

N° ORDRE : 3795
de la thèse

THÈSE

Présentée

DEVANT L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

pour obtenir

le grade de : **DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

Mention : Biologie

PAR

Mily LEBLANC MARIDOR

Équipe d'accueil : UMR ENVN-INRA n°1300 BioEpAR

Équipe doctorale : Vie-Agro-Santé

Composante universitaire : U.F.R. S.V.E.

**CAMPYLOBACTER CHEZ LE PORC
METHODES D'IDENTIFICATION QUANTITATIVE ET DYNAMIQUE D'INFECTION**

Soutenue Le 17 décembre 2008 devant la commission d'examen

COMPOSITION DU JURY

Rapporteurs : M. **Francis MEGRAUD**
M. **Lieven De ZUTTER**

Professeur à l'Université de Bordeaux 2
Professeur à l'Université de Gent

Examineurs : Mme **Lisa KING**
Mme **Isabelle KEMPF**
Mme **Catherine BELLOC**
M. **Carlos BLANCO**
M. **François BEAUDEAU**

Epidémiologiste, InVS Paris
Directeur de Recherches, AFSSA Ploufragan
Maître de Conférences à l'ENV de Nantes
Professeur à l'Université de Rennes 1
Professeur à l'ENV de Nantes

REMERCIEMENTS

A MONSIEUR FRANCIS MEGRAUD,

Professeur à l'Université de Bordeaux,

ET A MONSIEUR LIEVEN DE ZUTTER,

Professeur à l'Université de Gent,

Qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de cette thèse,

Remerciements respectueux.

A MESDAMES LISA KING ET ISABELLE KEMPF ET A MONSIEUR CARLOS BLANCO

Qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être membres de ce jury de thèse,

Remerciements respectueux.

A MONSIEUR FRANÇOIS BEAUDEAU

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes,

Qui a très aimablement accepté d'être directeur de cette thèse.

Remerciements respectueux.

A MADAME CATHERINE BELLOC,

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes,

Pour ses conseils et son soutien au cours de l'élaboration de cette thèse.

Sincères remerciements.

A MESDAMES MARTINE DENIS, EMMANUELLE ESPIE ET GWENNOLA ERMEL

A MESSIEURS CARLOS BLANCO, JEAN-MICHEL BOLLA ET PHILIPPE LEHOURS,

Qui ont très aimablement accepté de participer à mes comités de thèse.

Merci pour leurs remarques constructives.

A MESSIEURS MICHEL FEDERIGHI ET HENRI SEEGER,

Directeurs, respectivement, de l'UMR-INRA 1014 SECALIM et de l'UMR-INRA 1300 BioEpAR à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes,

Pour m'avoir accueillie au sein de leurs unités respectives.

Sincères remerciements.

A MONSIEUR BERNARD BESSE ET MADAME VIRGINIE FERRE,

Du Service de Virologie du CHU de Nantes.

A MONSIEUR PIERRE DE COOPET,

Du Laboratoire des Fonctions digestives et Nutrition Humaine, INRA-Nantes

Sincères remerciements.

A TOUTE L'EQUIPE DE L'UMR-INRA 1300 BIOEPAR

Pour leur accueil et leur bonne humeur,

Sincères remerciements.

A TOUTE L'EQUIPE DE L'UNITE MAE MALADIE DES ANIMAUX D'ELEVAGE

Plus particulièrement à Mesdames Emmanuelle Blandin et Françoise Leray

pour leur aide indispensable et pour leur gentillesse

Sincères remerciements.

A TOUTE L'EQUIPE DE L'UNITE HQPAP DE L'AFSSA DE PLOUFRAGAN

Pour leur accueil et leur gentillesse,

Plus particulièrement à Martine Denis pour sa patience, son aide constructive

aux différents moments de ma thèse et pour ses explications.

Sincères remerciements.

A TOUTE L'EQUIPE DE L'UMR-INRA-1014 SECALIM,

Plus particulièrement à Mr Albert Rossero pour sa patience et ses explications.

Sincères remerciements.

AUX MIRACLES DE LA VIE,

Qui font que je suis là ici et maintenant et qui ont ponctué la mienne de merveilleux moments.

A MA BONNE ETOILE,

Qui m'accompagne depuis quelques années déjà ...

