marquée afin de détecter les colonies d'intérêt (154). Une gélose sélective est utilisée, les conditions de culture et le type de gélose variant en fonction du micro-organisme ciblé (17, 155). Cette approche a également l'avantage de permettre le dénombrement des colonies (156).

Le dénombrement est suivi d'une étape d'hybridation, et la méthode est basée sur des sondes largement utilisées dans l'industrie alimentaire en raison de leur facilité d'emploi. Ces sondes d'acides nucléiques sont immobilisées sur un support inorganique (membrane en nylon), et peuvent être facilement manipulées sans les endommager ni les perdre. Le principe d'usage des sondes ADN est très simple. Il s'agit d'une hybridation de la séquence d'ADN d'un pathogène microbien, ciblée par une sonde qui présente une séquence d'ADN complémentaire, connue et marquée. Les liaisons hydrogène qui maintiennent ensemble les brins d'ADN complémentaires sur la sonde peuvent souvent être rompues en augmentant le pH au-dessus de 12 ou en augmentant la température au-dessus de 95°C, provoquant la dénaturation de l'ADN et la production de deux molécules simple brin (157). Le facteur le plus influent sur

l'efficacité de la méthode d'hybridation est sans équivoque la conception de la sonde. Cette conception est responsable à la fois de la spécificité et de la sensibilité de la méthode (158).

L'identification d'organismes cibles par des méthodes d'hybridation de sondes d'ADN est basée sur la présence ou l'absence de gènes spécifiques (157). Ainsi, pour les sondes, un ADN simple brin représentant le gène entier ou ses fragments a été synthétisé, complémentaire d'un gène microbien spécifique, et marqué avec une molécule rapporteuse radioactive ou non radioactive. L'approche consiste à filtrer l'échantillon pour la présence de l'agent pathogène, lyser toutes les cellules microbiennes présentes, libérer leur ADN, puis les dénaturer afin que les sondes qui leur sont ajoutées puissent s'hybrider à l'ADN simple brin complémentaire du micro-organisme cible (157). Un inconvénient majeur des tests basés sur cette approche utilisant des sondes est qu'ils nécessitent un nombre relativement important de cellules cibles, généralement 10^4 – 10^5 , pour obtenir des résultats concluants dans un contexte où les analyses sont réalisées à partir d'un échantillon mixte (159).

La méthode par HGMF-CH est un outil intéressant pour l'étude des réservoirs de *C. perfringens* entérotoxinogènes, car il a été rapporté que ce sous-groupe ne constitue que 1% à 5% de la population totale de *C. perfringens*, et que le HGMF-CH peut cibler spécifiquement le gène *cpe* (10). En plus de faciliter le dénombrement et l'isolement des souches entérotoxinogènes, cette méthode permet l'identification simultanée de la présence du gène *cpe* dans un grand nombre d'isolats (17, 160). En outre, cette méthode a été utilisée pour l'identification d'agents pathogènes distincts comme *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* vérotoxinogène, *Campylobacter jejuni* et *C. perfringens* entérotoxinogène (17, 161-165).

1.5.2 Identification de l'espèce

Les méthodes d'identification de *C. perfringens* sont basées sur des caractéristiques qui sont spécifiques à ce microorganisme et peuvent être utilisées seules ou de manière combinée.

Test de Nagler

Le test de Nagler évalue la capacité d'un microorganisme à produire l'enzyme lécithinase, une phospholypase agissant sur la lécithine. Les organismes producteurs de lécithinase sont identifiés par une zone d'opalescence entourant des colonies individuelles sur

gélose à base de jaune d'œuf. La lécithinase de *C. perfringens* est inhibée par l'antitoxine de *C. perfringens* de type A. *C. sordelli* et *C. bifermentans* produisent des enzymes qui sont également étroitement liées à la toxine alpha de *C. perfringens* (lécithinase) et peuvent produire une réaction croisée partielle. Un résultat Nagler positif est indiqué par la production de lécithinase et l'inhibition induite par l'antitoxine (166).

Test de Reverse CAMP (Christie-Atkins-Munch-Peterson)

Le test de reverse CAMP ou de CAMP inversé en français est un test qui peut être utilisé pour différencier *C. perfringens* des autres espèces de *Clostridium*. *Clostridium perfringens* produisant la toxine alpha et les streptocoques hémolytiques du groupe B produisant le facteur hémolytique CAMP ensemencés de manière perpendiculaire sur gélose au sang présenteront une double hémolyse en forme de flèche caractéristique due à l'action combinée de ces deux facteurs (167). Une des premières études ayant rapporté l'utilisation de ce test pour l'identification de *Clostridium perfringens* rapportait une sensibilité de plus de 97% (167).

1.5.3 Caractérisation phénotypique et génotypique

Des méthodes phénotypiques comprenant le biotypage, le sérotypage, le typage phagique et les tests de sensibilité aux antimicrobiens ont été développées pour caractériser les souches de *C. perfringens* (168). Ces méthodes sont accessibles, faciles à réaliser et relativement peu coûteuses. Cependant, tous les réactifs spécifiques disponibles ne conviennent pas nécessairement à toutes les souches. Par conséquent, de nombreuses souches peuvent ne pas être typables. De plus, le pouvoir discriminatoire n'est souvent pas suffisant pour les études épidémiologiques (169).

Des méthodes de génotypage ou des méthodes basées sur l'ADN ont été développées pour caractériser *C. perfringens*. Ces techniques comprennent l'analyse plasmidique, le ribotypage, la réaction en chaîne par polymérase (PCR), l'électrophorèse sur gel d'agarose en champ pulsé (PFGE), le polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (AFLP), le Multi-locus séquence typing (MLST), le séquençage du génome complet (WGS) (170-174). Plus récemment, le WGS est apparu comme une technique plus précise et surtout plus discriminante, car elle permet la caractérisation complète du génome (175-177).

1.6 Variabilité génétique de *Clostridium perfringens* entérotoxigène

En 2002, *C. perfringens* est devenue la première bactérie anaérobie à Gram positif du phylum Firmicutes dont le génome a été entièrement séquencé dans le but d'explorer son potentiel de virulence (178). Ladite étude, utilisant la souche de référence 13 de *C. perfringens*, a révélé un seul chromosome circulaire d'une taille de 3,03 Mb, avec une faible teneur de 28,6 % en G+C (178). Il a été rapporté que ce génome codait pour 2 660 protéines qui couvraient environ 83 % du chromosome entier (178). Par la suite, des études faisant appel à la génomique comparative appliquée à des souches de type A ont montré une variation génomique significative entre ces souches, avec plus de 300 îlots génomiques présents de manière variable (179). Cependant, bien que de nombreux pathogènes aient été séquencés et étudiés, les données sur la séquence du génome de *C. perfringens* disponibles demeurent limitées dans les bases de données publiques, et ces ressources sont encore plus rares pour *C. perfringens* entérotoxigène (178, 180-182).

Récemment, une étude s'est intéressée au génome entier de *C. perfringens* impliqué dans des épisodes de toxi-infections alimentaires a révélé une évolution génétique différente pour les souches portant un gène *cpe* plasmidique et les souches négatives pour la présence de ce gène (174). Cette analyse a aussi démontré que le gène *dcm*, codant pour la cytosine méthyltransférase, était proximal au gène *cpe* transmis par plasmide et que les deux séquences d'insertion IS1469 et IS1470-like se trouvaient dans un échafaudage de 70 kb, ce qui est cohérent avec des études antérieures (174). Également, un examen approfondi de la diversité de *C. perfringens* a révélé des tendances intéressantes. Entre autres, la distribution des gènes de virulence était différente selon la présence ou l'absence du gène *cpe* (174). Les souches entérotoxigènes portaient cinq à sept gènes de virulence, tandis que d'autres souches de *C. perfringens* portaient huit à dix gènes de virulence. La présence de *cpe* était associée à un faible nombre d'autres gènes de virulence. Plus précisément, une forte association a été observée entre la présence de *cpe* et l'absence de certains gènes de virulence, y compris les gènes *pfoA* et *nanI*, qui codent pour la perfringolysine O et pour une sialidase, respectivement (174). Ces résultats sont similaires à ceux rapportés dans des études antérieures révélant que la plupart des souches de *C. perfringens* positives pour CPE ne possèdent pas le

gène *pfoA* (11). Aussi dans cette étude, le gène *nagH* codant pour la hyaluronidase a été enregistré comme le seul gène de virulence présent dans certains isolats provenant d'éclosions, suggérant que *nagH* pourrait être un marqueur du potentiel entérotoxigène des souches négatives pour le gène *cpe* (174).

Chapitre 2: Hypothèses et objectifs

Dans la vision de bien comprendre l'épidémiologie de *C. perfringens* entérotoxigène, incluant ses réservoirs et voies de transmission jusqu'au consommateur, et plus particulièrement le réservoir que représentent les poulets de chair, la présente étude vise à isoler les souches entérotoxigènes de *C. perfringens* à partir d'échantillons de liquides de rinçage de carcasses de poulets de chair contaminés par ce pathogène. Nous émettons donc l'hypothèse qu'une méthode d'isolement faisant appel à l'hybridation sur colonie permettra d'isoler *C. perfringens* entérotoxigène à partir d'échantillons de liquides de rinçage de carcasses de poulets de chair contaminés par ce pathogène. Pour ce faire, les objectifs de l'étude sont de i) valider la capacité d'une sonde marquée à la digoxigénine à détecter le gène *cpe* codant pour une entérotoxine de *C. perfringens* entérotoxigène ii) valider l'utilisation d'une approche d'isolement combinée à l'hybridation sur colonie pour détecter *C. perfringens* entérotoxigène à partir d'échantillons de liquides de rinçage de carcasses de poulets de chair contaminés par ce pathogène.

**Article en préparation pour le journal Pathogens:
Addressing current challenges in poultry safety: Development
of a cultivation and colony hybridization approach to recover
enterotoxigenic *Clostridium perfringens* from broiler chicken
carcasses**

Kakese Mukosa Rosette^{1,2}, Alexandre Thibodeau^{1,2,3}, John Morris Fairbrother^{2,3}, William
Thériault^{1,2,3}, Marie-Lou Gaucher^{1,2,3}

2.1 Abstract

Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* ranks among the top three bacterial pathogens causing human foodborne illnesses in Canada. Despite this large number of disease cases, the reservoirs and routes of transmission of the pathogen to humans remain poorly documented, mainly attributed to the difficulties associated with its isolation from complex samples. While broiler chicken carcasses appear to be an important source of enterotoxigenic *C. perfringens*, only a selective isolation approach will allow for a better understanding of the epidemiology of this pathogen. In the present study a combination of filtration and colony hybridization, or direct plating and colony hybridization, including the evaluation of the efficacy of a digoxigenin (DIG) labeled probe were used to reveal the presence of the *cpe* gene encoding the *C. perfringens* enterotoxin. The samples used in this study were i) genomic DNA extracts ii) agar prints of pure enterotoxigenic *C. perfringens* colonies, and iii) *C. perfringens* colonies grown from the filtration or direct plating of broiler carcass rinsate. Positive hybridization signals were observed from genomic DNA extracts and colonies on agar plates, suggesting that the synthesized probe is capable of detecting the *cpe* gene. In addition, positive hybridization signals were reported from artificially contaminated broiler chicken carcass rinsate submitted to grid filtration and direct plating. Results from the current study showed that an isolation approach combining grid filtration or direct plating to colony hybridization is a promising tool for the isolation of enterotoxigenic *C. perfringens* from complex samples such as broiler chicken carcass rinsates, raising hopes for a better understanding of the epidemiology of this major zoonotic pathogen.

Keywords: broiler chicken carcass rinsate, filtration, direct plating, *cpe*-positive *Clostridium perfringens*, colony hybridization.

2.2 Introduction

Clostridium perfringens, a Gram-positive, rod-shaped, anaerobic microorganism is found in soils, wastewaters, foods, feces, and is part of the normal intestinal microbiota of warm-blooded animals and humans (6, 183). In addition to being capable of forming spores, the virulence of this microorganism has historically been attributed to its arsenal of about 20 potent toxins, responsible for histotoxic, neurological and intestinal infections (9, 25). For many years, *C. perfringens* has been classified into five toxinotypes, from A to E, based on the carriage of the four main toxin-encoding genes *plc* (alpha toxin or CPA), *cpb* (beta toxin or CPB), *iap* (iota toxin or ITX) and *etx* (epsilon toxin or ETX) (152). Recently, this classification system has been revised to incorporate two new complementary types, namely toxinotypes F and G, respectively. These toxinotypes representing strains of *C. perfringens* producing the enterotoxin CPE and those carrying a necrotic enteritis B-like toxin (NetB) which is recognized as a major virulence attribute of avian necrotic enteritis-causing *C. perfringens*. (9). While this recently revised classification scheme recognizes types B, C and D strains of *C. perfringens* as the main cause of enteric diseases in animals, it also restricts type A strains to isolates responsible for gas gangrene, therefore redirecting *C. perfringens* carrying both the *plc* and *cpe* genes to the new F toxinotype (9). Formerly identified as type A CPE-positive *C. perfringens*, strains belonging to type F are now recognized as enterotoxigenic *C. perfringens* producing an enterotoxin (CPE) which is a member of the aerolysin pore-forming toxin family, and has been associated with human gastrointestinal diseases such as food poisoning, antibiotic-associated diarrhea (AAD), sporadic diarrhea (SD) and nosocomial diarrheal illness (99).

Each year, foodborne diarrhea attributed to enterotoxigenic *C. perfringens* affects approximately 176 000, 1 000 000, and 80 000 people in Canada, the United States and the United Kingdom, respectively, resulting in an economic burden of U.S. \$382 million annually in the United States (2, 184, 185). Experts agree that enterotoxigenic *C. perfringens* infections are mainly foodborne and that meat, including poultry products, represents the most important vehicle for the transmission of the pathogen to consumers (6, 186, 187). Even though the first episodes of human food poisoning involving enterotoxigenic *C. perfringens* and linked to the consumption of chicken meat were reported as long as nearly 80 years ago, few research

studies have looked into the presence of the pathogen in this food commodity, and even fewer have established a link between this food reservoir and human outbreaks (111). Indeed, depending on the study and the method used to identify and recover enterotoxigenic *C. perfringens* from retail chicken meat samples, the presence of this microorganism has varied from 0% to 24% among the chicken meat samples analyzed (12-14, 16, 105, 114, 188). At the slaughter plant level, a recent study conducted by our group revealed that up to 25% of the broiler chicken carcasses sampled after chilling were positive for the presence of the *cpe* gene (18). Although chicken meat, and more globally poultry products, have been shown to be a reservoir of enterotoxigenic *C. perfringens*, it remains unclear how and when *C. perfringens* with the potential to cause food poisoning enters the food supply chain and how it reaches to the consumer's plate. To this date, many questions remain unanswered regarding the reservoirs and transmission routes of this zoonotic pathogen, thereby complicating its surveillance and control (99, 103, 174).

The scarcity of information on the epidemiology of enterotoxigenic *C. perfringens* is partly due to the difficulty in isolating of this microorganism. Indeed, in addition to the fact that enterotoxigenic *C. perfringens* would account for only 1% to 5% of the global *C. perfringens* population, it has been shown that a majority of these enterotoxigenic strains would also lack the *pfoA* gene encoding the theta toxin responsible for the internal zone of double hemolysis. This phenotype is usually used to select colonies on blood agar further complicating the recovery of this zoonotic microorganism from samples harboring a diverse and complex microbiota such as poultry meat products (10, 189). When documenting the effectiveness of different molecular approaches to detect the presence of enterotoxigenic *C. perfringens* in meat samples, Kaneko et al., highlighted the relevance of combining PCR to a selective pre-enrichment step for improving the detection of this zoonotic pathogen (153). With a view to isolating enterotoxigenic *C. perfringens*, Heikinheimo et al. suggested a cultivation and detection approach specifically targeting *cpe*-carrying *C. perfringens* as well as using colony hybridization (17, 102). The aim of the current study was then to exploit the very few research results generated on the identification and isolation of enterotoxigenic *C. perfringens* in order to develop an approach that would improve the recovery of this zoonotic pathogen from broiler

chicken carcass rinsates. The proposed approach includes a sequential combination of selective pre-enrichment, PCR-based detection of the *cpe* gene, classical isolation on selective growth media and colony hybridization.

2.3. Materials and methods

2.3.1 Sampling

Broiler chicken carcass rinsate samples used in this study were collected from two different poultry processing plants in the province of Quebec, Canada, during a previous research project conducted by our group (18). Briefly, 16 sampling visits were carried out between February and July 2017. Five different flocks were sampled during each visit, for a total of 379 carcass rinsates recovered at five critical steps of the slaughter process, namely after bleeding, with feathers still attached to the carcass (B), before evisceration (BE), before chilling (BC), after immersion water chilling (W) and dry air chilling (A) (18). After a centrifugation step (15 000 g for 20 min, ThermoFisher Fiberlite F14-6 × 250 LE Rotor) applied on 200 mL of the carcass rinsate, the pellet was resuspended in 4 mL of buffered peptone water (Lab M Ltd., Heywood, Royaume-Uni) and 1 mL of the suspension was used to inoculate 9 mL of fluid thioglycolate with resazurin (FTG) (Biokar Diagnostics, Cedex, France). A PCR-based approach targeting the *cpe* gene (specific primer pairs *cpeF*-GGAGATGGTTGGATTAGG and *cpeR*-GGACCAGCAGTTGTAGATA) (188) was submitted on all samples after 24 h of incubation at 37°C under anaerobic conditions (AnaeroGen Gas Generating System, Oxoid, Ontario, Canada). For each PCR reaction, a reaction volume of 25 µL was used. This volume consisted of 15 µL sterile water, 1× reaction buffer (10× ThermoPol reaction buffer, NEB, Canada), 0.2 µM dNTP (Bio Basic Inc. Ontario, Canada), 2.5 U Taq DNA polymerase (NEB, Canada), 1 µL of each 10 µM primer and 5 µL of template DNA. DNA amplification was performed using a Roche LightCycler® 96 real-time PCR thermocycler (Roche Diagnostics, Laval, Canada) with the following reaction conditions: a primary denaturation step at 94°C for 2 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min. Finally, a last extension step at 72°C for 10 min was performed. Then, 10 µL of the PCR-amplified products were visualized under UV light after electrophoresis on a 1% agarose gel containing 0.01% SYBR

Safe DNA gel staining (Invitrogen, Burlington, Canada). The 38 samples enriched in FTG from which *cpe* was identified were centrifuged (ThermoFisher Fiberlite F14-6 × 250 LE Rotor) before discarding the supernatant and preserving the pellet into 2 mL of a powdered skim milk-based freezing medium (10% skim milk, 7.5% glucose, 10% sucrose, 1% bovine serum albumin, and distilled water) that was subsequently kept at -80°C. It is important mentioning that some samples negative for the presence of *cpe* were stored along with the *cpe*-positive samples for the purpose of the current study.

2.3.2 DNA extraction

Genomic DNA extraction was done on the enterotoxigenic *C. perfringens* AHL 311 control strain and on the *C. perfringens* reference strain ATCC 13124 using the InstaGene matrix protocol with a 10% Chelex solution (Bio-Rad, Mississauga, Ontario) (18). Briefly, control and reference strains were subcultured on sheep blood agar plates (Oxoid, Nepean, Ontario, Canada), under anaerobic conditions, at 37°C for 24 h. Ten to 15 colonies were recovered from each agar plate, before being resuspended in 1 mL of sterile distilled water. The bacterial suspension obtained was vortexed and centrifuged at 13 000 g for 3 min. The supernatant was removed, and the pellet was resuspended in 200 µL of a 10% Chelex solution. The microcentrifuge tubes were treated at 56°C for 30 min on a hot plate, and were subsequently placed in boiling water, at 100°C for 10 min. After boiling, the bacterial suspension was vortexed and centrifuged at 13 000 g for 3 min. The resulting supernatant was collected and stored at -20°C.

2.3.3 Synthesis of the digoxigenin-labeled DNA probe targeting *cpe*

As described by Heikinheimo et al., with slight modifications, fragments of 333 bp from the *cpe* gene were PCR amplified (17). To do so, the DNA extracted from the enterotoxigenic *C. perfringens* AHL 311 control strain was used. After amplification, the DNA was quantified by DENOVIX following the manufacturer's instructions (DeNovix and Qubit dsDNA Assay, Biolabtech LTD), and labeled using the DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter kit I from Roche Diagnostics. As recommended by the manufacturer, the labeled PCR product obtained was visualized on a 1% agarose gel containing 0.01% SYBR Safe DNA gel stain

(Invitrogen, Burlington, Canada). The synthesized DNA probe was preserved at -20°C until used to detect the *cpe* gene during the steps described below.