A PAPA ET MAMAN,

Créateurs exceptionnels et exemplaires d'un modèle particulier!

Leur appui et leur tendresse sans faille m'ont permis de réaliser mes rêves.

A MA PETITE SOEUR,

Qui ensoleille ma vie depuis toutes ces années, toujours à mes côtés...

A PAPY, MAMY ET TOUTE MA FAMILLE,

Qui m'ont toujours encouragée et fièrement soutenu pour suivre cette voie

A TOUS MES AMIS

Qui ont su m'épauler, gérer mes hauts et mes bas et qui ont toujours été là pour me remettre sur le droit chemin et me botter le derrière quand je déraillais!

A REMI

La plus belle chose qui me soit arrivée pendant cette thèse... et qui me fait presque oublier le seul qui soit resté fidèle au poste, mon bel Obiwan!

***CAMPYLOBACTER* CHEZ LE PORC**
METHODES D'IDENTIFICATION
QUANTITATIVE
ET DYNAMIQUE D'INFECTION

MILY LEBLANC MARIDOR

2008

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE	I
LISTE DES ABREVIATIONS	VII
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES ANNEXES	XV
CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE	1
1. ETUDE SYNTHETIQUE DES <i>CAMPYLOBACTER</i>	3
1.1. GENERALITES	3
1.1.1. Historique	3
1.1.2. Taxonomie - Phylogénie	5
1.2. BACTERIOLOGIE	6
1.2.1. Description générale du genre	6
1.2.2. Morphologie et structure	7
1.2.2.1. Enveloppes cellulaires et cytoplasme	7
1.2.2.2. Le flagelle de <i>Campylobacter</i>	9
1.2.2.3. Génome de <i>Campylobacter</i> : chromosome et plasmides	10
1.2.3. Facteurs de développement <i>in vitro</i>	12
1.2.4. Caractères biochimiques	16
1.2.5. Sensibilité naturelle aux antibiotiques	17
1.2.6. Pouvoir pathogène	18
1.2.7. Détection bactériologique des <i>Campylobacter</i>	23
1.2.7.1. Nature et conservation des prélèvements pour l'identification	23
1.2.7.2. Protocole d'isolement et identification du genre <i>Campylobacter</i>	24
1.2.7.3. Identification du genre <i>Campylobacter</i> à partir de prélèvements polycontaminés	24
1.3. METHODES D'IDENTIFICATION ET DE CARACTERISATION	25
1.3.1. Identification de l'espèce	25
1.3.1.1. Identification par des tests biochimiques	25
1.3.1.2. Méthode avec amplification génique : la PCR (Polymerase Chain Reaction)	28
1.3.2. Méthodes de caractérisation des souches de <i>Campylobacter</i>	29
1.3.2.1. Biotypage	29
1.3.2.2. Tests sérologiques et typage phénotypique	31

1.3.2.3. Lysotypage	33
1.3.2.4. Profils de résistance aux antibiotiques	33
1.3.2.5. Typage moléculaire	34
1.3.2.6. Autres systèmes de typage	37
1.3.3. Variabilité génomique	39
2. LES <i>CAMPYLOBACTER</i> : UN PROBLEME DE SANTE PUBLIQUE	42
2.1. UN DANGER AVERE POUR L’HOMME	42
2.1.1. Importance : fréquence et répartition géographique	42
2.1.1.1. Dans le Monde et en Europe	42
2.1.1.2. En France	45
2.1.2. Espèces en cause	48
2.1.3. Population touchée et saisonnalité	50
2.1.3.1. Population touchée et sensibilité à l’infection	50
2.1.3.2. Saisonnalité	52
2.1.3.3. Mouvements de personnes : influence des voyages	53
2.1.4. Impact	54
2.2. ETUDE EPIDEMIO-CLINIQUE	55
2.2.1. Forme épidémiologique des campylobactérioses	55
2.2.2. Signes cliniques	56
2.2.2.1. Tableau et évolution clinique d’une campylobactériose digestive	56
2.2.2.2. Existence de complications rares mais graves	57
2.2.3. Diagnostic	59
2.2.4. Traitement et augmentation de la résistance aux antibiotiques	61
2.3. MODALITES DE TRANSMISSION A L’HOMME	62
2.3.1. Les principaux réservoirs	62
2.3.1.1. Le réservoir animal	63
2.3.1.2. Le réservoir hydrotellurique	63
2.3.1.3. Le réservoir humain	64
2.3.2. La transmission directe	64
2.3.3. La transmission par consommation d’aliments contaminés	65
2.3.4. Les modalités de contamination des aliments	67
2.3.5. Comportement de <i>Campylobacter</i> dans les aliments	68
2.3.6. Dose infectante et dose minimale infectieuse	70
2.4. STRATEGIES DE MAITRISE DE <i>CAMPYLOBACTER</i>	70
2.4.1. Survie et destruction de <i>Campylobacter</i> dans les aliments	71