2.3.4 Hybridization of the labeled probe on bacterial genomic DNA and pure lysed colonies of enterotoxigenic *C. perfringens* AHL 311 control strain and *C. perfringens* ATCC 13124 reference strain

In order to validate both the specificity and sensitivity of the synthesized probe, bacterial genomic DNA and lysed colonies from *C. perfringens* AHL 311 and ATCC 13124 were used, based on the protocol described in the Roche Diagnostics Manual and according to Heikinheimo et al. (17, 190). The DNA extracted from *C. perfringens* AHL 311 and ATCC 13124 was denatured at 95°C for 5 min, before 2 µL drops of the denatured DNA were placed on a nylon colony printing and plate hybridization membrane (Roche, Indianapolis, Indiana). For fixing the DNA on the nylon membranes, the latter were dried in a hybridization oven at 80°C for 30 min. *C. perfringens* AHL 311 and ATCC 13124 were subcultured on blood agar plates in anaerobic conditions, for 24 h at 37°C. After incubation, the grown colonies were replicated on nylon membranes by aseptically placing membranes on agar plates. Printed colonies were dried out by incubating the nylon membranes at 37°C for 30 min. Membranes were then treated with different solutions to perform bacterial cell lysis. To do so, membranes were incubated in 2 ml of denaturing solution (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) for 5 min, followed by 5 min of incubation in 2 mL of neutralizing solution (1.0 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, pH 7.4), and by a 10 min incubation step in 2 mL of 2 × saline sodium citrate (SSC) (1× SSC is 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate). After bacterial cell lysis, membranes were dried at 80°C for 30 min in a hybridization oven in order to fix the DNA. Membranes were subsequently placed in a roller bottle containing the prehybridization solution (DIG Easy Hyb Granules, Roche, Indianapolis, Indiana) and then prehybridized at 42°C for 1 h. The prehybridization solution was discarded and replaced with fresh hybridization solution containing 0.5 µL of denatured probe/ml and the incubation was continued at 42°C for 2 h. Membranes were washed twice at room temperature, for 5 min each time, with a low stringency buffer (2× SSC, 0.1% sodium dodecyl sulfate) added to the rolling bottles, followed by two 15 min washes at 68°C with a high stringency buffer (0.5× SSC, 0.1 %

sodium dodecyl sulphate). Membranes were then placed in a solution containing the anti-DIG antibody for 30 min, before being placed in a washing solution (Kit DIG Washing and Blocking buffer set, Roche, Indianapolis, Indiana) for 15 min at room temperature. This washing step was repeated twice. After washing, membranes were incubated for 5 min in a detection solution (Kit DIG Washing and Blocking buffer set, Roche, Indianapolis, Indiana), and then incubated for 14 h in a chromogenic solution of 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT: Sigma, St Louis, MO), in the dark, at room temperature. Nylon membranes were visually analyzed to detect positive hybridization signals corresponding to the *cpe*-positive colonies after their incubation in the Tris-EDTA solution (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), as described in the DIG application Manual (Table 1, Figure 1) (190).

2.3.5 Detection of the *cpe* gene from sterile freezing medium artificially contaminated with *C. perfringens* AHL 311 control strain using hydrophobic membrane grid filtration and colony hybridization

A freezing tube containing 2.5 ml of sterile powdered skim milk-based freezing medium was artificially contaminated with 10^3 CFU of *C. perfringens* AHL 311. Briefly, *C. perfringens* AHL 311 was grown in FTG (Biokar Diagnostics, Cedex, France) at 37°C for 24 h in an anaerobic environment (AnaeroGen Gas Generating System, Oxoid, Nepean, ON, Canada). The bacterial culture was subjected to 10-fold serial dilutions until reaching 10^{-6} for counting. One Hundred μ L of the 10^{-4} dilution was used to artificially contaminate the sterile freezing medium with 10^3 CFU of *C. perfringens* AHL 311 (Table 3 for bacterial counts) before the freezing tube was stored at -80°C in order to approximate the stockage conditions of the broiler carcass rinse samples used in the present study. The artificially contaminated freezing medium was further thawed on ice before 1 ml was collected and centrifuged at 14520 g for 20 min. The pellet was then resuspended in 100 mL NaCl-Tween 80 (0.85% NaCl, Tween 80 and distilled water). After filtration through 10 hydrophobic filtration grids at a rate of 10 mL per membrane (Iso-Grid, HGMF; QA Laboratories, Toronto, Ontario, Canada), grids were placed on tryptose-sulfite-cycloserine (TSC) agar plates (1% D-cycloserine and egg yolk) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo). The TSC agar plates were incubated at 37°C for 48 hours, before carefully printing approximately

1250 isolated colonies onto a nylon membrane. The membrane was then subjected to the hybridization protocol described in point 2.3.4.

2.3.6 Detection of the *cpe* gene from broiler chicken carcass rinsates artificially contaminated with *C. perfringens* AHL 311 control strain using hydrophobic membrane grid filtration and colony hybridization (HGMF-CH)

The broiler chicken carcass rinsates used were collected during a previous study conducted by our group and confirmed as *cpe*-negative using a PCR-based approach as described in Gaucher et al. (18). Tubes containing the broiler chicken carcass rinsate samples were thawed on ice before being artificially contaminated with *C. perfringens* AHL 311. For the HGMF-CH approach, three tubes were used (Table 2). For all these three tubes, bacterial counts of generic *C. perfringens* were established. To do so, 1 mL from each tube was added to 9 mL of tryptone-salt (0.1% tryptone and 0.85% NaCl) and then 10-fold serially diluted to reach 10^{-6} . One Hundred μL of each dilution was plated on TSC agar plates (1% D- cycloserine and egg yolk) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.) and incubated for 24 h at 37°C under anaerobic conditions (AnaeroGen Gas Generating System, Oxoid, Nepean, ON, Canada). Subsequently, sample tubes were inoculated with 10^2 and 10^3 cfu of *C. perfringens* AHL 311, before being stored at -80°C until analyzed (Table 3 for contamination levels). One mL from tube 2 that had been previously thawed on ice was resuspended in 200 mL 1% NaCl-Tween 80 (0.85% NaCl, Tween 80 and distilled water). After gentle agitation to uniformly resuspend the bacteria, the whole 200 mL volume was filtered at a rate of 10 mL per hydrophobic grid (ISO-GDRID; QA Laboratories, Toronto, Ontario, Canada), for a total of 20 grids that were subsequently placed on tryptose-sulfite-cycloserine (TSC) agar plates (LAB M, UK) (1% D-cycloserine and egg yolk) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo). The TSC agar plates were incubated under anaerobic conditions at 37°C for 48h, and the 10 agar plates on which the larger number of isolated colonies were observed were aseptically printed onto a nylon membrane (Roche, Indianapolis, Indiana), before being submitted to the hybridization steps described in 2.3.4. One mL from tubes 1 and 3 that had previously been thawed on ice was resuspended in 200 mL 1% NaCl-Tween 80. Again, after

gentle agitation to uniformly resuspend the bacteria, 20 mL were filtered at a rate of 1 mL per hydrophobic grid (ISO-GDRID; QA Laboratories, Toronto, Ontario, Canada), for a total of 20 grids that were subsequently placed on TSC agar plates (1% D-cycloserine and egg yolk) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo). Bacterial growth from all 20 TSC agar plates was printed onto a nylon membrane (Roche, Indianapolis, Indiana), that were subsequently submitted to the hybridization steps described in 2.3.4. For all dilution protocols, positive hybridization signals were linked to their corresponding colony on TSC agar plates, and each suspect colony was subcultured on 5% sheep blood agar plates (Oxoid, Nepean, ON, Canada). The DNA from each colony was extracted using 10% Chelex (Bio-Rad, Mississauga, Ontario) according to the manufacturer's instructions (153). The *cpe* gene was PCR amplified, as described by Gaucher et al. (18).

2.3.7 Detection of the *cpe* gene from broiler chicken carcass rinsates artificially contaminated with *C. perfringens* AHL 311 control strain using a combination of direct plating and colony hybridization (DP-CH)

As the hydrophobic grids used for HGMF-CH approach were discontinued by the manufacturer during the development of the method by our group, an alternative protocol consisting of a direct plating of the sample combined with colony hybridization (DP-CH) was also developed. Three different broiler chicken carcass rinsate samples negative for the presence of the *cpe* gene and collected during this previous study conducted by our group were identified as tubes 5, 6 and 7, and were used to validate this DP-CH approach (18). Bacterial counts of generic *C. perfringens* were established, as described in 2.3.6, before tubes, from 5 to 7, were artificially contaminated with 10^2 , 10^3 and 10^5 CFU of *C. perfringens* AHL 311, respectively (Table 2). Again, different sample dilution protocols were used in order to establish the best approach according to the different levels of contamination by enterotoxigenic *C. perfringens* selected. At the time of analysis, 1 mL from tubes 5 and 6 was recovered and diluted 1:1 in tryptone-salt before being 10-fold serially diluted twice (10^{-2}). One hundred μL of the 10^{-2} dilution were spread onto 30 different TSC agar plates, for a total volume of 3 mL, before being incubated in anaerobic

conditions for 24 h at 37°C. Grown colonies on all 30 TSC agar plates were printed onto nylon membranes that were subsequently submitted to the hybridization protocol described in 2.3.4. For analyzing tube 7 contaminated with 10^4 cfu of *C. perfringens* AHL 311, 1 ml of the sample that had been previously thawed on ice was mixed with 9 ml of tryptone salt. The mixture was then 10-fold serially diluted until 10^{-5} , and 100 uL of each dilution, from 10^{-2} to 10^{-5} were individually spread on TSC agar plates that were incubated anaerobically at 37°C for 24 h. For all sample tubes, grown bacterial colonies were printed by aseptically placing a nylon membrane directly on TSC agar plates and hybridization was performed as detailed in 2.3.4. After colony printing, TSC agar plates were incubated once again under anaerobic conditions for 24 h at 37°C in order to allow further bacterial growth and facilitate recovery of *cpe*-positive colonies. Bacterial colonies linked to positive hybridization signals after application of the hybridization protocol described in 2.3.4 were retrieved from TSC agar plates, subcultured on 5% sheep blood agar plates (Oxoid, Nepean, ON, Canada) and carriage of the *cpe* gene was confirmed using the PCR approach referenced above (18).

Table 1 - Hybridization steps, buffers and incubation times

Hybridization step	Buffers	Time/Temperature
Bacterial lysis and DNA denaturation	Denaturing solution: 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)	5 min/ambient
	Neutralizing solution: 1.0 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, pH 7.4	5 min/ambient
	2× saline sodium citrate (SSC): 0.3 M NaCl, 30 mM sodium citrate	10 min/ambient
Pre-hybridization	Easy Buffer hyb	1 h/42°C
Hybridization of the probe	Easy Buffer hyb and probe	2 h/42°C
Membrane washing	stringency buffer: 2× SSC, 0.1% SDS	2× 5 min/ambient
	stringency buffer: 0.5× SSC, 0.1% SDS	2× 15 min (68°C)
	Washing buffer B1 (Kit DIG Washing and Blocking buffer set)	5 min/ambient
Membrane blockage	Blocking buffer: B2 and B3 (Kit DIG Washing and Blocking buffer set)	30 min/ambient
Antibody binding	anti-DIG antibody and blocking buffer B2 and B3 (Kit DIG Washing and Blocking buffer set)	30 min/ ambient
Membrane washing	Washing buffer B1 (Kit DIG Washing and Blocking buffer set)	15 min/ambient
Signal detection	Detection buffer B4: Kit DIG Washing and Blocking buffer set	5 min/ambient
	Detection buffer B4 + chromogenic solution (NBT/BCIP)	14 h/ambient, in the dark
Stop the chromogenic reaction	TE buffer (Tris-EDTA)	5 min/ambient

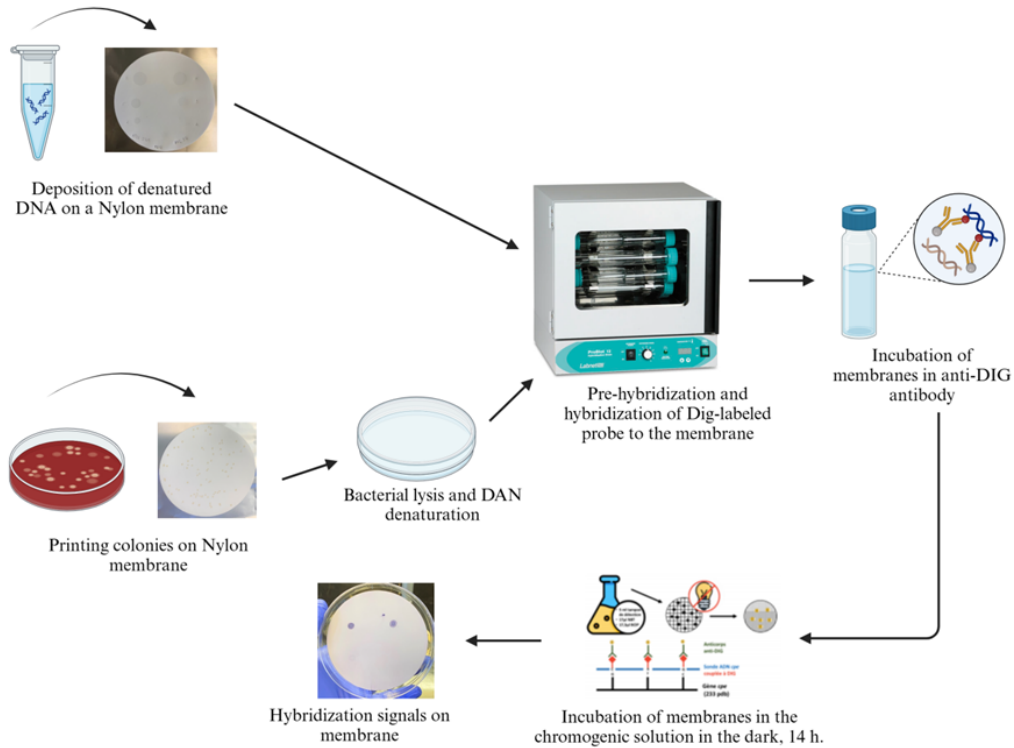


Figure 1 - Scheme of the hybridization method. Created with BioRender.com

2.4 Results

2.4.1 Sampling

For the detection of the *cpe* gene from broiler chicken carcass rinsate samples artificially contaminated with *C. perfringens* AHL 311 using either the HGMF-CH or the DP-CH approach, 7 broiler chicken carcass rinsate samples were used, all of which tested negative for the presence of the *cpe* gene. For all of these sample tubes, counts of generic *C. perfringens* were established before the artificial contamination with *C. perfringens* AHL 311 control strain (Table 2).

Table 2 - Sample tubes used and their respective bacterial concentrations for generic *C. perfringens* and enterotoxigenic *C. perfringens* AHL 311 control strain used for the development of the HGMF-CH and DP-CH approaches in the current study

	Sample tubes identification	Bacterial counts (CFU/mL)	
		Generic <i>C. perfringens</i>	Enterotoxigenic <i>C. perfringens</i> AHL 311 control strain
HGMF-CH approach	Tube 1	4.3×10^7	8.5×10^2
	Tube 2	1.3×10^6	5.8×10^3
	Tube 3	6.5×10^7	1.71×10^3
	Tube 4	Sterile freezing medium	2.5×10^3
Direct plating and colony hybridization (DP-CH) approach	Tube 5	4.3×10^7	8.5×10^2
	Tube 6	1.76×10^5	1.43×10^3
	Tube 7	5.6×10^7	8.5×10^5

HGMF-CH: Hydrophobic membrane grid filtration and colony hybridization.

2.4.2 DNA Extraction

Three distinct DNA extractions were performed: two DNA extractions from the *cpe*-positive *C. perfringens* AHL 311 control strain that yielded 27.9 ng/μL and 33.3 ng/μL of DNA and one DNA extraction from the *cpe*-negative ATCC 13124 *C. perfringens* reference strain yielding 28.0 ng/μL of DNA. Ten ng of genomic DNA from AHL 311 were added to 50 μL of DIG kit reagents, as recommended by the manufacturer, and 2 μL of this 50 μL suspension was used for DNA-DNA probe hybridization, according to the Roche Manual (190).

2.4.3 Synthesis of the digoxigenin-labeled DNA probe targeting *cpe*

DNA probes were synthesized by PCR, incorporating the digoxigenin-substituted ribonucleotide dig-UTP. For the labeled-DNA probe synthesis, 7 distinct assays giving the same

probe with different concentrations varying from 4.57 ng/μL to 54.8 ng/μL were performed (Table 3, Figure 2). For each hybridization assay, 25 ng of DIG-labeled DNA probe/mL of hybridization buffer were used according to the Roche guidelines (190).

Table 3 - Synthesized probes and their respective concentration

Probes synthesized in the current study	Probe concentration (ng/μL)
Assay 1	4.57
Assay 2	25.8
Assay 3	35.2
Assay 4	46.2
Assay 5	37.6
Assay 6	51.9
Assay 7	54.8

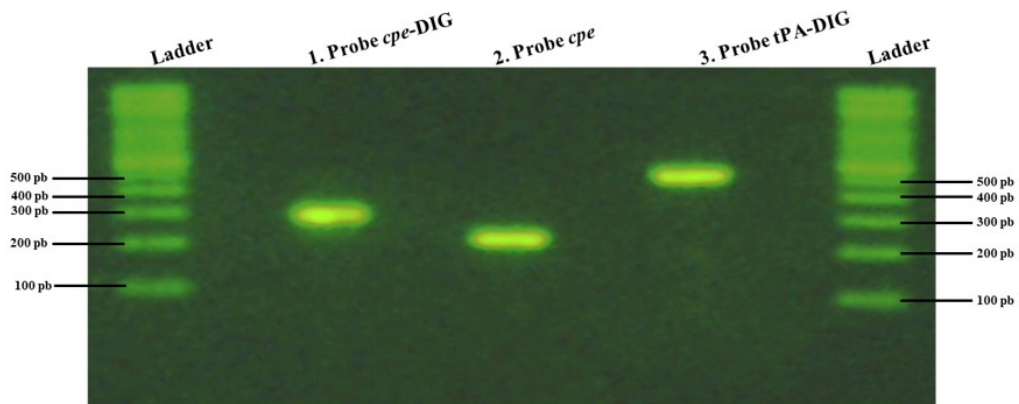


Figure 2 - Probe typical results obtained on 1% agarose gels after electrophoresis following synthesis of a digoxigenin (DIG)-labeled DNA probe (Probe 2 in this case) used in this study. 1. DIG-labeled probe. 2. Unlabeled positive control, which corresponds to the amplification of the *cpe* gene without DIG. 3. Labeled positive control which corresponds to the labeled probe that

recognizes tissue plasminogen activator (tPA) sequences used as a positive control (according to the Roche Diagnostics protocol).

2.4.4 Hybridization between the labeled probe and the *cpe* gene from bacterial genomic DNA or pure lysed bacterial cells from *C. perfringens* AHL 311 control strain and *C. perfringens* reference strain ATCC 13124

Hybridization of the labeled-DNA probe was performed to confirm the specificity of the probe. Four separate hybridization tests were performed: two with the *C. perfringens* AHL311 genomic DNA and two with pure lysed bacterial colonies from this same control strain. Positive hybridization signals visually appeared as small purple dots on nylon membranes. These signals were detected for all membranes on which DNA samples and lysed colonies of *C. perfringens* AHL311 were dropped or printed, respectively. Conversely, no positive hybridization signal was observed for membranes on which DNA or lysed colonies of the reference strain *C. perfringens* ATCC13124 were present (Figures 3 and 4).

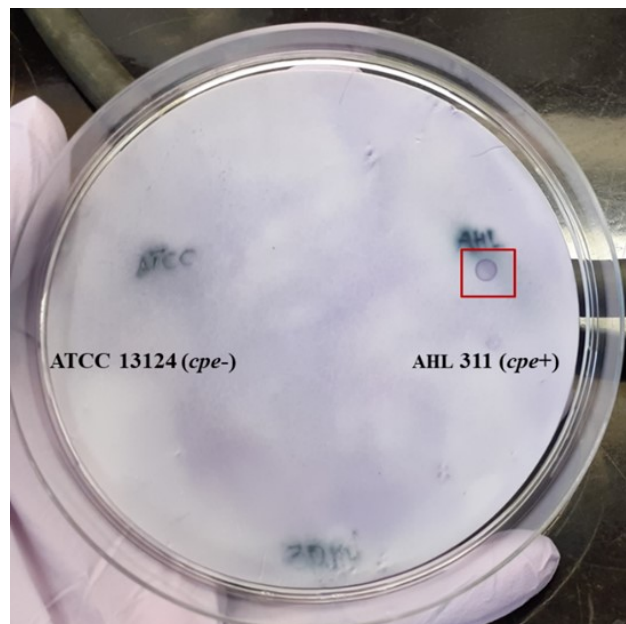


Figure 3 - Nylon membrane after hybridization between the labeled probe and the DNA from *C. perfringens* control strains used in this study (AHL 311 and ATCC 13124); positive hybridization

signals were observed for AHL 311 only. Red square is showing DNA demonstrating positive hybridization signal.