2.4.1.1. La température	71
2.4.1.2. Traitements chimiques, désinfectants et atmosphères modifiées	72
2.4.1.3. Traitements ionisants et U.V.	72
2.4.1.4. Autres types de traitements	73
2.4.2. Prévention des contaminations	73
2.5. BILAN	74
2.5.1. Modèle épidémiologique des campylobactérioses humaines	74
2.5.2. Conclusion au profil de risque	76
3. EPIDEMIOLOGIE DE <i>CAMPYLOBACTER</i> CHEZ LE PORC	77
3.1. HISTORIQUE : DECOUVERTE DE <i>CAMPYLOBACTER</i> CHEZ LE PORC	77
3.2. STATUT DES ELEVAGES PORCINS VIS-A-VIS DES <i>CAMPYLOBACTER</i>	77
3.2.1. Description de la contamination des porcs par <i>Campylobacter</i> en élevage	77
3.2.1.1. Un portage sain	78
3.2.1.2. Un portage fréquent et une excrétion hétérogène	79
3.2.1.3. Un portage en <i>Campylobacter coli</i>	81
3.2.2. Epidémiologie analytique : transmission de <i>Campylobacter</i> en élevage	82
3.3. PREVALENCE DE <i>CAMPYLOBACTER</i> A L'ABATTOIR	83
3.4. LA VIANDE DE PORC COMME SOURCE POTENTIELLE D'INFECTIONS HUMAINES	86
3.4.1. Importance des campylobactérioses humaines d'origine porcine	86
3.4.2. Contamination de la viande de porc par <i>Campylobacter</i>	87
3.5 CONTEXTE REGLEMENTAIRE	90
4. PARTICULARITES DE L'ELEVAGE PORCIN EN FRANCE	92
4.1. ORGANISATION DE LA FILIERE PORCINE	92
4.2. ORGANISATION DE LA PRODUCTION PRIMAIRE	95
4.2.1. Structure pyramidale de la filiere de production des porcs charcutiers	95
4.2.2. Les différents types d'élevage	97
4.3. CONDUITE D'ELEVAGE EN PRODUCTION PORCINE	98
4.3.1. Principe de la conduite en bandes	99
4.3.2. Objectifs de la conduite en bandes	100
4.3.2.1. Objectifs organisationnels	100
4.3.2.2. Objectifs économiques	100
4.3.2.3. Objectifs sanitaires et zootechniques	101
4.3.3. Mise en œuvre de la conduite en bandes	102
4.3.4. Structure de contact entre animaux au sein de l'élevage	105