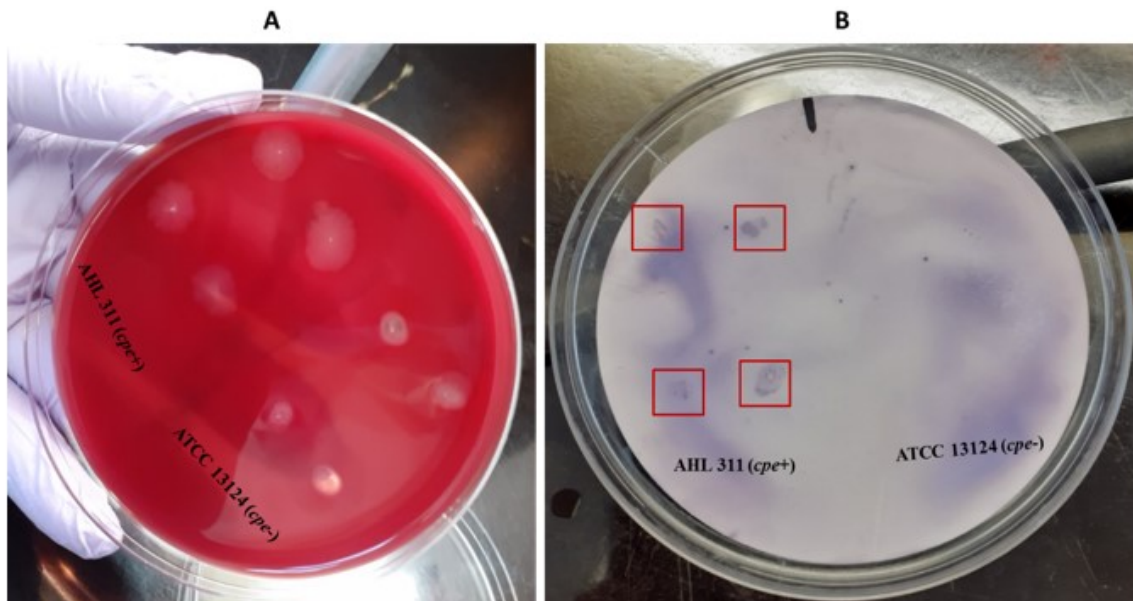


Figure 4 - Hybridization from pure lysed strains of *C. perfringens* reference strains positive and negative for the *cpe* gene (AHL 311 and ATCC 13124). **A.** Bacterial growth on a blood agar. **B.** Nylon membrane after hybridization between the labeled-probe and lysed colonies of *C. perfringens* reference; positive hybridization signals were observed from AHL 311 lysed colonies, whereas no hybridization signal was generated for ATCC 13124. Red squares is showing colonies demonstrating positive hybridization signal.

2.4.5 Detection of the *cpe* gene from sterile freezing medium artificially contaminated with *C. perfringens* AHL 311 using a hydrophobic grid membrane filtration and colony hybridization (HGMF-CH) approach

Assays using the sterile freezing medium (Tubes 4, Table 2) artificially contaminated with 2.5×10^3 CFU of *C. perfringens* AHL 311 control strain were performed. After filtration and incubation of the hydrophobic grids, a total 980 colonies were counted from the 10 TSC agar plates and hybridization signals were observed for these colonies on all membranes. Positive hybridization signals were not counted at this step. The Figure 5 shows one of the 10 TSC agar plates and its corresponding nylon membrane revealing positive hybridization signals.

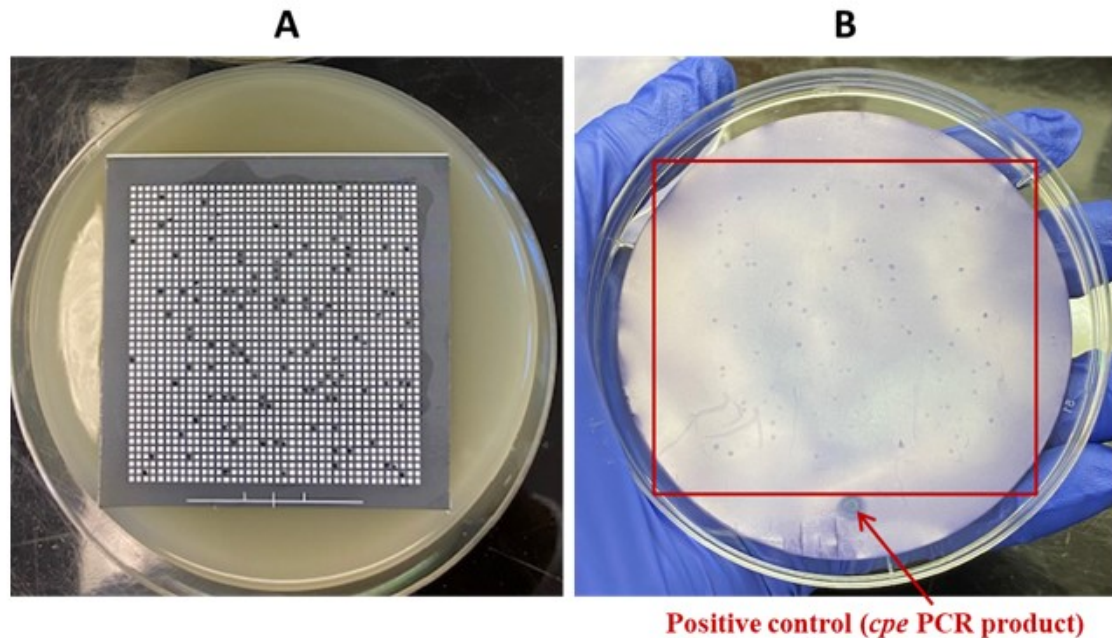


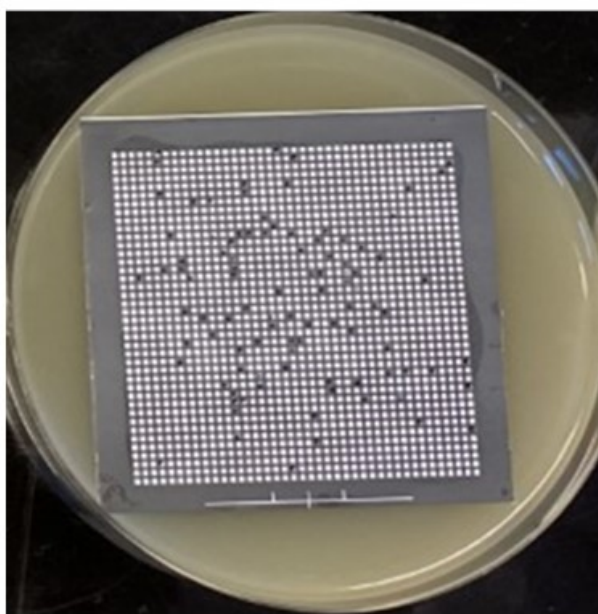
Figure 5 - Hybridization from lysed colonies grown from sterile freezing medium artificially contaminated with *C. perfringens* AHL 311. **A.** Bacterial growth of *C. perfringens* AHL311 from sample tube 4 on one of the 10 hydrophobic grids laid on TSC agar plates **B.** Positive hybridization signals from *cpe*-positive colonies of *C. perfringens* AHL 311 added to tube 4 containing sterile freezing medium filtered on hydrophobic grids incubated on TSC agar plates and printed on nylon membranes. The positive control corresponds to *cpe* PCR product. Red square is showing colonies demonstrating positive hybridization signal.

2.4.6 Detection of the *cpe* gene from broiler chicken carcass rinsates artificially contaminated with *C. perfringens* AHL 311 control strain using hydrophobic grid membrane filtration and colony hybridization

The HGMF-CH approach was applied to three tubes (Tubes 1 to 3) containing broiler chicken carcass rinsates negative for the presence of the *cpe* gene and artificially contaminated with the *C. perfringens* control strain AHL311 (Table 2). For sample tubes 1 and 3 that were submitted to the same dilution and filtration protocol, 20 nylon membranes were printed from hydrophobic grids. A total of 275 bacterial colonies were observed, among which 4 positive

hybridization signals were identified for sample tube 1 (Figure 6). The printing of 20 TSC agar plates from the filtration of sample tube 3 for which the concentration of generic *C. perfringens* was similar to the concentration of this bacterial population found in sample tube 2 yielded 998 colonies from which 5 hybridization signals could be observed (Figure 7). For sample tube 2, for which 10 ml on 20 nylon membranes and of which only 10 membranes were printed from hydrophobic grids, the hybridization signals were detected for this tube. However, neither colony counts nor hybridization signals were performed for this tube (Figure 8). The PCR result from tube 2 revealed that 14 of 32 randomly selected *C. perfringens* isolates tested were found to carry the *cpe* gene (Figure 9). The PCR results corresponding to 200 bp bands were submitted to sequencing and were confirmed to be sequences corresponding to enterococci (Figure 9).

A



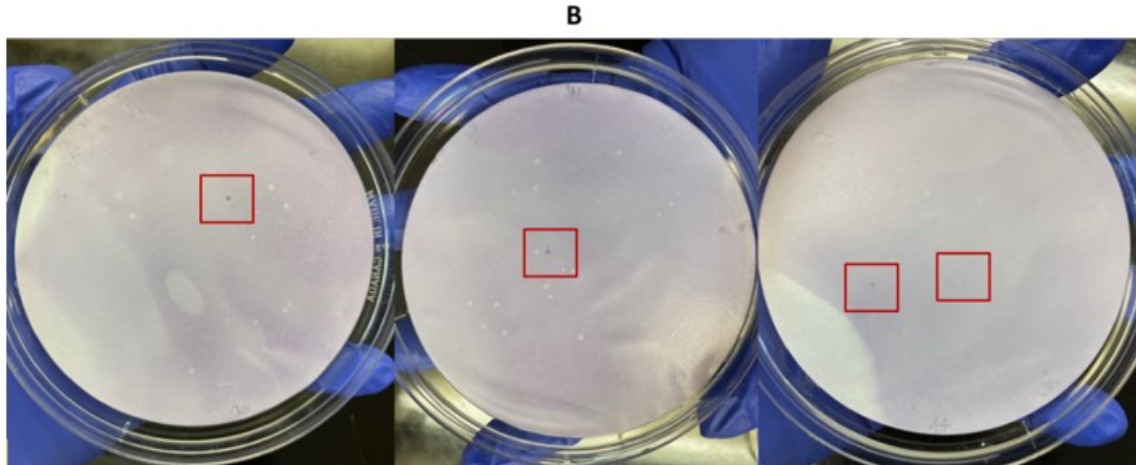


Figure 6 - Application of the HGMF-CH method using samples of broiler chicken carcass rinsates artificially contaminated with *C. perfringens* AHL311 (Tube 1, Table 2). **A.** *C. perfringens* growth on a hydrophobic grid incubated on TSC agar plates after the filtration of a broiler chicken carcass rinsate sample artificially contaminated with *C. perfringens* AHL311 (corresponding to sample tube 1). **B.** Colonies showing positive hybridization signals on a nylon membrane printed from TSC agar plates with *C. perfringens* growth (A). Red squares are showing colonies demonstrating positive hybridization signal.

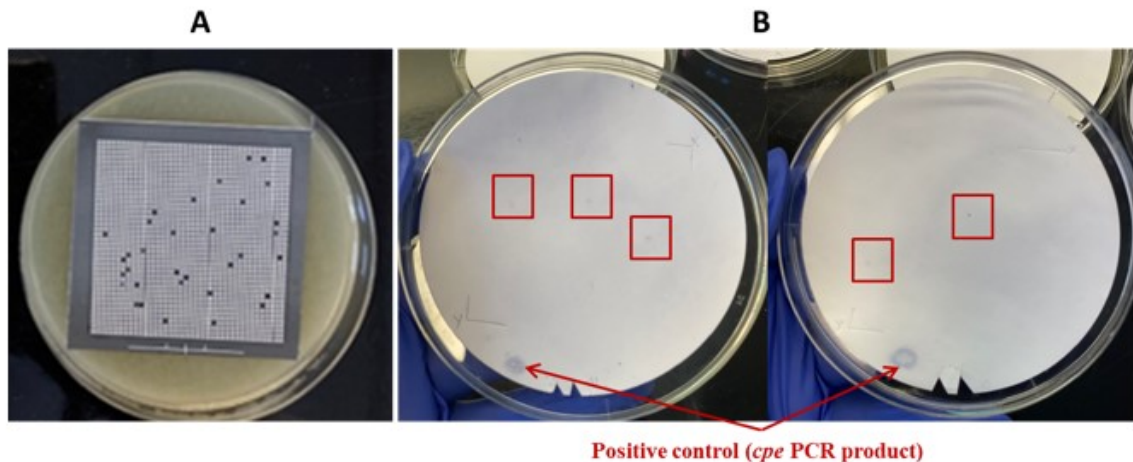


Figure 7 - Application of the HGMF-CH method using samples of broiler chicken carcass rinsates artificially contaminated with *C. perfringens* AHL311 (Tube 3, Table 2). **A.** *C. perfringens* growth on a hydrophobic grid incubated on TSC agar plates after the filtration of a broiler chicken carcass rinsate sample artificially contaminated with *C. perfringens* AHL311. **B.** Positive

hybridization signals on a nylon membrane printed from TSC agar plates with *C. perfringens* growth (A) were filtered. The positive control (*cpe* PCR product) appears on the nylon membrane. Red squares are showing colonies demonstrating positive hybridization signal.

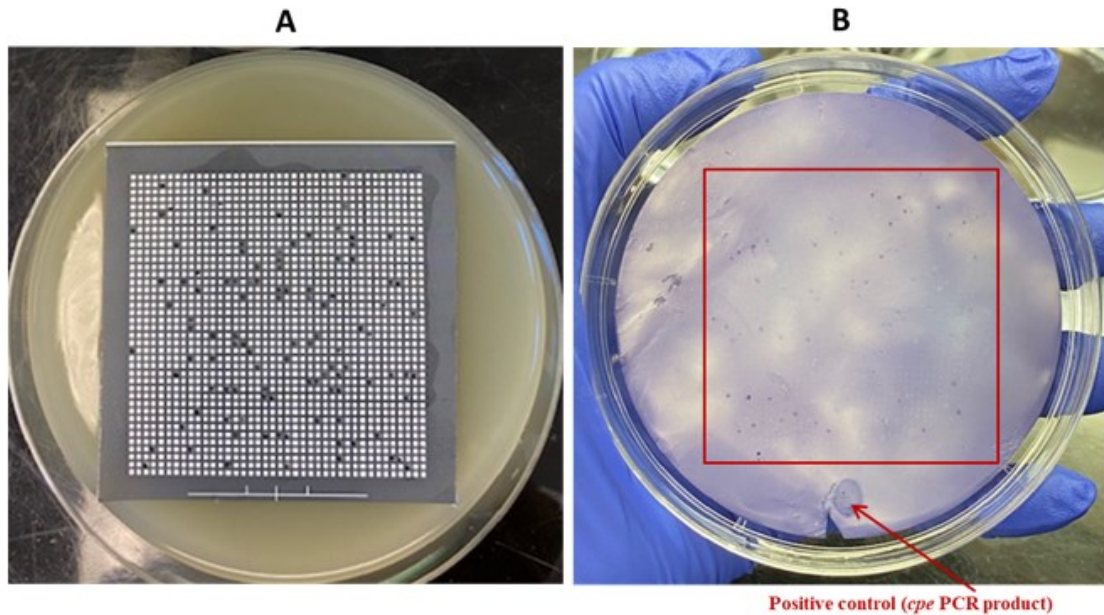


Figure 8 - Application of the HGMF-CH method using samples of broiler chicken carcass rinsates artificially contaminated with *C. perfringens* AHL311 (Tube 2, Table 2). **A.** *C. perfringens* growth on a hydrophobic grid incubated on TSC agar plates after the filtration of a broiler chicken carcass rinsate sample artificially contaminated with *C. perfringens* AHL311. **B.** Colonies showing positive hybridization signals on a nylon membrane printed from TSC agar plates with *C. perfringens* growth (A) were filtered. The positive control (*cpe* PCR product) appears on the nylon membrane. Red square is showing colonies demonstrating positive hybridization signal.

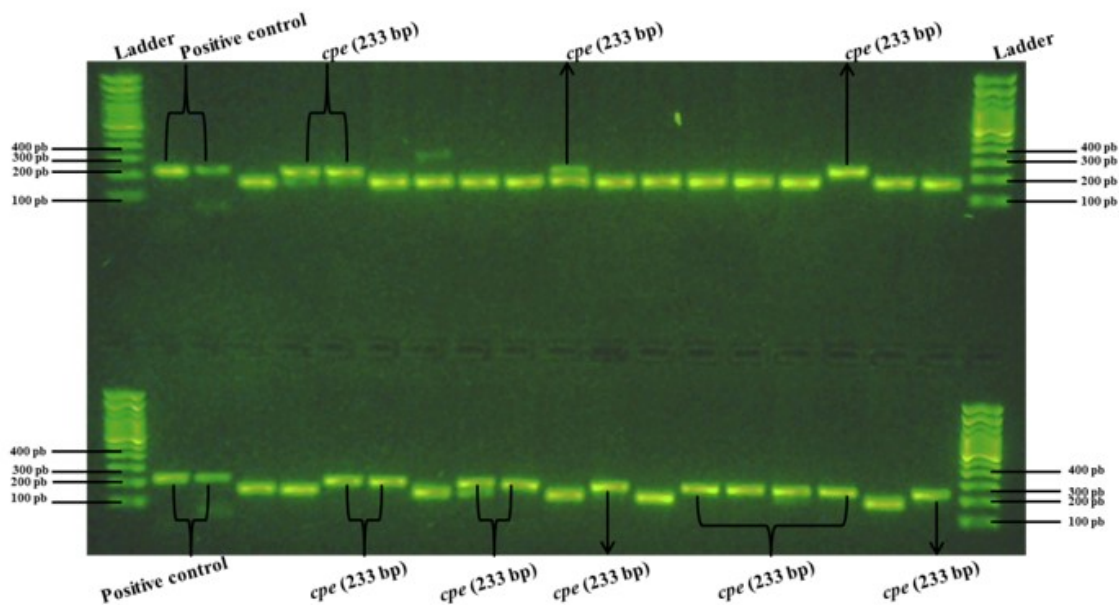


Figure 9 - PCR analysis of the presumed *C. perfringens* colonies subcultured on sheep blood agar plates after recovery from TSC agar plates following the detection of corresponding positive hybridization signals on nylon membranes. The 233-bp fragments correspond to *C. perfringens* enterotoxin-encoding gene, *cpe* (Tube 2, Table 2).

2.4.7 Detection of the *cpe* gene from broiler chicken carcass rinsates artificially contaminated with *C. perfringens* AHL 311 using a combination of direct plating and colony hybridization (DP-CH)

In order to validate the usefulness of the hybridization approach for the recovery of enterotoxigenic *C. perfringens* from broiler chicken carcass rinsate samples without resorting to the hydrophobic filtration grids, three sample tubes, from 5 to 7, containing broiler chicken carcass rinsates negative for the presence of the *cpe* gene and artificially contaminated with the *C. perfringens* control strain AHL311, were used as described in 2.3.7 and 2.4.1. Similar to the HGMF-CH approach, the DP-CH method was associated with positive hybridization signals for all sample tubes. Membranes printed from the 30 TSC agars plated from tube 5 artificially contaminated with 8.5×10^2 CFU of *C. perfringens* AHL311 revealed 2 positive hybridization signals out of a total of colonies that were too numerous to be counted (Figure 10). For tube 6

that was inoculated with 1.43×10^3 CFU of AHL 311, one single positive hybridization signal was observed from colonies that were again too numerous to be counted (Figure 11), and finally, the analysis of the tube 7 that was artificially contaminated with 8.5×10^4 CFU of *C. perfringens* AHL311 revealed 239 positive hybridization signals out of 777 grown colonies (Figure 12). For this latter sample tube, a PCR approach confirmed the presence of the *cpe* gene in 5 of 7 presumptive *cpe*-positive isolates analyzed from TSC agar plates. The two bands corresponding to 200 base pairs were submitted to sequencing and were confirmed to be sequences corresponding to enterococci (Figure 13).

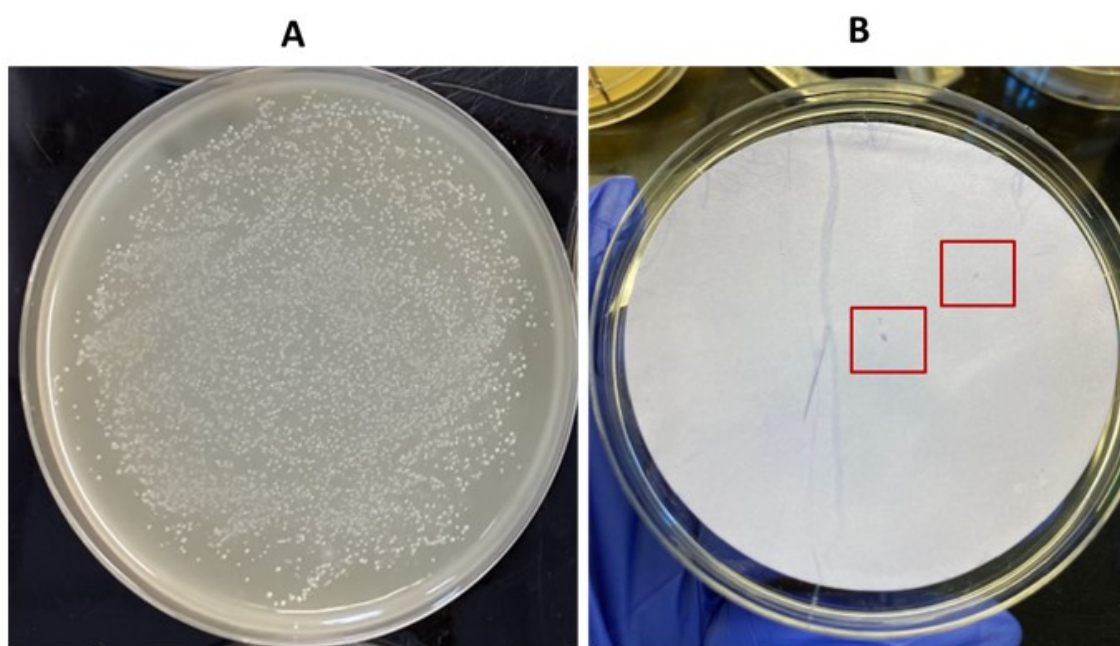


Figure 10 - Application of the DP-CH method using samples of broiler chicken carcass rinsates artificially contaminated with *C. perfringens* AHL311 (Tube 5, Table 2). **A.** Bacterial growth on a TSC agar plates obtained from the analysis of tube 5. **B.** Positive hybridization signals from colonies printed from the corresponding TSC agar plate (see in A). Red squares are showing colonies demonstrating positive hybridization signal.

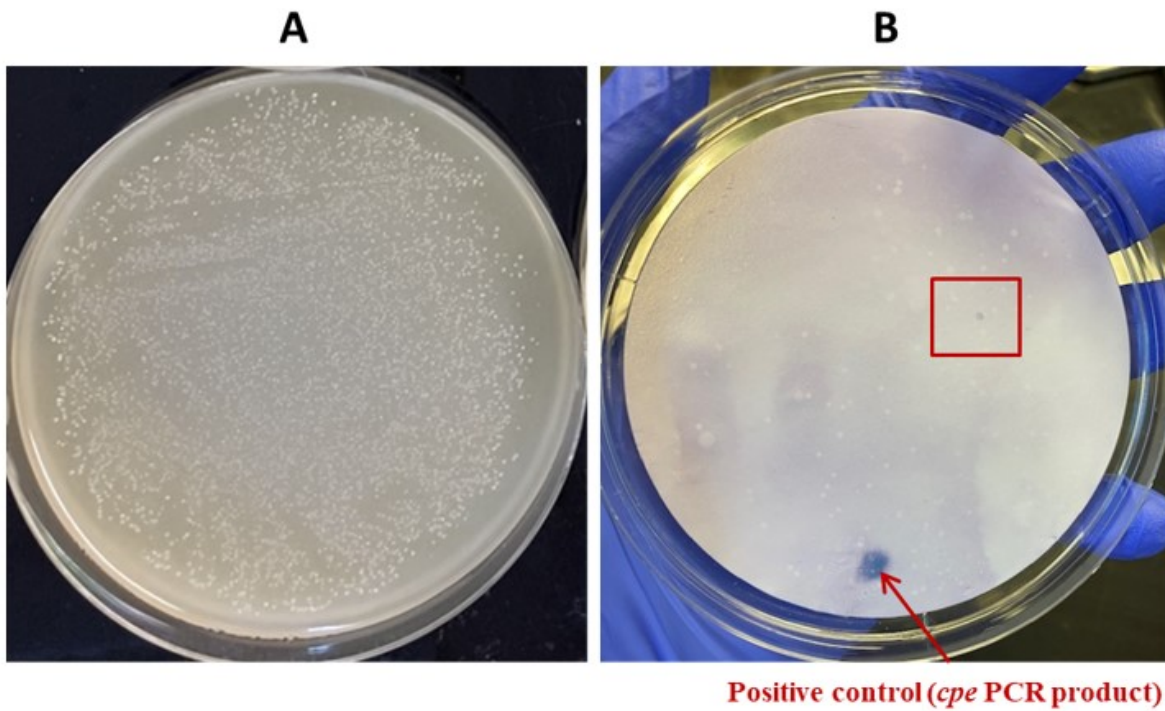
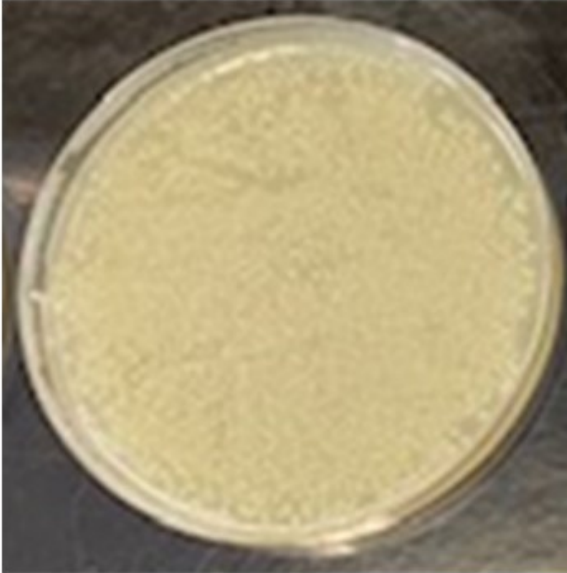


Figure 11 - Application of the DP-CH method using samples of broiler chicken carcass rinsates artificially contaminated with *C. perfringens* AHL311 (Tube 6, Table 2). **A.** Bacterial growth on a TSC agar plates obtained from the analysis of tube 6. **B.** Positive hybridization signals from colonies printed from the corresponding TSC agar plate (see in A) and from the positive control (*cpe* PCR product). Red square is showing colony demonstrating positive hybridization signal.

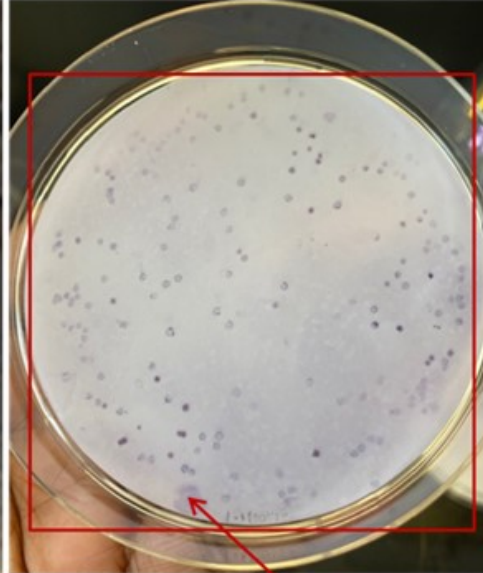
Dilution 10^{-2}

A



B

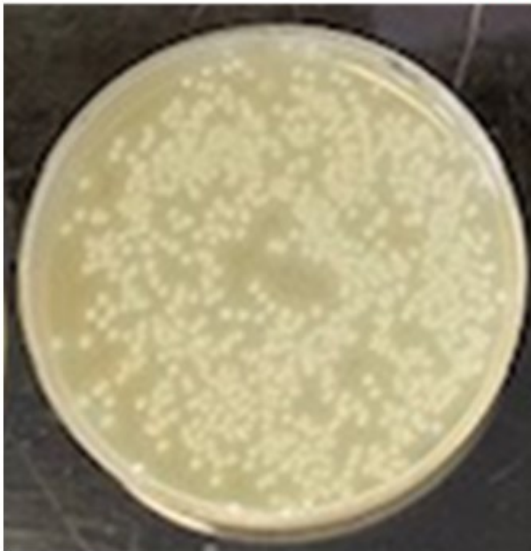
208 colonies demonstrating a positive hybridization signal



Positive control (*cpe* PCR product)

Dilution 10^{-3}

A



B

27 colonies demonstrating a positive hybridization signal



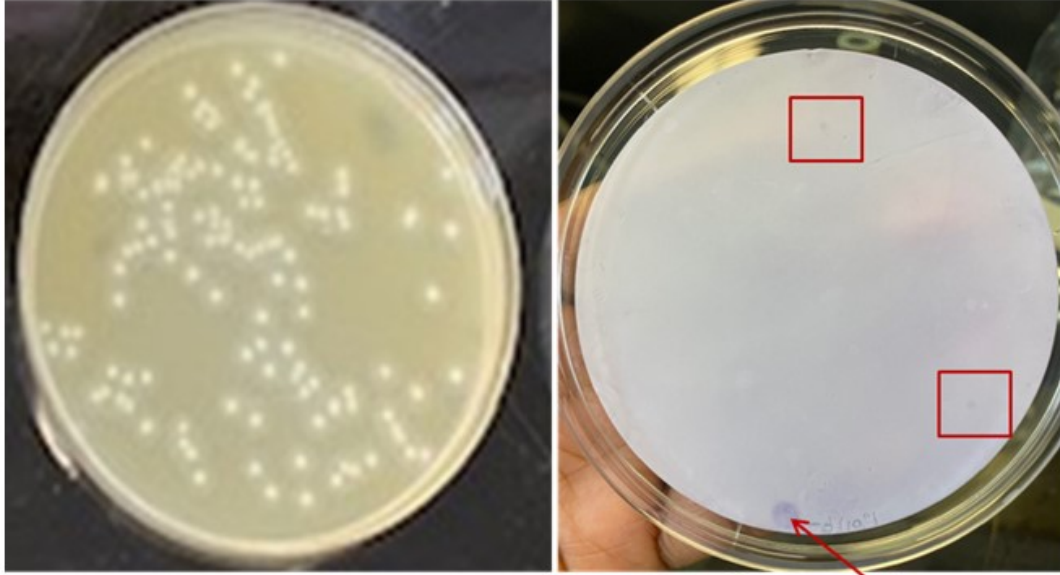
Positive control (*cpe* PCR product)

Dilution 10^{-4}

A

B

2 colonies demonstrating a positive hybridization signal



Positive control (*cpe* PCR product)

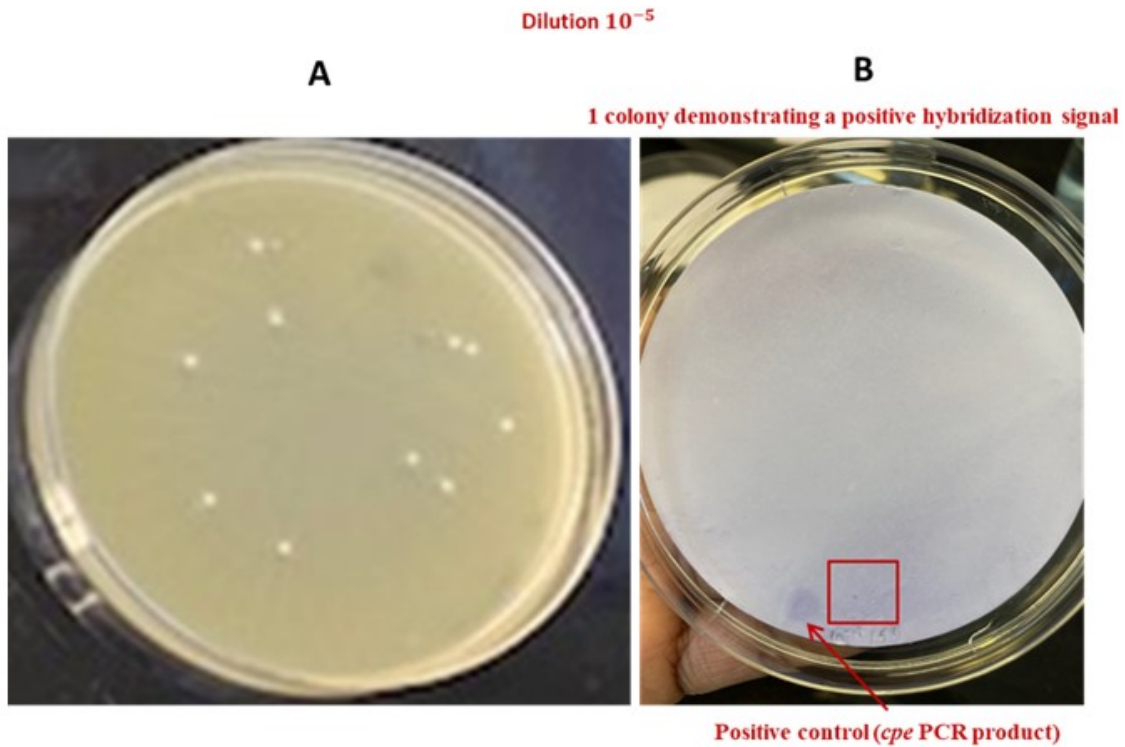


Figure 12 - Application of the DP-CH method using samples of broiler chicken carcass rinsates liquid artificially contaminated with *C. perfringens* AHL311 (Tube 7, Table 2). **A.** Bacterial growth on a TSC agar plates obtained from the analysis of tube 7. **B.** Positive hybridization signals from colonies printed from the corresponding TSC agar plate (see in A) and from the positive control (*cpe* PCR product). Red squares are showing colonies demonstrating positive hybridization signal.

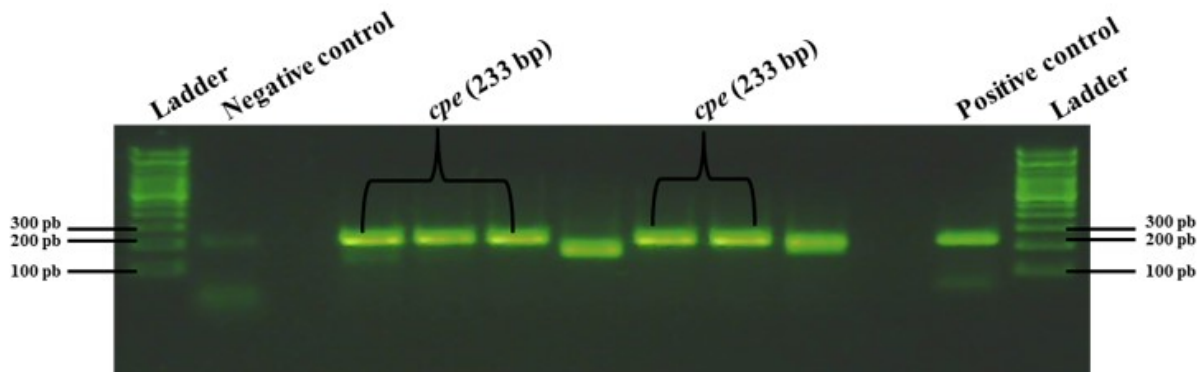


Figure 13 - PCR analysis of the presumed *C. perfringens* colonies subcultured on sheep blood agar plates after recovery from TSC agar plates following the detection of corresponding positive hybridization signals on nylon membranes. Fragments of 233 bp correspond to *C. perfringens* enterotoxin-encoding gene, *cpe* (Tube 7, Table 2).

2.5 Discussion

Enterotoxigenic *C. perfringens* remains one of the three zoonotic bacterial pathogens most frequently incriminated in foodborne disease outbreaks in many industrialized countries, along with *Salmonella* and *Campylobacter* (2). Many elements support the fact that enterotoxigenic *C. perfringens* could have a greater contribution to the burden of foodborne illnesses worldwide. This pathogen is widely distributed in a diversity of environments including soils and the digestive tract of all warm-blooded animals and humans. The major challenges associated with the isolation of the enterotoxigenic subpopulation of this bacterial species are mainly due to the absence of specific phenotypic attributes enabling its rapid recovery and identification, and also to the relatively short duration of the gastrointestinal disease it causes (99, 184). Foodstuffs of animal origin have long been reported as the main reservoir contributing to human exposure to foodborne *C. perfringens*. However, the epidemiology of this pathogen still remains poorly described due to the difficulty of recovering enterotoxigenic strains, which represent only a small fraction of the total *C. perfringens* population, a major obstacle to link these reservoirs and routes of transmission to human disease cases (99, 187, 191). A previous study conducted by our group revealed that broiler chicken meat could represent an important source of enterotoxigenic *C. perfringens* based on the prevalence of *cpe*-positive broiler chicken carcasses identified at the end of the slaughter process (18). As the isolation and molecular characterization of the *C. perfringens* strains harboring this *cpe* gene detected on these broiler chicken carcasses would help better define poultry as a reservoir of this foodborne microorganism, the aim of the current work was to develop an isolation protocol allowing for the specific recovery of enterotoxigenic *C. perfringens* strains from carcass rinsates which were found to be *cpe* positive.

Some authors aiming to describe the role of poultry meat as a reservoir of this zoonotic pathogen may have underestimated its prevalence when not using a PCR-based screening step on pre-enriched meat samples and by investigating the presence of *cpe* in a limited number of selected colonies grown on agar plates (13, 105, 114, 188). The HGMF-CH approach consists of filtering samples before printing the grown colonies on a nylon membrane that will be submitted to hybridization of the bacterial denaturated DNA with a probe specifically designed

as a complementary DNA sequence. Colony hybridization was first described nearly 50 years ago and was shown at that time to facilitate the recovery of microorganisms bearing specific DNA or gene fragments (192, 193). Some researchers used this approach for the detection of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* (VTEC) and *Campylobacter jejuni* (161, 163, 164). Heikinheimo et al. were the first to apply colony hybridization to a hydrophobic grid membrane filtration approach to isolate enterotoxigenic *C. perfringens*, and thus to better document the role of humans in the carriage and transmission of this zoonotic pathogen (17, 102). As reported by this research group, the 333 bp DNA probe synthesized to detect a fragment of the highly conserved *C. perfringens cpe* gene in the current study, revealed to be 100% sensitive when tested on both pure bacterial DNA and cultures of the *C. perfringens* control strains used (17). The sensitivity of the labeled probe was further confirmed with the assay performed on sample tube 4 from which every single colony grown on the hydrophobic grid laid on TSC agar plates was attributed a positive hybridization signal, thereby also confirming the sterility of the medium used. This test involving sample tube 4 resulted in the growth of a slightly lower number of 980 presumptive *C. perfringens* colonies compared to the expected 1250 CFU, according to the contamination level used. This discrepancy highlights a loss that could be attributed to various factors related to the methodology such as a certain permeability of the hydrophobic grids which was subsequently linked to the withdrawal of the product from the market by the manufacturer.

In the present study, sample tubes 1 to 3 were used to validate both the dilution-filtration protocol and the sensitivity of the HGMF-CH approach, when applied to broiler chicken carcass rinsate samples. For both sample tubes 1 and 3, the bacterial suspension was filtered through 20 hydrophobic grids, therefore establishing the detection limit at 3.2×10^{-4} of *cpe*-positive *C. perfringens*, which nearly corresponded to the ratio between both generic and enterotoxigenic *C. perfringens* populations used for this tube (1/38 000). As five positive hybridization signals could be observed on the 20 membranes printed from the analysis of this sample tube, we could then estimate the limit to detect 1 *cpe*-positive colony to be as low as 1.9×10^{-5} , approximating the value reported by Heikinheimo et al (17). However, the low number of 998 grown colonies observed on the TSC agars plated from this sample tube again probably

reflects a suboptimal impermeability of the filtration grids, potentially jeopardizing the recovery of the enterotoxigenic *C. perfringens* colonies if this ratio would have been maintained during filtration. When considering the contamination levels used for *C. perfringens* AHL311, the results obtained in the current study highlight the suitability and effectiveness of the dilution-filtration protocol to be applied to field samples corresponding to those used for the isolation of *cpe*-positive *C. perfringens*. Indeed, the detection limit of a molecular-based approach such as conventional PCR is recognized to vary between 10^2 and 10^4 copies of genes, corresponding to the contamination levels used for sample tube 4 (194). When investigating the usefulness of the same dilution-filtration protocol on field samples contaminated with lower levels of enterotoxigenic *C. perfringens* and that would correspond to the lower detection range for a conventional PCR detection approach, the assay performed with sample tube 2 was associated with 4 positive hybridization signals, again establishing the actual detection limit around 2×10^5 , similar to the limit identified with sample tube 4, and confirming the potential of the approach proposed for the recovery of *cpe*-positive *C. perfringens* from less contaminated broiler chicken carcass samples that would be submitted to a pre-enrichment step beforehand. These observations show that this approach is effective in detecting enterotoxigenic *C. perfringens* for which the ratio with generic strains of this same bacterial species is between 1.9 and 2×10^5 , corresponding to 1 CFU/mL after enrichment of the starting sample.

Similar concentrations of the control strain *C. perfringens* AHL311 were used for the contamination of tubes 5 and 6 in order to establish the applicability of a hybridization approach to a direct plating of broiler chicken carcass rinsate samples following the discontinuation of the hydrophobic filtration grids. The dilution-plating protocol tested was establishing the theoretical detection limit at 1 and 3.5 *cpe*-positive colonies for sample tubes 5 and 6, respectively, according to the contamination levels used. The results obtained from the direct plating of a total of 30 TSC agar plates stressed the importance of considering the screening of a considerable number of nylon membranes printed out from these agar plates as only a single positive hybridization signal could be generated from the analysis of sample tube 6. On the other hand, the approach considering dilution steps and the plating of a restricted volume of a specific bacterial suspension brings into play a random aspect of the procedure that could be

associated with increases in the sensitivity of the approach, which was twofold for the analysis of sample tube 6 in the current study. Results from a previous study conducted by our group showed the importance of using a primary discriminatory PCR step to confirm the *cpe* status of a sample as the presence of enterotoxigenic *C. perfringens* on broiler chicken carcasses can be highly variable along the slaughter line (18). However, when positivity rates reach more than 25% as it was also documented during this previous study, the large number of nylon membranes and hybridization assays can be a limiting factor when considering the financial and time aspect of the isolation procedure. Sample tube 7 was used to validate if a direct plating approach limiting the number of agar plates to be spread, and therefore, the number of nylon membranes to be submitted to hybridization could be used for the recovery of *cpe*-positive *C. perfringens* from broiler chicken carcass rinsates. The dilution-plating protocol was designed according to a contamination level by *C. perfringens* AHL 311 established at 10^5 , with a detection limit approaching 1 *cpe*-positive *C. perfringens* for the 10^{-4} dilution, and being established at 8, 85 and 850 *cpe*-positive colonies for the 10^{-3} , 10^{-2} and 10^{-1} dilutions, respectively. On any of nylon membranes printed out from TSC agar plates, a higher number of *cpe*-positive colonies positive hybridization signals were identified, this number corresponding to 2, 27 and 208 *cpe*-positive colonies on agar plates corresponding to these 10^{-3} , 10^{-2} and 10^{-1} dilutions, respectively. The results show that the direct plating approach combined with colony hybridization proved to be sensitive for the detection of enterotoxigenic strains of *C. perfringens*, with a theoretical detection limit varying between 1 and 3.5 *cpe*-positive *C. perfringens* colonies/mL. This protocol has however one major drawback. As it can represent a clear benefit when the ratio of enterotoxigenic *C. perfringens* to generic *C. perfringens* approximates 1, leaving almost equal space for the growth of both subpopulations, it can be more challenging when *cpe*-positive strains are less abundant and must be recovered from a bacterial mat covering the agar plate, justifying additional dilutions and a further reducing this ratio. Based on the results obtained, we can hypothesize that a ratio of enterotoxigenic *C. perfringens* to generic *C. perfringens* of 1:10 or even 1:100 would significantly decrease the chances of recovering *cpe*-positive strains from a complex sample such as broiler chicken carcass rinsates. In these circumstances, the plating of additional agars and the hybridization

performed on more nylon membranes could assist. Different protocols were validated, including various dilution, filtration and plating approaches. Results confirm that colony hybridization allows for the rapid identification of *cpe*-positive *C. perfringens* in a complex sample, as previously reported (17). Different ratios of enterotoxigenic *C. perfringens* to generic *C. perfringens* were tested and suggest that the application of a pre-enrichment step allowing the *cpe*-positive *C. perfringens* population to reach the concentrations corresponding to the lower reference of the range of values established for the detection limit of a conventional PCR approach should be part of a more global approach to recover enterotoxigenic *C. perfringens* from broiler chicken carcasses.