5. CONCLUSION ET OBJECTIFS DE LA THESE	107
CHAPITRE II : MISE AU POINT ET VALIDATION DES METHODES PCR	
1. CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE	110
2. LA PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL	114
2.1. PRINCIPE DE LA TECHNOLOGIE TAQMAN	114
2.2. PRINCIPE DE LA QUANTIFICATION ABSOLUE	116
2.3. CHOIX ET ETAPES POUR LA MISE AU POINT DES METHODES PCR	119
3. ARTICLE 1 : PCR en temps réel, quantification de <i>Campylobacter spp.</i> avec un témoin interne d'extraction et d'amplification	122
4. ARTICLE 2 : PCR en temps réel, différenciation et quantification de <i>C. coli</i> et <i>C. jejuni</i>	155
5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	184
CHAPITRE III : DESCRIPTION DE LA CINETIQUE D'EXCRETION DE <i>CAMPYLOBACTER</i> CHEZ DES PORCS EOPS EXPERIMENTALEMENT INFECTES	
1. CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE	187
2. ARTICLE 3 : Infection expérimentale de porcs EOPS	190
3. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	199
CHAPITRE IV : DESCRIPTION DE LA VARIABILITE GENETIQUE DES SOUCHES DE <i>CAMPYLOBACTER</i>	
1. CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE	205
2. LE TYPAGE MOLECULAIRE : DIFFERENTES METHODES	206
2.1. GENERALITES SUR LA CARACTERISATION BACTERIENNE	206
2.1.1. Objectifs de la caractérisation bactérienne	206
2.1.2. Paramètres d'évaluation des méthodes de typage	207
2.1.2.1. La typabilité	207
2.1.2.2. La reproductibilité	207
2.1.2.3. Le pouvoir discriminant	208
2.1.2.4. La stabilité	208
2.1.3. Analyse des résultats obtenus par le système de typage	209
2.2. CARACTERISATION FONDEE SUR LES CARACTERES PHENOTYPIQUES	211
2.3. CARACTERISATION FONDEE SUR LES CARACTERES GENOTYPIQUES	211
2.3.1. Marqueurs liés à l'ADN plasmidique	212
2.3.2. Marqueurs liés à l'ADN chromosomique	213

2.3.2.1. Polymorphisme révélé par restriction	214
2.3.2.2. Polymorphisme révélé par amplification	219
2.3.3. Marqueurs liés à des gènes ou à des parties de gènes	221
2.3.3.1. Polymorphisme révélé par restriction	221
2.3.3.2. Polymorphisme révélé par amplification : cas de la ribotypie par PCR	225
2.4. CONCLUSION ET CHOIX DES METHODES DE TYPAGE	226
3. ARTICLE 4 : Etude de la variabilité génomique de <i>Campylobacter in vivo</i> lors d'une infection expérimentale de porcs EOPS	228
4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	251
CHAPITRE V : INFECTION DES PORCS ET CONTAMINATION DE LEUR ENVIRONNEMENT PAR <i>CAMPYLOBACTER</i> EN ELEVAGE NAISSEUR-ENGRAISSEUR	
1. CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE	254
2. MATERIELS ET METHODES	256
2.1. CHOIX DES ELEVAGES ET SUIVI DES ANIMAUX	256
2.2. REALISATION ET ORGANISATION DES PRELEVEMENTS	258
2.2.1. Planification des prélèvements	258
2.2.2. Prélèvements individuels de matières fécales	259
2.2.3. Prélèvements environnementaux	259
2.2.4. Prélèvements des aliments, de l'eau et autres prélèvements éventuels	259
2.3. ANALYSES	260
2.3.1. Analyse bactériologique (Elevage I)	260
2.3.1.1. Lecture et détection	262
2.3.1.2. Dénombrement	262
2.3.1.3. Enrichissement	263
2.3.1.4. Isolement et conservation	264
2.3.2. Analyse moléculaire par PCR quantitative en temps réel	264
2.3.3. Exploitation des données	265
2.3.4. Analyse statistique	266
3. RESULTATS	267
3.1. CONDUITE D'ELEVAGE ET SUIVI DES ANIMAUX INCLUS DANS L'ETUDE	267
3.1.1. Description des élevages	267
3.1.2. Pratiques d'élevage et hygiène	268
3.1.3. Suivi des animaux inclus dans l'étude	270

3.1.3.1. Description pour l'élevage I	270
3.1.3.2. Description pour l'élevage II	275
3.2. DESCRIPTION DE L'EXCRETION DE <i>CAMPYLOBACTER</i> CHEZ LES TRUIES	279
3.3. DESCRIPTION DE L'EXCRETION DE <i>CAMPYLOBACTER</i> CHEZ LES PORCELETS	280
3.3.1. Prévalence de l'infection et évolution de l'excrétion au cours du temps	280
3.3.2. Effet « date de prélèvement » sur l'excrétion fécale	283
3.3.3. Effet « portée » et « case » sur l'excrétion fécale	284
3.3.4. Santé du porcelet et excrétion fécale de <i>Campylobacter</i>	285
3.4. CONTAMINATION DE L'ENVIRONNEMENT, DES ALIMENTS ET DE L'EAU	286
3.4.1. Eau et aliments	286
3.4.2. Prélèvements environnementaux	287
3.5. IDENTIFICATION DES ESPECES DE <i>CAMPYLOBACTER</i> EXCRETEES	293
4. DISCUSSION	294
5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	299
CHAPITRE VI : CONCLUSION – PERSPECTIVES	306
BIBLIOGRAPHIE	312