Conclusion

This study described the use of a hydrophobic grid filtration, or a direct-plating approach combined with colony hybridization for the detection of enterotoxigenic *C. perfringens* in broiler chicken carcass rinsate samples. The results obtained confirmed that this approach makes it possible to identify *C. perfringens* positive for the *cpe* gene from broiler chicken carcass rinsate samples. We believe this work will help improve the study of the epidemiology of this zoonotic pathogen. The evaluation of a shortened protocol limiting the number of agar plates and hybridization assays would be worth considering once future studies will have documented the levels of contamination of broiler chicken carcasses by both *cpe*-positive and generic *C. perfringens*.

Author contributions

KMR: Laboratory work, result analysis and interpretation, manuscript writing; AT: project co-supervision and manuscript revision; JMF: project co-supervision and manuscript revision; WPT: project co-supervision and manuscript revision; MLG: Project design and supervision, results analysis and interpretation, manuscript writing and revision. All authors have read and accepted this manuscript.

Declaration of interest

The authors declare no competing interests.

Acknowledgements

The authors would like to thank Nicole Trottier and Alexandra Laventure for their lab assistance.

Financial support statement

This work was supported by funding from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) – Discovery Grants Program – GR3miP contest.

Chapitre 3: Discussion générale

Mise en contexte

Clostridium perfringens a été initialement identifié comme cause de toxi-infection alimentaire impliquant de la viande de poulet dans les années 1940 (1). De nombreux cas de toxi-infection alimentaire attribuables à *C. perfringens* entérotoxigène sont désormais signalés chaque année dans le monde, et la toxi-infection alimentaire à *C. perfringens* se classe parmi les maladies d'origine alimentaire les plus courantes dans les pays industrialisés (84). Bien que des recherches récentes aient ajouté des clarifications sur l'écologie de cette espèce bactérienne, il reste encore beaucoup à faire pour mieux décrire l'épidémiologie de cet agent pathogène, incluant ses réservoirs et voies de transmission jusqu'à l'humain. La présente étude s'intéresse à l'un de ces réservoirs, soit les carcasses de poulets de chair. Puisque seul l'isolement de *C. perfringens* entérotoxigène à partir de liquides de rinçage de ces carcasses de poulet de chair permettra une caractérisation des souches, ce projet de maîtrise s'intéresse à la mise au point d'une approche visant à faciliter l'isolement de *C. perfringens* entérotoxigène à partir d'échantillons complexes comme les liquides de rinçage de carcasses de poulets de chair.

À notre connaissance, le présent projet est la première étude qui vise à mettre au point une méthode d'isolement faisant appel à une combinaison de filtration sur grilles hydrophobes ou d'ensemencement direct sur pétris et d'hybridation sur colonie afin de permettre la détection *C. perfringens* entérotoxigène à partir d'échantillons de liquides de rinçage de carcasses de poulets de chair contaminés par ce pathogène. Comme premier objectif, nous avons validé la capacité d'une sonde marquée à la digoxigénine à détecter le gène *cpe* codant pour l'entérotoxine de *C. perfringens* entérotoxigène à partir d'ADN extrait et de souches contrôle de *C. perfringens* de notre laboratoire. Pour le second objectif, nous avons validé l'utilisation d'une approche d'isolement combinée à l'hybridation sur colonie pour détecter *C. perfringens* entérotoxigène à partir d'échantillons de liquides de rinçage de carcasses de

poulets de chair négatifs pour la présence du gène *cpe* et artificiellement contaminés avec *C. perfringens* entérotoxigène.

Il y a lieu de souligner que pour la réalisation du second objectif, les échantillons provenaient d'une étude précédente effectuée par notre groupe de recherche (195). En résumé, durant l'année 2017, la Chaire de recherche en salubrité des viandes avait réalisé une étude portant, entre autres, sur la positivité de carcasses de poulets de chair au gène *cpe* codant pour l'entérotoxine de *C. perfringens* entérotoxigène à cinq grandes étapes critiques du processus d'abattage dans deux abattoirs de volailles situés dans la province du Québec. Brièvement, 379 carcasses de poulets de chair ont été échantillonnées via un rinçage de la carcasse avec de l'eau peptonée tamponnée, sur une période allant de février et juillet 2017. Les échantillons ont été soumis à un pré-enrichissement en bouillon sélectif, puis à une réaction de polymérase en chaîne (PCR) en utilisant des amorces spécifiques au gène *cpe*, tel que décrit par Gaucher et al. (2018). Les échantillons positifs au gène *cpe* ont été conservés à -80°C pour des analyses futures qui viseront à isoler *C. perfringens* entérotoxigène, tout comme quelques échantillons négatifs pour la présence de *cpe* qui ont été conservés à de fins de la présente étude.

Dans cette étude, une mise au point d'une méthode d'isolement combinée à l'hybridation sur colonie pour la détection de *C. perfringens* positif pour le gène *cpe* codant pour l'entérotoxine chez le poulet de chair s'est appuyée sur plusieurs facteurs, dont la synthèse d'une sonde d'ADN marquée à la digoxigénine, l'hybridation de cette sonde marquée sur l'ADN génomique et des colonies lysées de souches contrôles de *C. perfringens*, ainsi que l'évaluation de l'approche par filtration sur grille ou étalement direct sur pétris combinée à l'hybridation. De plus, des tampons, faits maison, ont été développés pour faciliter le processus.

Synthèse de la sonde d'ADN marquée à la digoxigénine (DIG)

Dans la présente étude, nous avons choisi de marquer la sonde d'ADN avec la digoxigénine, qui est un haptène stéroïde dérivé de plantes du genre *Digitalis* (*D. lanata*, et la digitale pourpre *D. purpurea*), lequel est largement utilisé comme marqueur d'acide nucléique, soutenant à la fois la détection chromogénique et la chimiluminescence (196). Suite à cela, nous

avons utilisé la méthode PCR pour synthétiser la sonde d'ADN marquée car la PCR a été reconnue comme une approche efficace pour la synthèse de sondes en raison de sa capacité à utiliser des quantités minimales de matrice (197). De plus, le produit d'amplification marqué peut être utilisé comme sonde sans nécessiter de purification supplémentaire. La PCR permet également une flexibilité considérable dans la sélection des séquences de sonde en utilisant des amorces appropriées. Il est à noter que la préparation des sondes d'ADN est relativement efficace et rapide (197, 198). En synthétisant et en marquant la sonde d'ADN avec le DIG, nous avons pu obtenir l'amplification exclusive d'un segment d'ADN interne spécifique de 333 pb du gène *cpe*. Les résultats obtenus dans cette étude correspondent étroitement à ceux présentés par d'autres auteurs dans leurs études sur l'identification des souches de *C. perfringens* possédant le gène *cpe*. En effet, Heikinheimo et al., en 2004 et 2006, ont mené des recherches impliquant la création d'une sonde ADN marquée à la digoxigénine afin de détecter la présence de souches de *C. perfringens* portant le gène *cpe* dans les matières fécales humaines (17, 102). Schlapp et ses collaborateurs, en 1995, ont effectué une étude portant sur la synthèse et l'évaluation d'une sonde génique non radioactive pour la détection de la toxine alpha de *C. perfringens* à partir des isolats de *C. perfringens* provenant de l'environnement (199) alors que Luis et ses collaborateurs, en 1995, ont développé la sonde marquée pour détecter et dénombrer *C. perfringens* entérotoxinogènes dans le bœuf cru (200). Van Damme-Jongsten et ses collaborateurs, en 1990, ont synthétisé des sondes d'ADN pour la détection de souches entérotoxinogènes de *C. perfringens* isolées à partir d'épidémies d'intoxication alimentaire (201). D'autres microorganismes pathogènes ont également pu être détectés grâce au développement de sondes d'ADN synthétiques, comme rapporté par Datta et ses collaborateurs en 1987, ainsi que Yan et ses collaborateurs, en 1996, pour la détection de *Listeria monocytogenes* (161, 162). Todd et collaborateurs, en 1999, ainsi que Kabore et ses collaborateurs en 2009, rapportent également la détection d'*Escherichia coli* vérotoxinogène avec la même méthode (163). Finalement, les travaux de Ng et ses collaborateurs, en 1997, ont permis la détection et la confirmation spécifique de *Campylobacter jejuni* toujours en utilisant des sondes d'ADN synthétique (164).

Hybridation de la sonde d'ADN marquée sur ADN génomique et sur colonies lysées de souches de *C. perfringens* entérotoxigène

Après la synthèse de la sonde d'ADN marquée à la digoxigénine, nous avons procédé à l'hybridation de la sonde marquée sur ADN génomique bactérien et deux souches bactériennes pures lysées de souches contrôles de *C. perfringens* du laboratoire afin de valider la capacité d'une sonde d'ADN marquée à la digoxigénine à détecter le gène *cpe* codant pour une entérotoxine de *C. perfringens*. Sur ce, nous nous sommes référés au manuel de Roche, 2008, ainsi que des travaux de Heikinheimo et ses collaborateurs, pour réaliser les étapes d'hybridation (17, 190). Nous avons observé des signaux d'hybridation positifs à partir d'ADN et de souches de *C. perfringens* porteur du gène *cpe* codant pour l'entérotoxine. La sonde d'ADN marquée à la digoxigénine a permis de détecter la souche de référence de *C. perfringens* entérotoxigène. Les résultats de ce premier objectif montrent que la sonde d'ADN synthétisée s'avère être sensible pour la détection de la présence du gène *cpe* codant pour l'entérotoxine de *C. perfringens* par l'approche d'hybridation. Ces mêmes résultats démontrent également la spécificité de la sonde synthétisée compte tenu que celle-ci a été en mesure d'être hybridée spécifiquement à l'ADN des colonies lysées de *C. perfringens* positives pour la présence du gène *cpe*, alors qu'aucun signal d'hybridation n'a pu être mis en évidence à partir de l'ADN de colonies de *C. perfringens* générique se retrouvant également dans les échantillons de liquides de rinçage de carcasses utilisés. Ces résultats obtenus sont comparables à ceux observés dans une étude menée par Heikinheimo et ses collaborateurs, en 2004, lors d'une étude décrivant la méthode de filtration et hybridation pour dénombrier et isoler les spores de *C. perfringens* qui portent le gène *cpe* à partir d'échantillons fécaux (102). Il est intéressant de souligner que ces résultats sont similaires à ceux rapportés par T. Schlapp et ses collaborateurs, en 1995, sur la synthèse et l'évaluation d'une sonde n'émettant pas de radioactivité, spécifiquement pour le gène *cpa* codant pour la toxine alpha dans 296 souches de *C. perfringens* (199). De plus, en 1990, Van Damme-Jongsten et ses collaborateurs, ainsi que Baez et ses collaborateurs, en 1995, ont développé des sondes d'ADN pour identifier les souches entérotoxigènes de *C. perfringens* (200). En revanche, les résultats que nous avons obtenus correspondent aux résultats d'études antérieures sur la détection et l'isolement de divers micro-

organismes dans divers échantillons. Cela englobe *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* vérotoxigène et *Campylobacter jejuni* (161-164).

Nos résultats soutiennent l'affirmation selon laquelle l'utilisation de la technique PCR pour produire des sondes d'ADN marquées à la digoxigénine est une méthode permettant de générer des sondes hautement spécifiques et efficacement marquées pour l'hybridation (202). Pour générer la sonde, la PCR est réalisée en utilisant les amorces et les paramètres de thermocyclage appropriés. Cependant, le mélange de dNTP a été ajusté pour contenir une quantité réduite de dTTP en raison de l'introduction de DIG-dUTP marqué dans la réaction (202).

Il est important de souligner que dans la présente étude, nous avons fait le constat que le bruit de fond était très prononcé sur les membranes de Nylon lors des premières hybridations. Afin de résoudre ce problème, nous avons apporté certains ajustements au processus d'hybridation, en nous concentrant spécifiquement sur différents paramètres. Premièrement, la température pour les étapes de pré-hybridation et d'hybridation a été modifiée et ajustée à 42 °C. Il a été bien documenté que la température joue un rôle crucial dans le succès de l'hybridation, car elle a un impact direct sur la spécificité de l'ensemble de la procédure. L'augmentation de la température réduisait l'arrière-plan et la liaison non spécifique (203). Par conséquent, il existe une équation (ci-dessous) qui peut être utilisée pour déterminer la température optimale afin d'obtenir des résultats précis d'hybridation (190).

Température d'hybridation = $49,82 + 0,41[\%G + C] - (600/L)$ [où % G+C = teneur en GC de la sonde marquée, L = longueur (pb) de l'hybride sonde-cible] (190).

Deuxièmement, le prétraitement de la solution de pré-hybridation a été modifié car il a été rapporté que le but de la solution de préhybridation était d'équilibrer l'échantillon avec la solution d'hybridation avant l'ajout de la sonde et de permettre aux macromolécules anioniques de bloquer les sites d'interaction potentielle non spécifique de la sonde, minimisant ainsi la liaison de fond aux membranes d'hybridation (190). Pour ce faire, la solution de préhybridation a été soumise à un prétraitement à une température de 42°C. De plus, le tampon de blocage et l'ADN de sperme de saumon ont été ajoutés dans cette solution de pré-hybridation. L'ADN de

sperme de saumon aide en outre à réduire la liaison non spécifique pendant le processus d'hybridation. Il sert également à protéger les séquences d'acides nucléiques non homologues de la sonde et réduit la probabilité d'interactions électrostatiques cellulaires (204). Cela permet donc un faible bruit de fond sur les membranes lors l'hybridation, comme l'ont démontré Kabore et ses collaborateurs, en 2009, dans une étude impliquant le développement d'une méthode d'hybridation combinée à une filtration sur grille hydrophobe pour la détection d'isolats d'*Escherichia coli* porteurs de gènes de virulence et de résistance aux antimicrobiens dans le microbiote intestinal des porcs (165). Troisièmement, nous avons apporté des ajustements à la concentration de la sonde d'ADN utilisée lors de l'hybridation. Cette mesure a été prise à la lumière de résultats de diverses études, qui indiquaient qu'une concentration excessive de sonde était responsable de la présence d'un bruit de fond important sur la membrane. Il a été rapporté qu'une concentration de 25 ng de sonde d'ADN dénaturé/mL a donné des résultats les plus favorables (17, 102, 190). En conséquence, nous avons pu obtenir des résultats favorables avec un bruit de fond réduit sur les membranes (Figure 14).

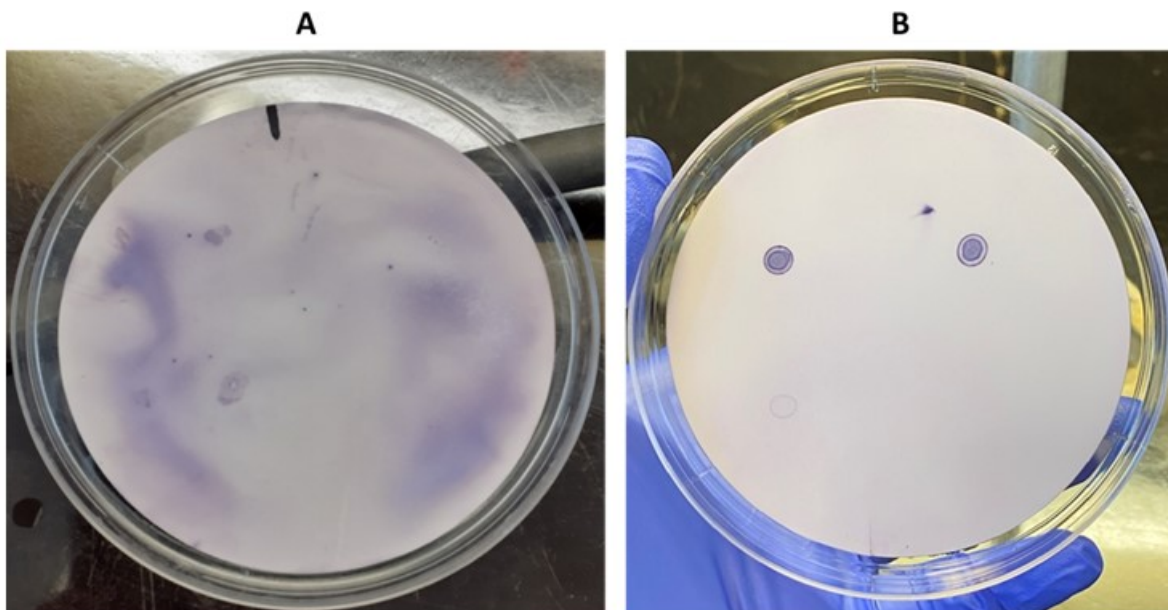


Figure 14 – Évaluation des paramètres ajustés d'hybridation. **A.** Membrane de Nylon avec bruit de fond avant l'ajustement de paramètres d'hybridation. **B.** Membrane de Nylon avec moins de bruit de fond après l'ajustement de paramètres d'hybridation.

Évaluation de l'approche par filtration sur grille hydrophobe combiné à l'hybridation sur colonie pour la détection de *C. perfringens* entérotoxigène

Au cours de la présente étude, l'utilisation d'une approche d'isolement par filtration sur grille hydrophobe combinée à l'hybridation sur colonie pour détecter *C. perfringens* entérotoxigène à partir d'échantillons de liquides de rinçage de carcasses de poulets de chair négatifs pour la présence du gène *cpe* et artificiellement contaminés avec *C. perfringens* entérotoxigène a également été étudiée afin de valider l'efficacité de cette approche pour l'identification et la récupération de ces souches bactériennes. Nous avons observé des signaux d'hybridation positifs à partir d'échantillons de liquide de rinçage de carcasses de poulet de chair artificiellement contaminés. Ces résultats obtenus montrent que la sonde d'ADN marquée à la digoxigénine est un outil de diagnostic sensible tout en étant spécifique à la détection de *C. perfringens* porteur du gène *cpe* dans des échantillons de liquide de rinçage de poulets de chair par rapport à la méthode de culture bactérienne classique. En conséquence, cette approche constitue un outil prometteur pour l'isolement des souches entérotoxigènes de *C. perfringens* à partir de liquides de rinçage de carcasses de poulets récupérés à l'abattoir. Les résultats de notre étude sont similaires à ceux rapportés par certaines recherches utilisant l'approche par filtration sur grille combinée à l'hybridation sur colonie pour isoler *C. perfringens* entérotoxigène dans différents échantillons. C'est le cas de Tschirdewahn et ses collaborateurs qui ont rapporté la présence de souches entérotoxigènes de *C. perfringens* dans les fèces de chevaux, de bovins, de volailles et de porcs (108). De plus, Van Damme-Jongsten et collaborateurs, en 1990, ainsi que Daube et collaborateurs en 1996 ont signalé la présence du gène *cpe* de *C. perfringens* à partir des souches de *C. perfringens* isolées des aliments et de matières fécales, et cela, à partir des isolats de *C. perfringens* provenant de diverses espèces animales, d'humains et d'aliments, respectivement (201, 205). Aussi, Luis et ses collaborateurs, en 1995, ont détecté et dénombré la présence de *C. perfringens* entérotoxigènes dans le bœuf cru (200).

Les résultats obtenus dans cette étude sont également similaires à ceux observés dans d'autres enquêtes utilisant cette approche d'isolement pour la détection d'autres microorganismes tels que rapporté par Datta et ses collaborateurs, en 1987, pour l'isolement de

Listeria monocytogenes à partir d'échantillons alimentaires, cliniques et environnementaux (161). Il y a lieu de citer les travaux de Yan et ses collaborateurs, en 1996, pour détecter *L. monocytogenes* dans les aliments (162), Todd et ses collaborateurs, en 1999, pour la détection de *Escherichia coli* vérotoxino-gène à partir d'échantillons de bœuf haché et (163). Kabore et ses collaborateurs, en 2009, ont souligné la détection de *Escherichia coli* porteurs de gènes de virulence et de résistance aux antimicrobiens dans la microflore intestinale du porc (165). Également, les résultats de notre étude sont similaires à ceux de Ng et ses collaborateurs, en 1997, pour détecter *Campylobacter jejuni* à partir des isolats environnementaux et cliniques, ainsi qu'à partir des échantillons de lait écrémé enrichi et ceux de rinçage de poulet (164). La nouveauté de la présente étude réside dans l'utilisation d'une approche de filtration sur grille ou d'ensemencement direct associée à l'hybridation pour la détection de *C. perfringens* positif au gène *cpe* dans des échantillons de liquides de rinçage prélevés sur des carcasses de poulet.

Dans la présente étude, l'établissement de la limite de détection a été aussi étudié afin de déterminer le rapport entre le *C. perfringens* entérotoxino-gène et l'ensemble des *C. perfringens* à partir des échantillons de liquides de rinçage de carcasses de poulets de chair négatifs pour le gène *cpe* et artificiellement contaminés avec *C. perfringens* entérotoxino-gène par l'approche de filtration sur grille combinée à l'hybridation sur colonies. Heikinehmo et ses collaborateurs, en 2004, ont rapporté que la limite de détection de la méthode dépendait d'au moins deux facteurs. Tout d'abord, le volume de l'échantillon définit le plus faible niveau de *C. perfringens cpe* positives détecté. Cependant, une limite de détection inférieure serait atteinte en étudiant une plus grande quantité d'échantillons. Ensuite, la limite de détection de la méthode par HGMF-CH dépend du rapport entre les souches de *C. perfringens* positives pour le *cpe* et les souches totales de *C. perfringens* qui se développent sur la grille apposée sur milieu TSC (17). Une étude similaire réalisée par Lin et collaborateurs, en 2003, a rapporté l'absence du gène *cpe* de *C. perfringens* à partir d'isolats des échantillons d'aliments provenant de magasins d'alimentation du détail. Ceci peut être expliqué du fait que la littérature rapporte que moins de 5 % de toutes les souches de *C. perfringens* sont porteuses du gène *cpe* codant pour l'entérotoxine. Dans la présente étude, nous avons procédé par diverses approches dont le test de ratio, de dilution et de filtration à partir des échantillons de liquides de rinçage de carcasses

de poulets de chair négatifs pour le gène *cpe* qui contenaient initialement 10^5 et 10^6 CFU de *C. perfringens* générique et artificiellement contaminés avec 10^3 , 10^4 , et 10^5 CFU de *C. perfringens* entérotoxigène. Les résultats montrent que cette approche d'isolement combinée à l'hybridation mise au point est efficace pour détecter *C. perfringens* entérotoxigène lorsque le ratio avec les souches génériques de cette même espèce bactérienne est entre 1,9 et 2×10^{-5} , correspondant à 1 CFU/mL après enrichissement de l'échantillon de départ. Ces observations se rapprochent de la limite de détection de 10 CFU/g à partir d'échantillons fécaux d'individus sains bruts, rapportée par Heikinheimo et ses collaborateurs en 2004 (17). Cependant, il faut souligner que nos échantillons ont été initialement enrichis dans du FTG, suivi d'une approche PCR. Il faut ainsi garder en tête que la limite de détection des méthodes moléculaires telles que la PCR traditionnelle varie entre 10^2 et 10^4 copies de gènes (18, 194). Par conséquent, ces observations suggèrent que la méthode de filtration combinée à l'hybridation sur colonie proposée dans la présente étude a le potentiel de récupérer *C. perfringens* entérotoxigène à partir d'échantillons de carcasses de poulet moins contaminés qui auraient été précédemment soumis à une étape de pré-enrichissement. D'autre part, notre limite de détection est similaire à celle de 0.1 CFU/g dans les échantillons de viandes hachées de bœuf inoculées par des souches d'*E. Coli* produisant de la shiga-toxine (163). Également, Ng et ses collaborateurs, en 1997, ont rapporté une limite de détection 10 CFU/mL par volume total des échantillons de rinçage de poulets pour étudier la présence de *Campylobacter jejuni* (164).

À notre connaissance, la présente étude est la première à utiliser la méthode d'isolement par filtration sur grille hydrophobe et hybridation sur colonie à partir d'échantillons de liquides de rinçage de carcasses de poulets de chair. Ainsi, les résultats de notre étude démontrent que cette méthode d'isolement combinée à l'hybridation est sensible et spécifique pour l'identification de *C. perfringens* positif au *cpe* dans un échantillon. Cependant, il convient de noter qu'au cours de notre étude, nous avons observé des faibles croissances bactériennes sur la grille apposée sur milieu TSC après filtration des échantillons, indiquant probablement une imperméabilité des grilles de filtration, ce qui aurait pu potentiellement entraver la récupération des colonies entérotoxigènes de *C. perfringens*. À la lumière de cela, nous avons

mené des évaluations de grilles de filtration hydrophobes. Le résultat de ces évaluations a démontré la perméabilité des grilles de filtration (Figure 15).

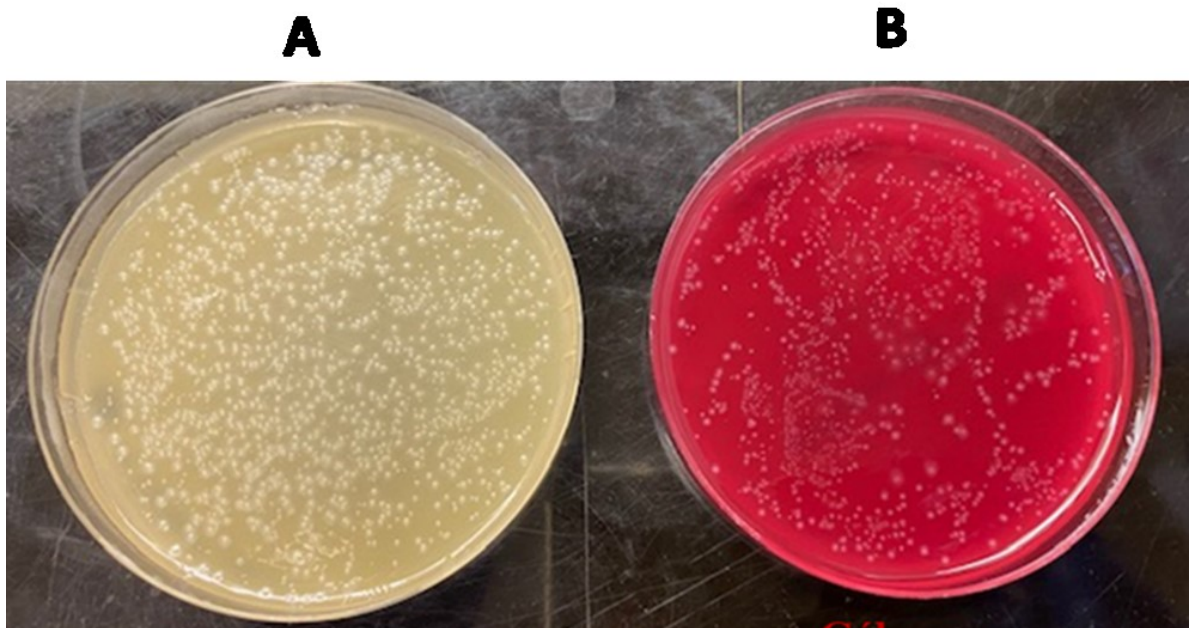


Figure 15 - Évaluation de grilles hydrophobes de filtration. **A.** Dénombrement réalisé sur les filtrats sur gélose TSC. **B.** Dénombrement réalisé sur les filtrats sur gélose au sang.

Évaluation de l'approche par étalement direct sur pétris combinée à l'hybridation sur colonie pour la détection de *C. perfringens* entérotoxigène

Comme mentionné précédemment, nous avons rencontré un défi lié à la question de l'étanchéité des grilles de filtration hydrophobes. De plus, nous avons dû faire face à l'arrêt de production de ces grilles par les fournisseurs. Par conséquent, nous avons procédé avec une méthode alternative combinant l'étalement direct sur pétris et l'hybridation sur colonie. Pour évaluer l'efficacité de cette approche et établir la limite de détection afin de déterminer le rapport entre le *C. perfringens* entérotoxigène et *C. perfringens* par ladite approche, divers protocoles de dilution et d'étalement sur pétris, ainsi que différents ratios ont été testés à partir d'échantillons de liquides de rinçage de carcasses de poulets de chair négatifs pour le gène *cpe* qui contenaient initialement de *C. perfringens* et artificiellement contaminés avec *C. perfringens* entérotoxigène. Fait intéressant, nous avons observé des signaux positifs d'hybridation à

partir d'échantillons de rinçage de carcasse de poulet artificiellement contaminés. Ces résultats démontrent également l'efficacité potentielle de cette approche comme outil pour isoler les souches entérotoxigènes de *C. perfringens*, car cette technique nous a permis de détecter des souches de *C. perfringens* porteuses du gène responsable de la production d'entérotoxine dans les échantillons de rinçage de carcasses de poulet de chair. À notre connaissance, aucune étude menée jusqu'à présent n'a utilisé cette méthode particulière d'isolement dans le but d'identifier des micro-organismes pathogènes dans divers échantillons. Les résultats de la limite de détection par l'approche d'étalement direct sur pétris combinée à l'hybridation sur colonies varient entre 1 et 3,5 colonies de *C. perfringens* positives pour *cpe*/mL, ce qui se rapproche des limites de détection rapportées par Heikinheimo et ses collaborateurs en 2004, sans oublier Todd et ses collaborateurs en 1999, ainsi que Ng et ses collaborateurs en 1997 (17, 163, 164).

Les résultats obtenus dans la présente étude montrent que l'approche par étalement direct sur pétris combinée à l'hybridation est également sensible et spécifique pour isoler *C. perfringens* positif pour la présence du gène codant pour l'entérotoxine à partir des échantillons de liquides de rinçage de carcasse de poulet de chair. Cependant, cette approche d'isolement faisant appel aux dilutions et ensemencements exige un grand nombre de géloses, ainsi que des membranes de Nylon pour un volume restreint d'une suspension bactérienne spécifique, ce qui met en jeu un aspect de la procédure qui pourrait être associé à des augmentations de la sensibilité de l'approche.

Mise au point de recettes de tampons préparés en laboratoire et validation de leur efficacité

En plus d'utiliser des tampons commerciaux pour l'hybridation, des tampons ont été préparés dans notre laboratoire comme décrit par Viterbo et ses collaborateurs, en 2018 (206). Pour ce faire, nous avons procédé à la préparation de cinq tampons distincts utilisés à différentes étapes du processus d'hybridation, y compris les tampons d'hybridation, de lavage de stringence, de blocage, de lavage au Tween 20 et de détection. Ensuite, nous avons effectué des hybridations pour évaluer l'efficacité des tampons préparés. Cependant, après plusieurs tentatives, nous n'avons observé qu'un signal provenant du produit PCR de la souche de

référence. Cela peut être attribué aux défis physico-chimiques que nous avons rencontrés lors de la préparation du tampon, car il est connu que le succès de techniques d'hybridation spécifiques dépend fortement de la température et de la concentration en sel. De plus, le taux d'hybridation est influencé par la concentration et la spécificité de la sonde d'ADN marquée, ainsi que par la rigueur des lavages post-hybridation (202). Au meilleur de nos connaissances, il n'existe pas actuellement assez de recherche sur l'efficacité des tampons faits en laboratoire utilisés pendant les procédures d'hybridation. Cependant, les résultats obtenus dans notre étude actuelle divergent de ceux rapportés dans une étude récente qui a décrit une nouvelle technique utilisant des solutions de laboratoire standard pour l'hybridation et l'identification d'acides nucléiques avec des sondes d'ADN marquées à la digoxigénine (206). Dans cette étude, un signal provenant de l'ADN génomique de la souche de levure a été détecté avec succès, ce qui indique la haute spécificité de leurs tampons maison (206). Ainsi, nous avons procédé à la vérification de l'efficacité des tampons d'hybridation et de détection faits dans notre laboratoire. Pour cela, deux hybridations avaient été réalisées lesquelles se différenciaient par l'utilisation d'un tampon d'hybridation différent (Tableau 4). Les résultats de ces deux hybridations ont été très intéressants. Plus précisément, nous avons observé la présence des signaux d'hybridation pour l'ADN de la souche de *C. perfringens* entérotoxigène positive au gène *cpe*. Ces données confirment que les tampons d'hybridation et de détection faits au laboratoire sont entièrement fonctionnels, produisant des résultats comparables à ceux obtenus des tampons commerciaux. De plus, nos conclusions concordent avec les observations faites par Viterbo et ses collègues (206). Cependant, nous avons constaté que le bruit de fond était trop prononcé. En effet, lors de l'hybridation avec le tampon d'hybridation fait au laboratoire, nous constatons que le bruit de fond était plus important que celui obtenu lors de l'hybridation avec le tampon de détection fait au laboratoire. Également, nous avons aussi remarqué que les signaux d'hybridation obtenus se perdaient dans le bruit de fond créé lors de l'hybridation. Ce qui nous permet d'affirmer que les tampons de lavage (stringence) et de lavage (Tween 20) commerciaux, ne sont pas suffisamment efficaces lorsqu'ils sont combinés au tampon d'hybridation préparé au laboratoire.

Tableau 4 - Évaluation de l'efficacité des tampons d'hybridation et de détection faits au laboratoire par hybridation

	Hybridation 1	Hybridation 2
Tampons utilisés	<ul style="list-style-type: none"> -Tampon d'hybridation commercial -Tampon de lavage (stringence) commercial -Tampon de blocage commercial -Tampon de lavage (Tween 20) commercial -Tampon de détection fait au laboratoire 	<ul style="list-style-type: none"> -Tampon d'hybridation fait au laboratoire -Tampon de lavage (stringence) commercial -Tampon de blocage commercial -Tampon de lavage (Tween 20) commercial -Tampon de détection fait au laboratoire
Résultats	Signaux d'hybridation détectés à partir de l'ADN de la souche contrôle	Signaux d'hybridation détectés à partir de l'ADN de la souche contrôle/Bruit de fond

Après avoir validé les tampons d'hybridation et de détection réalisés au laboratoire, nous avons procédé à la validation du tampon de blocage et des tampons de lavage (stringence et Tween 20) (Tableau 5). Pour ce faire, une hybridation dans laquelle nous connaissions l'efficacité des tampons utilisés, a été réalisée. Les résultats de ces deux hybridations n'ont malheureusement pas été concluants car seul le signal d'hybridation de la solution de contrôle a été obtenu. En effet, lors de l'utilisation du tampon de blocage préparé au laboratoire, nous avons constaté que le bruit de fond était très prononcé. De plus, concernant l'hybridation avec les tampons de lavage (stringence/Tween 20) faits au laboratoire, nous observons que le bruit

de fond est vraiment très faible. Cela peut nous laisser penser que les tampons de lavages (stringence/Tween 20) préparés au laboratoire sont puissants, car ils nettoient trop la membrane. Ce qui peut également expliquer l'absence de signal d'hybridation. Le tampon de blocage, le tampon de lavage (stringence) et le tampon de lavage (Tween 20), ne permettent donc pas d'obtenir des résultats comparables à ceux obtenus lors des hybridations réalisées avec les tampons commerciaux. Contrairement, Viterbo et collaborateurs, en 2018, ont obtenu une détection plus sensible et plus rapide que ce qui avait été obtenu avec des solutions commerciales dédiées à tous les tampons préparés au laboratoire (206). La littérature rapporte que la sensibilité et l'efficacité de l'hybridation exigent le respect de toutes les procédures établies pour des tests d'hybridation réussis. L'ensemble des tampons d'hybridation est utilisé pour contrôler l'environnement chimique de la sonde et des tissus pendant ladite réaction. Il comprend un tampon pour contrôler le pH, du sel pour contrôler la force ionique et, dans la plupart des cas, du formamide pour abaisser la température de fusion des acides nucléiques (204). Ainsi, le respect scrupuleux de ces directives est requis pour des résultats reproductibles. Également, le temps et la température de l'étape d'hybridation sont d'autres variables déterminés empiriquement en fonction de la nature de la sonde et de la cible. La température est déterminée par une sonde particulière et l'ensemble de tampons d'hybridation bien que ceux-ci soient généralement ajustés de manière à ce qu'une température commune soit utilisée pour tous les essais. Le temps peut être important dans un contexte clinique et la cinétique dépend surtout de la concentration de la sonde. Également, la rigueur ou spécificité de la réaction d'hybridation est déterminée par les conditions d'hybridation et de lavage post-hybridation. La rigueur fait référence au degré d'inadéquation électrostatique entre base-paire qui sera toléré dans l'hybride final des séquences sonde-cible. Les lavages post-hybridation éliminent les molécules de sonde qui sont non spécifiquement liées. Réduire la concentration de sel dans le lavage et augmenter la température accroît la rigueur (204).

Tableau 5 - Évaluation de l'efficacité des tampons de lavage et de blocage faits au laboratoire par hybridation

	Hybridation 1	Hybridation 2
Tampons utilisés	<ul style="list-style-type: none"> -Tampon d'hybridation préparé au laboratoire -Tampons de lavage (stringence) commerciaux - Tampon de blocage préparé au laboratoire -Tampon de lavage (Tween 20) commerciaux -Tampon de détection préparé au laboratoire 	<ul style="list-style-type: none"> -Tampon d'hybridation préparé au laboratoire -Tampon de lavage (stringence) préparé au laboratoire-Tampon de blocage commercial -Tampon de lavage (Tween 20) maison -Tampon de détection préparé au laboratoire
Résultats	Signal d'hybridation de la solution de contrôle de <i>C. perfringens</i>	Signal d'hybridation de la solution de contrôle de <i>C. perfringens</i>

Il est intéressant de souligner que l'hybridation avec les tampons d'hybridation et de détection préparés au laboratoire sont opérationnels et peuvent générer des résultats comparables à ceux obtenus avec l'utilisation des tampons commerciaux. Malheureusement, les tampons de blocages, de lavages (stringences) et de lavages (Tween 20) préparés au laboratoire ne sont pas opérationnels car ils ne permettent pas d'obtenir des résultats comparables à ceux obtenus avec l'utilisation des tampons commerciaux.

Conclusion générale

La présente étude a permis de mettre en évidence de nouvelles connaissances sur la méthode d'isolement de *Clostridium perfringens* entérotoxigène puisque l'isolement conventionnel de cette espèce bactérienne dans les denrées alimentaires s'est parfois avéré compliqué par la présence de *C. perfringens* générique jumelé au manque de méthode de culture spécifiques aux souches entérotoxigènes.

Constituant une première étude au Québec et Canada et, grâce à la filtration sur grille hydrophobe et à l'étalement sur pétris combinée à l'hybridation sur colonie, cette étude nous a permis de démontrer qu'il est possible de détecter *C. perfringens* entérotoxigène à partir des échantillons de liquides de rinçage de carcasses de poulets de chair.

De manière plus spécifique, cette étude a permis :

De valider la sensibilité et la spécificité de la sonde d'ADN marquée à la digoxigénine qui reconnaît le gène *cpe* codant pour l'entérotoxine de *C. perfringens* ;

De valider l'utilisation d'une approche d'isolement proposant une combinaison de filtration ou d'étalement direct sur pétris combinée à l'hybridation sur colonie pour détecter *C. perfringens* entérotoxigène à partir de liquide de rinçage de carcasses de poulets de chair contaminé artificiellement ;

De déterminer une limite de détection qui est entre 1 et 3,2 CFU/mL par liquide de rinçage de carcasses de poulets de chair ;

D'utiliser les tampons d'hybridation et de détection faits au laboratoire pour réaliser une hybridation permettant de générer des résultats comparables à ceux obtenus avec l'utilisation des tampons commerciaux.

Limites

L'étude révèle la sensibilité de la méthode d'isolement combinée à l'hybridation sur colonie à détecter *C. perfringens* entérotoxigène. Néanmoins, il y a encore place à l'amélioration de l'efficacité de la méthode, et d'autres expérimentations sont nécessaires. Des

tests supplémentaires sont essentiels afin de trouver une solution concernant l'étiquetage de la membrane de nylon pour arriver, après les étapes d'hybridation, à retourner repiquer les souches qui ont hybridé positivement pour confirmer la présence du gène *cpe* par PCR. De plus, des approches alternatives d'étalement sur pétris sont également importantes afin d'isoler correctement les colonies en utilisant des volumes d'échantillons plus grands. Aussi, il faudrait, pour les tampons faits au laboratoire faire des tests supplémentaires en ajustant au mieux la stringence des tampons de lavages (stringence et Tween 20) afin de minimiser la quantité du bruit de fond obtenu. L'amélioration de la préparation du tampon de blocage afin de permettre à l'anticorps de se fixer sur les duplex formés entre les séquences parfaitement appariées lors de l'hybridation faciliterait ainsi la réussite de l'hybridation avec des tampons de laboratoire. Cette approche permettrait ainsi de minimiser le coût des dépenses dans la réalisation de l'hybridation sur colonie.

Perspectives

Les résultats de la présente étude ouvrent la voie à de futurs travaux sur l'épidémiologie de *Clostridium perfringens* entérotoxinogène dans la filière avicole. En effet, après l'isolement des souches entérotoxinogènes à partir des liquides de rinçage de carcasses, une caractérisation moléculaire de ces souches, y compris le toxinotypage, le typage du locus du gène *cpe* et le séquençage complet du génome, permettront de mieux comprendre l'épidémiologie de ce pathogène, ainsi que le rôle des poulets de chair comme réservoir.