LISTE DES ABREVIATIONS

- **ADN** : Acide DésoxyriboNucléique
- **AFSSA** : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
- **AFLP** : Amplified Fragment Length Polymorphism
- **ARN** : Acide RiboNucléique
- **ARNr** : Acide RiboNucléique ribosomal
- **C.** : *Campylobacter*
- **C. jejuni** : *Campylobacter jejuni*
- **C. coli** : *Campylobacter coli*
- **CDCP** : Center for Disease Control and Prevention
- **CNRCH** : Centre National de Référence des *Campylobacter* et des *Helicobacter*
- **Ct** : Cycle Treshold = cycle seuil
- **DNTPs** : DésoxyNucléotides
- **EFSA** : Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
- **EOPS** : Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiques
- **ERIC-PCR** : Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - Polymerase Chain Reaction
- **FAO** : Food and Agriculture Organization
- **HACCP** : Hazard Analysis Critical Control Point
- **InVS** : Institut national de Veille Sanitaire
- **MLST** : Multi Locus Sequence Typing
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- **PCR** : Polymerase Chain Reaction
- **PFGE** : Pulse Field Gel Electrophoresis
- **RAPD** : Random Amplified Polymorphic DNA
- **RFLP** : Restriction Fragment Length Polymorphism
- **SGB** : Syndrome de Guillain Barré
- **SHU** : Syndrome Hémolytique et Urémique
- **SNP** : Single Nucleotide Polymorphism
- **TIA** : Toxi-Infection Alimentaire
- **TIAC** : Toxi-Infection Alimentaire Collective
- **UFC** : Unité Formant Colonie
- **UFC/g MF** : Unité Formant Colonie par gramme de Matière Fécale
- **VBNC** : Viable But Not Culturable (Viabiles Non Cultivables)

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I

Tableau 1 :	Présentation du phylum des <i>Protéobactéries</i> . Genres et Espèces actuellement rattachées à la classe des <i>Epsilon-Proteobacteria</i> . Source : Euzéby J.P., 2005	2
Tableau 2 :	Récapitulatif des conditions de croissance optimale des <i>Campylobacter</i> thermotolérants	13
Tableau 3 :	Résistances naturelles des <i>Campylobacter</i> aux antibiotiques	17
Tableau 4 :	Pouvoir pathogène des différentes espèces de <i>Campylobacter</i> chez l'Homme et chez l'animal. Source : Euzéby J.P., 2005	19
Tableau 5 :	Résultats des tests biochimiques d'identification pour chaque espèce de <i>Campylobacter</i> . Source : Euzéby J.P., 2005	26
Tableau 6 :	Tests biochimiques utilisés pour l'identification des 4 espèces de <i>Campylobacter</i> thermotolérants (norme NF ISO 10272)	27
Tableau 7 :	Schéma de biotypage pour <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> et <i>C. lari</i> selon Lior (1984)	29
Tableau 8 :	Méthodes de typage moléculaire de <i>C. jejuni</i> et <i>C. coli</i> . Source : AFSSA, 2004	37
Tableau 9 :	Cas rapportés de campylobactérioses chez l'Homme en Europe entre 2002 et 2006 ; nombre de cas rapportés, nombre de cas confirmés et incidence pour les cas confirmés en 2006, en Europe. Source : EFSA, 2007	43
Tableau 10 :	Importance des campylobactérioses dans le monde occidental : estimation du total des cas de campylobactérioses par an dans 3 pays occidentaux	45
Tableau 11 :	Fréquence et répartition des espèces de <i>Campylobacter</i> et bactéries apparentées identifiées au Centre National de Référence par type de prélèvements, France, 2006. Source : King <i>et al.</i> , 2008	49
Tableau 12 :	Quelques méthodes rapides de détection de <i>Campylobacter</i> Source : Seafood Network Information Center, 2006	60
Tableau 13 :	Facteurs de risque associés à une entérite à <i>Campylobacter</i> dans 12 études cas témoins dans différents pays	66
Tableau 14 :	Facteurs influençant la survie des <i>Campylobacter</i> dans les aliments. Source : AFSSA, 2004	69
Tableau 15 :	Prévalence des <i>Campylobacter</i> thermotolérants chez le porc. Source : EFSA, 2007	79