Par ailleurs, d'autres travaux sur l'évaluation de l'utilisation de cette approche d'isolement combinée à l'hybridation sur divers types d'échantillons seraient à valider. Ainsi, il s'avèrerait intéressant de caractériser des souches entérotoxinogènes de *C. perfringens* isolées, grâce à l'utilisation de cette nouvelle approche, à partir de différents échantillons afin de mieux connaître leurs réservoirs.

Références Bibliographiques

1. Miyamoto K, Nagahama M. Clostridium: Food Poisoning by *Clostridium perfringens*. In: Caballero B, Finglas PM, Toldrá F, editors. *Encyclopedia of Food and Health*. Oxford: Academic Press; 2016. p. 149-54.
2. (PHAC) PHAoC. Estimates of the number of foodborne illness cases in Canada Ottawa 2014 [Available from: <http://www.phac-aspc.gc.ca/efwdemoha/efbi-emoa-eng.php>.
3. Hoffmann S, Batz MB, Morris Jr JG. Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *J Food Prot*. 2012;75(7):1292-302.
4. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, et al. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(1):7-15.
5. Authority EFS, Prevention ECfD. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J*. 2016;14(12):e04634.
6. McClane BA, Robertson SL, Li J. *Clostridium perfringens*. In: Michael P. Doyle RLB, editor. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 4th ed 2012. p. 465-89.
7. Leung VH, Phan Q, Costa CE, Nishimura C, Pung K, Horn L, et al. Notes from the Field: *Clostridium perfringens* outbreak at a catered lunch—Connecticut, September 2016. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2017;66(35):940.
8. Prescott JFM, J.I. ; Wu, A.K.K. Taxonomic Relationships among the Clostridia. In: Prescott J, Menzies P, Fraser R, Uzal F, Songer J, Popoff M, editors. *Clostridial Diseases of Animals*. NJ, USA,: John Wiley & Sons, Inc; 2016. p. pp. 1–5.
9. Rood JI, Adams V, Lacey J, Lyras D, McClane BA, Melville SB, et al. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaérobie*. 2018;53:5-10.
10. Lahti P, Lindström M, Somervuo P, Heikinheimo A, Korkeala H. Comparative genomic hybridization analysis shows different epidemiology of chromosomal and plasmid-borne *cpe*-carrying *Clostridium perfringens* type A. *PLoS One*. 2012;7(10):e46162.
11. Deguchi A, Miyamoto K, Kuwahara T, Miki Y, Kaneko I, Li J, et al. Genetic characterization of type A enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains. *PLoS One*. 2009;4(5):e5598.
12. Miwa N, Nishina T, Kubo S, Atsumi M, Honda H. Amount of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat detected by nested PCR. *Int J Food Microbiol*. 1998;42(3):195-200.
13. Miki Y, Miyamoto K, Kaneko-Hirano I, Fujiuchi K, Akimoto S. Prevalence and characterization of enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* isolates from retail meat products in Japan. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(17):5366-72.
14. Lin YT, Labbe R. Enterotoxigenicity and genetic relatedness of *Clostridium perfringens* isolates from retail foods in the United States. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(3):1642-6.
15. Khan M, Nazir J, Anjum AA, Ahmad MU, Nawaz M, Shabbir MZ. Toxinotyping and antimicrobial susceptibility of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates from mutton, beef and chicken meat. *J Food Sci Technol*. 2015;52(8):5323-8.
16. Hu WS, Kim H, Koo OK. Molecular genotyping, biofilm formation and antibiotic resistance of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolated from meat supplied to school cafeterias in South Korea. *Anaerobe*. 2018;52:115-21.
17. Heikinheimo A, Lindström M, Korkeala H. Enumeration and isolation of *cpe*-positive *Clostridium perfringens* spores from feces. *J Clin Microbiol*. 2004;42(9):3992-7.

18. Gaucher ML, Thibodeau A, Fravallo P, Archambault M, Arsenault J, Fournaise S, et al. Broiler chicken carcasses and their associated abattoirs as a source of enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: Prevalence and critical steps for contamination. *AIMS Microbiol.* 2018;4(3):439-54.
19. Gohari IM, Prescott JF. *Clostridium*. *Vet Microbiol*2022. p. 309-34.
20. Bean-Hodgins L, Kiarie EG. Mandated restrictions on the use of medically important antibiotics in broiler chicken production in Canada: implications, emerging challenges, and opportunities for bolstering gastrointestinal function and health — a review. *Can J Anim Sci.* 2021;101(4):602-29, 28.
21. Wade B, Keyburn A. The true cost of necrotic enteritis. *World Poult.* 2015;31(7):16-7.
22. Heredia NL, Labbé RG. *Clostridium perfringens*. *Guide to Foodborne Pathogens*2013. p. 133-42).
23. Bacon RT, Sofos JN. Characteristics of Biological Hazards in Foods. In: Ronald H. Schmidt GER, editor. *Food Safety Handbook*2003. p. 157-95.
24. McClane B, Uzal F, Miyakawa M, Lyerly D, Wilkins T. *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*. New York, NY: Springer; 2006.
25. Uzal FA, Freedman JC, Shrestha A, Theoret JR, Garcia J, Awad MM, et al. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future Microbiol.* 2014;9(3):361-77.
26. Mehdizadeh Gohari I, Kropinski AM, Weese SJ, Parreira VR, Whitehead AE, Boerlin P, et al. Plasmid Characterization and Chromosome Analysis of Two netF+ *Clostridium perfringens* Isolates Associated with Foal and Canine Necrotizing Enteritis. *PLoS One.* 2016;11(2):e0148344.
27. Mehdizadeh Gohari I, M AN, Li J, Shrestha A, Uzal F, B AM. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. *Virulence.* 2021;12(1):723-53.
28. Gurjar A, Li J, McClane BA. Characterization of toxin plasmids in *Clostridium perfringens* type C isolates. *Infect Immun.* 2010;78(11):4860-9.
29. Sayeed S, Li J, McClane BA. Characterization of virulence plasmid diversity among *Clostridium perfringens* type B isolates. *Infect Immun.* 2010;78(1):495-504.
30. Sayeed S, Li J, McClane BA. Virulence plasmid diversity in *Clostridium perfringens* type D isolates. *Infect Immun.* 2007;75(5):2391-8.
31. Miyamoto K, Li J, Sayeed S, Akimoto S, McClane BA. Sequencing and diversity analyses reveal extensive similarities between some epsilon-toxin-encoding plasmids and the pCPF5603 *Clostridium perfringens* enterotoxin plasmid. *J Bacteriol.* 2008;190(21):7178-88.
32. Uzal FA, Navarro MA, Li J, Freedman JC, Shrestha A, McClane BA. Comparative pathogenesis of enteric clostridial infections in humans and animals. *Anaérobic.* 2018;53:11-20.
33. Li J, Miyamoto K, McClane BA. Comparison of virulence plasmids among *Clostridium perfringens* type E isolates. *Infect Immun.* 2007;75(4):1811-9.
34. Gibert M, Petit L, Raffestin S, Okabe A, Popoff MR. *Clostridium perfringens* iota-toxin requires activation of both binding and enzymatic components for cytopathic activity. *Infect Immun.* 2000;68(7):3848-53.
35. Popoff MR. Epsilon toxin: a fascinating pore-forming toxin. *FEBS J.* 2011;278(23):4602-15.
36. Lepp D, Roxas B, Parreira VR, Marri PR, Rosey EL, Gong J, et al. Identification of novel pathogenicity loci in *Clostridium perfringens* strains that cause avian necrotic enteritis. *PLoS One.* 2010;5(5):e10795.
37. Bannam TL, Yan X-X, Harrison PF, Seemann T, Keyburn AL, Stubenrauch C, et al. Necrotic enteritis-derived *Clostridium perfringens* strain with three closely related independently conjugative toxin and antibiotic resistance plasmids. *mBio.* 2011;2(5):e00190-11.
38. Parreira VR, Costa M, Eikmeyer F, Blom J, Prescott JF. Sequence of two plasmids from *Clostridium perfringens* chicken necrotic enteritis isolates and comparison with *C. perfringens* conjugative plasmids. *PLoS One.* 2012;7(11):e49753.

39. Lacey JA, Keyburn AL, Ford ME, Portela RW, Johanesen PA, Lyras D, et al. Conjugation-Mediated Horizontal Gene Transfer of *Clostridium perfringens* Plasmids in the Chicken Gastrointestinal Tract Results in the Formation of New Virulent Strains. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(24).
40. Knox R, MacDonald E. Outbreaks of Food Poisoning in Certain Leicester Institutions. *Med Off.* 1943;69(3):21-2.
41. Borriello SP, Larson HE, Welch AR, Barclay F, Stringer MF, Bartholomew BA. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: a possible cause of antibiotic-associated diarrhoea. *Lancet.* 1984;1(8372):305-7.
42. Brett M, Rodhouse J, Donovan T, Tebbutt G, Hutchinson D. Detection of *Clostridium perfringens* and its enterotoxin in cases of sporadic diarrhoea. *J Clin Pathol.* 1992;45(7):609-11.
43. Murrell T, Ingham B, Moss J, Taylor W. A hypothesis concerning *Clostridium perfringens* type A enterotoxin (CPE) and sudden infant death syndrome (SIDS). *Med Hypotheses.* 1987;22(4):401-13.
44. Li J, Chen J, Vidal JE, McClane BA. The Agr-like quorum-sensing system regulates sporulation and production of enterotoxin and beta2 toxin by *Clostridium perfringens* type A non-food-borne human gastrointestinal disease strain F5603. *Infect Immun.* 2011;79(6):2451-9.
45. Collie RE, McClane BA. Evidence That the Enterotoxin Gene Can Be Episomal in *Clostridium perfringens* Isolates Associated with Non-Food-Borne Human Gastrointestinal Diseases. *J Clin Microbiol.* 1998;36(1):30-6.
46. Miyamoto K, Fisher DJ, Li J, Sayeed S, Akimoto S, McClane BA. Complete sequencing and diversity analysis of the enterotoxin-encoding plasmids in *Clostridium perfringens* type A non-food-borne human gastrointestinal disease isolates. *J Bacteriol.* 2006;188(4):1585-98.
47. Billington SJ, Wieckowski EU, Sarker MR, Bueschel D, Songer JG, McClane BA. *Clostridium perfringens* type E animal enteritis isolates with highly conserved, silent enterotoxin gene sequences. *Infect Immun.* 1998;66(9):4531-6.
48. Miyamoto K, Yumine N, Mimura K, Nagahama M, Li J, McClane BA, et al. Identification of novel *Clostridium perfringens* type E strains that carry an iota toxin plasmid with a functional enterotoxin gene. *PLoS One.* 2011;6(5):e20376.
49. Li J, Adams V, Bannam TL, Miyamoto K, Garcia JP, Uzal FA, et al. Toxin plasmids of *Clostridium perfringens*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2013;77(2):208-33.
50. Li J, Miyamoto K, Sayeed S, McClane BA. Organization of the cpe locus in CPE-positive *Clostridium perfringens* type C and D isolates. *PLoS One.* 2010;5(6):e10932.
51. Sarker MR, Carman RJ, McClane BA. Inactivation of the gene (cpe) encoding *Clostridium perfringens* enterotoxin eliminates the ability of two cpe-positive *C. perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates to affect rabbit ileal loops. *Mol Microbiol.* 1999;33(5):946-58.
52. Bos J, Smithee L, McClane B, Distefano RF, Uzal F, Songer JG, et al. Fatal necrotizing colitis following a foodborne outbreak of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A infection. *Clin Infect Dis.* 2005;40(10):e78-83.
53. (CDC) Cplcelpdm. Fatal foodborne *Clostridium perfringens* illness at a state psychiatric hospital--Louisiana, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2012;61(32):605-8.
54. Freedman JC, Theoret JR, Wisniewski JA, Uzal FA, Rood JI, McClane BA. *Clostridium perfringens* type A-E toxin plasmids. *Res Microbiol.* 2015;166(4):264-79.
55. Yonogi S, Matsuda S, Kawai T, Yoda T, Harada T, Kumeda Y, et al. BEC, a novel enterotoxin of *Clostridium perfringens* found in human clinical isolates from acute gastroenteritis outbreaks. *Infect Immun.* 2014;82(6):2390-9.
56. Briggs DC, Naylor CE, Smedley JG, 3rd, Lukyanova N, Robertson S, Moss DS, et al. Structure of the food-poisoning *Clostridium perfringens* enterotoxin reveals similarity to the aerolysin-like pore-forming toxins. *J Mol Biol.* 2011;413(1):138-49.

57. Kitadokoro K, Nishimura K, Kamitani S, Fukui-Miyazaki A, Toshima H, Abe H, et al. Crystal structure of *Clostridium perfringens* enterotoxin displays features of beta-pore-forming toxins. *J Biol Chem.* 2011;286(22):19549-55.
58. Freedman JC, Shrestha A, McClane BA. *Clostridium perfringens* Enterotoxin: Action, Genetics, and Translational Applications. *Toxins (Basel).* 2016;8(3).
59. Shinoda T, Shinya N, Ito K, Ohsawa N, Terada T, Hirata K, et al. Structural basis for disruption of claudin assembly in tight junctions by an enterotoxin. *Sci Rep.* 2016;6:33632.
60. McClane BA, Rood JI. Clostridial toxins involved in human enteric and histotoxic infections. In: Bahl H DP, editor. *Clostridia: biotechnology and medical applications.* Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2001. p. 169–209.
61. Czczulin JR, Hanna PC, McClane BA. Cloning, nucleotide sequencing, and expression of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene in *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1993;61(8):3429-39.
62. Rood JI, Cole ST. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol Rev.* 1991;55(4):621-48.
63. Collie RE, Kokai-Kun JF, McClane BA. Phenotypic characterization of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates from non-foodborne human gastrointestinal diseases. *Anaérobie.* 1998;4(2):69-79.
64. Katahira J, Inoue N, Horiguchi Y, Matsuda M, Sugimoto N. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J Cell Biol.* 1997;136(6):1239-47.
65. Shrestha A, Uzal FA, McClane BA. The interaction of *Clostridium perfringens* enterotoxin with receptor claudins. *Anaérobie.* 2016;41:18-26.
66. Saitoh Y, Suzuki H, Tani K, Nishikawa K, Irie K, Ogura Y, et al. Tight junctions. Structural insight into tight junction disassembly by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Science.* 2015;347(6223):775-8.
67. Robertson SL, Smedley JG, 3rd, McClane BA. Identification of a claudin-4 residue important for mediating the host cell binding and action of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect Immun.* 2010;78(1):505-17.
68. Robertson SL, Smedley JG, 3rd, Singh U, Chakrabarti G, Van Itallie CM, Anderson JM, et al. Compositional and stoichiometric analysis of *Clostridium perfringens* enterotoxin complexes in Caco-2 cells and claudin 4 fibroblast transfectants. *Cell Microbiol.* 2007;9(11):2734-55.
69. Mehdizadeh Gohari I, Li J, Navarro M, Uzal F, McClane B. Effects of Claudin-1 on the Action of *Clostridium perfringens* Enterotoxin in Caco-2 Cells. *Toxins (Basel).* 2019;11(10).
70. Smedley JG, 3rd, Uzal FA, McClane BA. Identification of a prepore large-complex stage in the mechanism of action of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect Immun.* 2007;75(5):2381-90.
71. Chakrabarti G, Zhou X, McClane BA. Death pathways activated in CaCo-2 cells by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect Immun.* 2003;71(8):4260-70.
72. Chakrabarti G, McClane BA. The importance of calcium influx, calpain and calmodulin for the activation of CaCo-2 cell death pathways by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Cell Microbiol.* 2005;7(1):129-46.
73. Singh U, Van Itallie CM, Mitic LL, Anderson JM, McClane BA. CaCo-2 cells treated with *Clostridium perfringens* enterotoxin form multiple large complex species, one of which contains the tight junction protein occludin. *J Biol Chem.* 2000;275(24):18407-17.
74. Kokai-Kun JF, Songer JG, Czczulin JR, Chen F, McClane BA. Comparison of Western immunoblots and gene detection assays for identification of potentially enterotoxigenic isolates of *Clostridium perfringens*. *J Clin Microbiol.* 1994;32(10):2533-9.
75. Brynestad S, Synstad B, Granum PE. The *Clostridium perfringens* enterotoxin gene is on a transposable element in type A human food poisoning strains. *Microbiol Rev.* 1997;143 (Pt 7):2109-15.
76. Cornillot E, Saint-Joanis B, Daube G, Katayama S, Granum PE, Canard B, et al. The enterotoxin gene (*cpe*) of *Clostridium perfringens* can be chromosomal or plasmid-borne. *Mol Microbiol.* 1995;15(4):639-47.

77. Brynestad S, Granum PE. Evidence that Tn5565, which includes the enterotoxin gene in *Clostridium perfringens*, can have a circular form which may be a transposition intermediate. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;170(1):281-6.
78. Brynestad S, Sarker MR, McClane BA, Granum PE, Rood JI. Enterotoxin plasmid from *Clostridium perfringens* is conjugative. *Infect Immun.* 2001;69(5):3483-7.
79. Li J, Paredes-Sabja D, Sarker MR, McClane BA. *Clostridium perfringens* Sporulation and Sporulation-Associated Toxin Production. *Microbiol Spectr.* 2016;4(3).
80. Orsburn B, Melville SB, Popham DL. Factors contributing to heat resistance of *Clostridium perfringens* endospores. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(11):3328-35.
81. Li J, McClane BA. A novel small acid soluble protein variant is important for spore resistance of most *Clostridium perfringens* food poisoning isolates. *PLoS Pathog.* 2008;4(5):e1000056.
82. Zhao Y, Melville SB. Identification and characterization of sporulation-dependent promoters upstream of the enterotoxin gene (cpe) of *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol.* 1998;180(1):136-42.
83. Czczulin JR, Collie RE, McClane BA. Regulated expression of *Clostridium perfringens* enterotoxin in naturally cpe-negative type A, B, and C isolates of *C. perfringens*. *Infect Immun.* 1996;64(8):3301-9.
84. McClane B, Robertson S, Li J. Food microbiology: fundamentals and frontiers. *Clostridium perfringens.* 2013:465-89.
85. Al-Hinai MA, Jones SW, Papoutsakis ET. The *Clostridium* sporulation programs: diversity and preservation of endospore differentiation. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2015;79(1):19-37.
86. Harry KH, Zhou R, Kroos L, Melville SB. Sporulation and enterotoxin (CPE) synthesis are controlled by the sporulation-specific sigma factors SigE and SigK in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol.* 2009;191(8):2728-42.
87. Kang CK, Woodburn M, Pagenkopf A, Cheney R. Growth, sporulation, and germination of *Clostridium perfringens* in media of controlled water activity. *Appl Microbiol.* 1969;18(5):798-805.
88. Garcia-Alvarado JS, Labbé RG, Rodriguez MA. Sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A at 37 and 43 degrees C. *Appl Environ Microbiol.* 1992;58(4):1411-4.
89. Meyer M, Tholozan JL. A new growth and in vitro sporulation medium for *Clostridium perfringens*. *Lett Appl Microbiol.* 1999;28(2):98-102.
90. Ushijima T, Sugitani A, Ozaki Y. A pair of semisolid media facilitate detection of spore and enterotoxin of *Clostridium perfringens*. *J Microbiol Methods.* 1987;6(3):145-52.
91. de Jong A. *Clostridium perfringens*: spores & cells, media & modeling. 2003.
92. Tseng W, Labbe RG. Characteristics of a sporulation stimulating factor from *Clostridium perfringens* type A. *Lett Appl Microbiol.* 2000;30(3):254-7.
93. Shih NJ, Labbé RG. Sporulation-promoting ability of *Clostridium perfringens* culture fluids. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(4):1441-3.
94. Heredia NL, Labbe RG, Rodriguez MA, Garcia-Alvarado JS. Growth, sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A in the presence of human bile salts. *FEMS Microbiol Lett.* 1991;68(1):15-21.
95. Granum PE, Stewart GS. Molecular biology of *Clostridium perfringens* enterotoxin. In: Sebald M, editor. *Genetics and Molecular Biology of Anaerobic Bacteria.* 1 ed: Springer New York, NY; 1993. p. 235-47.
96. Wrigley DM, Hanwella HD, Thon BL. Acid exposure enhances sporulation of certain strains of *Clostridium perfringens*. *Anaérobie.* 1995;1(5):263-7.
97. Raju D, Setlow P, Sarker MR. Antisense-RNA-mediated decreased synthesis of small, acid-soluble spore proteins leads to decreased resistance of *Clostridium perfringens* spores to moist heat and UV radiation. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(7):2048-53.

98. Novak JS, Juneja VK, McClane BA. An ultrastructural comparison of spores from various strains of *Clostridium perfringens* and correlations with heat resistance parameters. *Int J Food Microbiol.* 2003;86(3):239-47.
99. Lindström M, Heikinheimo A, Lahti P, Korkeala H. Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. *Food microbiol.* 2011;28(2):192-8.
100. Carman RJ, Sayeed S, Li J, Genheimer CW, Hiltonsmith MF, Wilkins TD, et al. *Clostridium perfringens* toxin genotypes in the feces of healthy North Americans. *Anaérobic.* 2008;14(2):102-8.
101. Li J, Sayeed S, McClane BA. Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* Isolates in Pittsburgh (Pennsylvania) area soils and home kitchens. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(22):7218-24.
102. Heikinheimo A, Lindström M, Granum PE, Korkeala H. Humans as reservoir for enterotoxin gene--carrying *Clostridium perfringens* type A. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(11):1724-9.
103. Kiu R, Caim S, Painset A, Pickard D, Swift C, Dougan G, et al. Phylogenomic analysis of gastroenteritis-associated *Clostridium perfringens* in England and Wales over a 7-year period indicates distribution of clonal toxigenic strains in multiple outbreaks and extensive involvement of enterotoxin-encoding (CPE) plasmids. *Microb Genom.* 2019;5(10).
104. Álvarez-Pérez S, Blanco JL, Harmanus C, Kuijper EJ, García ME. Prevalence and characteristics of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in dogs and cats attended in diverse veterinary clinics from the Madrid region. *Anaérobic.* 2017;48:47-55.
105. Wen Q, McClane BA. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in American retail foods. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(5):2685-91.
106. Hu W-S, Kim H, Koo OK. Molecular genotyping, biofilm formation and antibiotic resistance of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolated from meat supplied to school cafeterias in South Korea. *Anaérobic.* 2018;52:115-21.
107. Singh R, Bhilegaonkar K, Agarwal R. Studies on occurrence and characterization of *Clostridium perfringens* from select meats. *Journal of food safety.* 2005;25(2):146-56.
108. Tschirdewahn B, Notermans S, Wernars K, Untermann F. The presence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains in faeces of various animals. *Int J Food Microbiol.* 1991;14(2):175-8.
109. Van Damme-Jongsten M, Wernars K, Notermans S. Cloning and sequencing of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1989;56(2):181-90.
110. Tassew H, Abdissa A, Beyene G, Gebre-Selassie S. Microbial flora and food borne pathogens on minced meat and their susceptibility to antimicrobial agents. *Ethiop J Health Sci.* 2010;20(3):137-43.
111. McClung LS. Human Food Poisoning Due to Growth of *Clostridium perfringens* (*C. welchii*) in Freshly Cooked Chicken: Preliminary Note. *J Bacteriol.* 1945;50(2):229-31.
112. Rouger A, Tresse O, Zagorec M. Bacterial Contaminants of Poultry Meat: Sources, Species, and Dynamics. *Microorganisms.* 2017;5(3).
113. Craven S, Stern N, Bailey J, Cox N. Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens and their environment during production and processing. *Avian Dis.* 2001;887-96.
114. Nowell VJ, Poppe C, Parreira VR, Jiang Y-F, Reid-Smith R, Prescott JF. *Clostridium perfringens* in retail chicken. *Anaérobic.* 2010;16(3):314-5.
115. Van Immerseel F, De Buck J, Pasmans F, Huyghebaert G, Haesebrouck F, Ducatelle R. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol.* 2004;33(6):537-49.
116. Xu Z, Hu C, Xia M, Zhan X, Wang M. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poult Sci.* 2003;82(6):1030-6.
117. Gaucher ML, Quessy S, Letellier A, Arsenault J, Boulianne M. Impact of a drug-free program on broiler chicken growth performances, gut health, *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* occurrences at the farm level. *Poult Sci.* 2015;94(8):1791-801.

118. Kiarie EG, Leung H, Akbari Moghaddam Kakhki R, Patterson R, Barta JR. Utility of feed enzymes and yeast derivatives in ameliorating deleterious effects of coccidiosis on intestinal health and function in broiler chickens. *Front Vet Sci.* 2019;6:473.
119. Golden CE, Mishra A. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in alternative and conventionally produced chicken in the United States: A systematic review and Meta-Analysis. *J Food Prot.* 2020;83(7):1181-97.
120. Thomas MK, Murray R, Flockhart L, Pintar K, Pollari F, Fazil A, et al. Estimates of the burden of foodborne illness in Canada for 30 specified pathogens and unspecified agents, circa 2006. *Foodborne Pathog Dis.* 2013;10(7):639-48.
121. (CDC) CfDCaP. *Clostridium perfringens* gastroenteritis associated with corned beef served at St. Patrick's Day meals--Ohio and Virginia, 1993. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1994;43(8):137, 43-4.
122. García S, Vidal JE, Heredia N, Juneja VK. *Clostridium perfringens*. *Food microbiol*2019. p. 513-40.
123. (CDC) Cplcelpdm. Multistate outbreak of *Salmonella typhimurium* infections associated with eating ground beef--United States, 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2006;55(7):180-2.
124. Bamford C, Milligan P, Kaliski S. Dangers of *Clostridium perfringens* food poisoning in psychiatric patients. *Afr J Psychiatry.* 2019;25(1):1-2.
125. Kyne L, Hamel MB, Polavaram R, Kelly CP. Health care costs and mortality associated with nosocomial diarrhea due to *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis.* 2002;34(3):346-53.
126. Asha NJ, Tompkins D, Wilcox MH. Comparative analysis of prevalence, risk factors, and molecular epidemiology of antibiotic-associated diarrhea due to *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2006;44(8):2785-91.
127. Kim YJ, Kim SH, Ahn J, Cho S, Kim D, Kim K, et al. Prevalence of *Clostridium perfringens* toxin in patients suspected of having antibiotic-associated diarrhea. *Anaérobic.* 2017;48:34-6.
128. Zollner-Schwetz I, Högenauer C, Joainig M, Weberhofer P, Gorkiewicz G, Valentin T, et al. Role of *Klebsiella oxytoca* in antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis.* 2008;47(9):e74-8.
129. Vaishnavi C, Kaur S, Singh K. *Clostridium perfringens* type A & antibiotic associated diarrhoea. *Indian J Med Res.* 2005;122(1):52-6.
130. Carman RJ. *Clostridium perfringens* in spontaneous and antibiotic-associated diarrhoea of man and other animals. *Rev Med Microbiol.* 1997;8:S46.
131. Borriello SP. Clostridial disease of the gut. *Clin Infect Dis.* 1995;20 Suppl 2:S242-50.
132. Modi N, Wilcox MH. Evidence for antibiotic induced *Clostridium perfringens* diarrhoea. *J Clin Pathol.* 2001;54(10):748-51.
133. Asha NJ, Wilcox MH. Laboratory diagnosis of *Clostridium perfringens* antibiotic-associated diarrhoea. *J Med Microbiol.* 2002;51(10):891-4.
134. Sparks SG, Carman RJ, Sarker MR, McClane BA. Genotyping of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with antibiotic-associated diarrhea and food poisoning in North America. *J Clin Microbiol.* 2001;39(3):883-8.
135. Azimirad M, Gholami F, Yadegar A, Knight DR, Shamloei S, Aghdaei HA, et al. Prevalence and characterization of *Clostridium perfringens* toxinotypes among patients with antibiotic-associated diarrhea in Iran. *Sci Rep.* 2019;9(1):7792.
136. Wrigley DM. Inhibition of *Clostridium perfringens* sporulation by *Bacteroides fragilis* and short-chain fatty acids. *Anaérobic.* 2004;10(5):295-300.
137. Larson HE, Borriello SP. Infectious diarrhea due to *Clostridium perfringens*. *J Infect Dis.* 1988;157(2):390-1.
138. Mpamugo O, Donovan T, Brett M. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* as a cause of sporadic cases of diarrhoea. *J Med Microbiol.* 1995;43(6):442-5.

139. Wong S, Santullo P, O'driscoll J, Jamous A, Hirani S, Saif M. Use of antibiotic and prevalence of antibiotic-associated diarrhoea in-patients with spinal cord injuries: a UK national spinal injury centre experience. *Spinal Cord*. 2017;55(6):583-7.
140. Kindley AD, Rboerts PJ, Tulloch WH. Neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet*. 1977;1(8012):649.
141. Pedersen PV, Hansen FH, Halveg AB, Christiansen ED. Necrotising enterocolitis of the newborn--is it gas-gangrene of the bowel? *Lancet*. 1976;2(7988):715-6.
142. Kinney HC, Thach BT. The sudden infant death syndrome. *N Engl J Med*. 2009;361(8):795-805.
143. Heredia N, García S. Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Anim Nutr*. 2018;4(3):250-5.
144. Rees CM, Eaton S, Pierro A. National prospective surveillance study of necrotizing enterocolitis in neonatal intensive care units. *J Pediatr Surg*. 2010;45(7):1391-7.
145. Lim JC, Golden JM, Ford HR. Pathogenesis of neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatr Surg Int*. 2015;31(6):509-18.
146. Sim K, Shaw AG, Randell P, Cox MJ, McClure ZE, Li MS, et al. Dysbiosis anticipating necrotizing enterocolitis in very premature infants. *Clin Infect Dis*. 2015;60(3):389-97.
147. Zhou Y, Shan G, Sodergren E, Weinstock G, Walker WA, Gregory KE. Longitudinal analysis of the premature infant intestinal microbiome prior to necrotizing enterocolitis: a case-control study. *PLoS One*. 2015;10(3):e0118632.
148. Cassir N, Benamar S, Khalil JB, Croce O, Saint-Faust M, Jacquot A, et al. *Clostridium butyricum* Strains and Dysbiosis Linked to Necrotizing Enterocolitis in Preterm Neonates. *Clin Infect Dis*. 2015;61(7):1107-15.
149. Heida FH, van Zoonen A, Hulscher JBF, Te Kiefte BJC, Wessels R, Kooi EMW, et al. A Necrotizing Enterocolitis-Associated Gut Microbiota Is Present in the Meconium: Results of a Prospective Study. *Clin Infect Dis*. 2016;62(7):863-70.
150. Labbé RG, Juneja V. *Clostridium perfringens* gastroenteritis. *Foodborne infections and intoxications*: Elsevier; 2013. p. 99-112.
151. Erkmén O. Practice 20 - Isolation and counting of *Clostridium perfringens*. In: Erkmén O, editor. *Microbiological Analysis of Foods and Food Processing Environments*: Academic Press; 2022. p. 217-27.
152. Heredia NL, Labbé RG. *Clostridium perfringens*. *Guide to Foodborne Pathogens* 2013. p. 82-90.
153. Kaneko I, Miyamoto K, Mimura K, Yumine N, Utsunomiya H, Akimoto S, et al. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat samples by using molecular methods. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(21):7526-32.
154. Sharpe AN, Rayman MK, Burgener DM, Conley D, Loit A, Milling M, et al. Collaborative study of the MPN, Anderson-Baird-Parker direct plating, and hydrophobic grid-membrane filter methods for the enumeration of *Escherichia coli* biotype I in foods. *Can J Microbiol*. 1983;29(10):1247-52.
155. Tournas VH. Evaluation of the Hydrophobic Grid Membrane Filter for the Enumeration of Moulds and Yeasts in Naturally-Contaminated Foods. *Microbiol Insights*. 2009;2:MBI.S2906.
156. McDaniels AE, Bordner RH, Menkedick JR, Weber CI. Comparison of the hydrophobic-grid membrane filter procedure and standard methods for coliform analysis of water. *Appl Environ Microbiol*. 1987;53(5):1003-9.
157. Glynn SM, Taasoobshirazi G, Brickman P. Nonscience majors learning science: A theoretical model of motivation. *J Res Sci Teach*. 2007;44(8):1088-107.
158. Almeida C, Azevedo NF. An Introduction to Fluorescence in situ Hybridization in Microorganisms. In: Azevedo NF, Almeida C, editors. *Fluorescence In-Situ Hybridization (FISH) for Microbial Cells: Methods and Concepts*. New York, NY: Springer US; 2021. p. 1-15.
159. Rijpens NP, Herman LM. Molecular methods for identification and detection of bacterial food pathogens. *J AOAC Int*. 2002;85(4):984-95.

160. Nakamura H, Ogasawara J, Monma C, Hase A, Suzuki H, Kai A, et al. Usefulness of a combination of pulsed-field gel electrophoresis and enrichment culture in laboratory investigation of a foodborne outbreak due to *Clostridium perfringens*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;47(3):471-5.
161. Datta AR, Wentz BA, Hill WE. Detection of hemolytic *Listeria monocytogenes* by using DNA colony hybridization. *Appl Environ Microbiol*. 1987;53(9):2256-9.
162. Yan W, Malik MN, Peterkin PI, Sharpe AN. Comparison of the hydrophobic grid-membrane filter DNA probe method and the Health Protection Branch standard method for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *Int J Food Microbiol*. 1996;30(3):379-84.
163. Todd EC, Szabo RA, MacKenzie JM, Martin A, Rahn K, Gyles C, et al. Application of a DNA hybridization-hydrophobic-grid membrane filter method for detection and isolation of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65(11):4775-80.
164. Ng LK, Kingombe CI, Yan W, Taylor DE, Hiratsuka K, Malik N, et al. Specific detection and confirmation of *Campylobacter jejuni* by DNA hybridization and PCR. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63(11):4558-63.
165. Kaboré P, Letellier A, Fravallo P, Desautels C, Fairbrother J. Development of a DNA probe colony hybridization hydrophobic grid membrane filter method for detection of *Escherichia coli* isolates carrying virulence and antimicrobial resistance genes in the pig intestinal microflora. Second university cycle: Montreal university; 2009.
166. Collee JG, Mackie TJ, McCartney JE. Mackie & McCartney practical medical microbiology: Harcourt Health Sciences; 1996.
167. Hansen MV, Elliott LP. New presumptive identification test for *Clostridium perfringens*: reverse CAMP test. *J Clin Microbiol*. 1980;12(4):617-9.
168. Bottone EJ. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes Infect*. 1999;1(4):323-33.
169. van Belkum A, Struelens M, de Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(3):547-60.
170. Forti K, Ferroni L, Pellegrini M, Cruciani D, De Giuseppe A, Crotti S, et al. Molecular Characterization of *Clostridium perfringens* Strains Isolated in Italy. *Toxins (Basel)*. 2020;12(10).
171. Gaucher ML, Perron GG, Arsenault J, Letellier A, Boulianne M, Quessy S. Recurring Necrotic Enteritis Outbreaks in Commercial Broiler Chicken Flocks Strongly Influence Toxin Gene Carriage and Species Richness in the Resident *Clostridium perfringens* Population. *Front Microbiol*. 2017;8:881.
172. De Cesare A, Borilova G, Svobodova I, Bondioli V, Manfreda G. *Clostridium perfringens* occurrence and ribotypes in healthy broilers reared in different European countries. *Poult Sci*. 2009;88(9):1850-7.
173. Ståhl PL, Lundeberg J. Toward the single-hour high-quality genome. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:359-78.
174. Mahamat Abdelrahim A, Radomski N, Delannoy S, Djellal S, Le Négrate M, Hadjab K, et al. Large-Scale Genomic Analyses and Toxinotyping of *Clostridium perfringens* Implicated in Foodborne Outbreaks in France. *Front Microbiol*. 2019;10:777.
175. Joensen KG, Scheutz F, Lund O, Hasman H, Kaas RS, Nielsen EM, et al. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 2014;52(5):1501-10.
176. den Bakker HC, Allard MW, Bopp D, Brown EW, Fontana J, Iqbal Z, et al. Rapid whole-genome sequencing for surveillance of *Salmonella enterica serovar* enteritidis. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(8):1306-14.
177. Kwong JC, McCallum N, Sintchenko V, Howden BP. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathol*. 2015;47(3):199-210.

178. Shimizu T, Ohtani K, Hirakawa H, Ohshima K, Yamashita A, Shiba T, et al. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(2):996-1001.
179. Hassan KA, Elbourne LD, Tetu SG, Melville SB, Rood JI, Paulsen IT. Genomic analyses of *Clostridium perfringens* isolates from five toxinotypes. *Res Microbiol*. 2015;166(4):255-63.
180. Myers GS, Rasko DA, Cheung JK, Ravel J, Seshadri R, DeBoy RT, et al. Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. *Genome Res*. 2006;16(8):1031-40.
181. Mehdizadeh Gohari I, Kropinski AM, Weese SJ, Whitehead AE, Parreira VR, Boerlin P, et al. NetF-producing *Clostridium perfringens*: Clonality and plasmid pathogenicity loci analysis. *Infect Genet Evol*. 2017;49:32-8.
182. Lacey JA, Allnutt TR, Vezina B, Van TTH, Stent T, Han X, et al. Whole genome analysis reveals the diversity and evolutionary relationships between necrotic enteritis-causing strains of *Clostridium perfringens*. *BMC Genomics*. 2018;19(1):379.
183. Kiu R, Hall LJ. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerg Microbes Infect*. 2018;7(1):1-15.
184. Grass JE, Gould LH, Mahon BE. Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by *Clostridium perfringens*, United States, 1998-2010. *Foodborne Pathog Dis*. 2013;10(2):131-6.
185. Tam CC, Rodrigues LC, Viviani L, Dodds JP, Evans MR, Hunter PR, et al. Longitudinal study of infectious intestinal disease in the UK (IID2 study): incidence in the community and presenting to general practice. *Gut*. 2012;61(1):69-77.
186. Havelaar AH, Galindo ÁV, Kurowicka D, Cooke RM. Attribution of Foodborne Pathogens Using Structured Expert Elicitation. *Foodborne Pathog Dis*. 2008;5(5):649-59.
187. Butler AJ, Thomas MK, Pintar KD. Expert elicitation as a means to attribute 28 enteric pathogens to foodborne, waterborne, animal contact, and person-to-person transmission routes in Canada. *Foodborne Pathog Dis*. 2015;12(4):335-44.
188. Guran HS, Oksuztepe G. Detection and typing of *Clostridium perfringens* from retail chicken meat parts. *Lett Appl Microbiol*. 2013;57(1):77-82.
189. Marmion M, Ferone MT, Whyte P, Scannell AGM. The changing microbiome of poultry meat; from farm to fridge. *Food Microbiology*. 2021;99:103823.
190. Eisel D, Seth O, Grünwald-Janho S, Kruchen B, Rüger B. DIG application manual for filter hybridization. *Editorial Roche Diagnostics GmbH*. 2042008.
191. Butler AJ, Pintar KD, Thomas MK. Estimating the Relative Role of Various Subcategories of Food, Water, and Animal Contact Transmission of 28 Enteric Diseases in Canada. *Foodborne Pathog Dis*. 2016;13(2):57-64.
192. Hill WE, Payne WL, Crouch RJ, Davis VM, English LL, Ferreira JL, et al. Genetic methods for the detection of microbial pathogens. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* by DNA colony hybridization: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem*. 1984;67(4):801-7.
193. Grunstein M, Hogness DS. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72(10):3961-5.
194. Chandrashekhara KM, Isloor S, Veeresh BH, Hegde R, Rathnamma D, Murag S, et al. Limit of detection of genomic DNA by conventional PCR for estimating the load of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* associated with bovine mastitis. *Folia Microbiol (Praha)*. 2015;60(6):465-72.
195. Marie-Lou Gaucher, Alexandre Thibodeau, Philippe Fravallo, Marie Archambault, Julie Arsenault, Sylvain Fournaise, et al. Carcasses de poulets à griller et leurs abattoirs associés comme source de *Clostridium perfringens* entérotoxigène : prévalence et étapes critiques de la contamination. *AIMS Microbiol*. 2018;4(3): 439–454.
196. Martin R, Hoover C, Grimme S, Grogan C, Hölte J, Kessler C. A highly sensitive, nonradioactive DNA labeling and detection system. *BioTechniques*. 1990;9(6):762-8.

197. Farrell RE. Chapter 12 - Nucleic Acid Probe Technology. In: Farrell RE, editor. *RNA Methodologies (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press; 2010. p. 261-82.
198. Tsai S-t, Jin Y-t, Wu T-C. Synthesis of PCR-derived, digoxigenin-labeled DNA probes for in situ detection of Epstein-Barr early RNAs in Epstein-Barr virus-infected cells. *J Virol Methods*. 1995;54(1):67-74.
199. Schlapp T, Blaha I, Bauerfeind R, Wieler LH, Schoepe H, Weiß R, et al. Synthesis and evaluation of a non-radioactive gene probe for the detection of *C. perfringens* alpha toxin. *Mol Cell Probes*. 1995;9(2):101-9.
200. Baez LA, Juneja VK. Nonradioactive colony hybridization assay for detection and enumeration of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in raw beef. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61(2):807-10.
201. van Damme-Jongsten M, Haagsma J, Notermans S. Testing strains of *Clostridium perfringens* type A isolated from diarrhoeic piglets for the presence of the enterotoxin gene. *Vet Rec*. 1990;126(8):191-2.
202. de Muro MA. Probe Design, Production, and Applications. In: Walker JM, Rapley R, editors. *Medical Biomethods Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press; 2005. p. 13-23.
203. Priya V, Lucilla I, Giuseppe C, Marisa M. Development and application of DNA molecular probes. *AIMS Bioeng*. 2017;4(1):113-32.
204. Sterchi DL. Molecular pathology—in situ hybridization: Epub 2020 Jun 22; 2008.
205. Daube G, Simon P, Limbourg B, Manteca C, Mainil J, Kaeckenbeeck A. Hybridization of 2,659 *Clostridium perfringens* isolates with gene probes for seven toxins (alpha, beta, epsilon, iota, theta, mu, and enterotoxin) and for sialidase. *Am J Vet Res*. 1996;57(4):496-501.
206. Viterbo D, Marchal A, Mosbach V, Poggi L, Vaysse-Zinkhöfer W, Richard GF. A fast, sensitive and cost-effective method for nucleic acid detection using non-radioactive probes. *Biol Methods Protoc*. 2018;3(1):bpy006.