Tableau 16 :	Description de la contamination des porcs par <i>Campylobacter</i> en élevage	80
Tableau 17 :	Description de la contamination des porcs par <i>Campylobacter</i> à l'abattoir	84
Tableau 18 :	Données concernant le nombre d'échantillons positifs pour <i>Campylobacter</i> dans la viande fraîche de porc lors de la vente au détail. Source : EFSA, 2007	89

CHAPITRE V

Tableau 1 :	Présentation des différents résultats possibles après l'analyse bactériologique des prélèvements et de leurs dénominations	265
Tableau 2 :	Différents types d'aliments donnés aux animaux en fonction de leur stade de croissance ou de leur stade physiologique	268
Tableau 3 :	Identité et âge des truies de l'élevage I incluses dans l'étude	270
Tableau 4 :	Identité et âge des truies de l'élevage II incluses dans l'étude	275
Tableau 5 :	Excrétion fécale de <i>Campylobacter</i> par les truies au cours du cycle de production (13 et 17 prélèvements pour l'élevage I et II respectivement)	279
Tableau 6 :	Valeurs moyennes d'excrétion, valeurs maximales et minimales pour chaque prélèvement (élevage I)	282
Tableau 7 :	Comparaison du niveau d'excrétion des différents groupes d'animaux en maternité à une visite donnée par analyse de variance et mise en évidence d'un « effet portée » au cours du sevrage pour l'élevage II	285
Tableau 8 :	Exemple de prélèvements retrouvés positifs dans l'auge pour l'élevage I	286
Tableau 9 :	Contamination de l'environnement des truies pour l'élevage I en log UFC de <i>Campylobacter</i> / m ²	287
Tableau 10 :	Contamination de l'environnement des porcelets et des truies en maternité en log UFC de <i>Campylobacter</i> / m ²	288
Tableau 11 :	Contamination de l'environnement des porcelets en post sevrage en log UFC de <i>Campylobacter</i> / m ²	289
Tableau 12 :	Contamination de l'environnement des porcelets en pré-engraissement et en engraissement en log UFC de <i>Campylobacter</i> / m ²	290

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I

Figure 1 :	Microphotographie de <i>C. jejuni</i> - microscopie électronique. Grossissement x 4000 et Grossissement x 10^5 . Source : UMR-INRA Secalim	7
Figure 2 :	<i>C. jejuni</i> - microscopie à transmission. Grossissement x 10^5 . Source : Benjamin Fry	8
Figure 3 :	<i>C. jejuni</i> - microscopie à balayage. Grossissement x 10^5 . Source : US Department of Agriculture	8
Figure 4 :	Schéma d'un flagelle de <i>Campylobacter</i> d'après Karlyshev. Source : Karlyshev <i>et al.</i> , 2005	9
Figure 5 :	Etapes de la pathogénie de <i>C. jejuni</i> . Source : Snelling <i>et al.</i> , 2005	20
Figure 6 :	Nombre d'isolements de <i>Campylobacter</i> par département en France en 2005 Source : Gallay <i>et al.</i> , 2007a	46
Figure 7 :	Réseau de surveillance des infections humaines à <i>Campylobacter</i> en France. Source : Gallay <i>et al.</i> , 2003	48
Figure 8a :	Fréquence des isolements de <i>Campylobacter</i> selon l'âge et le sexe en France en 2007. Source : King <i>et al.</i> , 2008	51
Figure 8b :	Incidence de <i>Campylobacter</i> selon les catégories d'âge en Europe en 2006. Source : EFSA, 2007	51
Figure 9a:	Nombre d'isolements de <i>Campylobacter</i> selon le mois de prélèvement de l'échantillon biologique et l'espèce, France, 2006. Source : Espié <i>et al.</i> , 2007	52
Figure 9b:	Nombre d'isolements de <i>Campylobacter</i> selon le mois de prélèvement de l'échantillon biologique et l'espèce, France, 2007. Source : King <i>et al.</i> , 2008	53
Figure 10:	Tableau et évolution clinique d'une campylobactériose digestive	56
Figure 11:	Résistance à l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine des <i>C. jejuni</i> et <i>C. coli</i> isolés chez l'Homme en France entre 1986 et 2007. Source : King <i>et al.</i> , 2008	62
Figure 12:	Modèle épidémiologique éco-environnemental de la campylobactériose humaine. Source : Skelly et Weinstein, 2003	75

Figure 13 :	Evolution des proportions d'échantillons de viande fraîche positifs à <i>Campylobacter</i> thermotolérant tout au long du procédé d'abattage pour différents types d'animaux. Données rapportées par les Etats Membres de l'Union Européenne en 2005. Source : EFSA, 2006	88
Figure 14 :	Schéma simplifié des étages successifs de la filière de viande porcine et de produits porcins. Source : Lurette, 2007	34
Figure 15 :	Structure pyramidale des élevages porcins et schéma des flux d'animaux entre troupeaux aux élevages de sélection, de multiplication et de production. Source : Lurette, 2007	92
Figure 16 :	Schéma des flux d'animaux planifiés ou non au sein d'un troupeau naisseur-engraisseur avec une conduite en bandes à 3 semaines	96
Figure 17 :	Cycle de reproduction de la truie (ISO : intervalle sevrage-oestrus)	99
Figure 18 :	Schéma de la planification hebdomadaire des évènements principaux de conduite de reproduction des truies dans le cas d'une conduite en bandes avec un intervalle de trois semaines entre bandes. Source : Lurette, 2007	104

CHAPITRE II

Figure 1 :	Principe de la technologie TaqMan : Utilisation de sondes d'hydrolyse type Taqman®	115
Figure 2 :	Courbe de fluorescence – Définition des termes usuels	116
Figure 3 :	Courbe d'amplification : variations de la fluorescence en fonction du nombre de cycles d'amplification pour la gamme étalon d'ADN chromosomique de la souche <i>C. coli CIP 7080</i>	117
Figure 4 :	Réalisation d'une gamme standard à partir de dilutions sériées d'ADN Courbe d'amplification et droite standard associée. Source : Applied Biosystems, 2007	117
Figure 5 :	Evaluation de l'efficacité de la PCR quantitative en temps réel : réalisation d'une gamme d'ADN sériée et calcul de la pente de la droite standard. Source : Applied Biosystems, 2007	118

CHAPITRE V

Figure 1a :	Planification des prélèvements (élevage I)	258
Figure 1b :	Planification des prélèvements (élevage II)	258
Figure 2 :	Représentation schématique du protocole mis en œuvre dans l'analyse des prélèvements	261
Figure 3 :	Disque de comptage utilisé pour les boîtes de Karmaliensemencées en spirale	263
Figure 4 :	Parcours des truies et des porcelets au cours de l'étude (élevage I)	271
Figure 5 :	Localisation des truies dans les différentes salles au cours de l'étude (élevage I)	272
Figure 6 :	Emplacement des porcelets en post sevrage (élevage I)	273
Figure 7 :	Emplacement des porcelets en pré-engraissement (élevage I)	274
Figure 8 :	Emplacement des porcelets en engraissement (élevage I)	275
Figure 9 :	Localisation des truies dans les différentes salles au cours de l'étude (élevage II)	276
Figure 10:	Emplacement des porcelets lors du post-sevrage (élevage II)	277
Figure 11:	Emplacement des porcelets en pré-engraissement et en engraissement (élevage II)	278
Figure 12:	Evolution du nombre de porcelets contaminés, excréant <i>Campylobacter</i> , au cours d'un cycle de production (résultats combinés de l'analyse bactériologique et de l'analyse moléculaire pour l'élevage I)	280
Figure 13 :	Représentation graphique de l'excrétion fécale de quelques porcelets (élevage II)	281
Figure 14 :	Evolution de l'excrétion moyenne des porcelets au cours de la production et représentation des quantités excrétées par porcelet	283
Figure 15 :	Contamination des parois et des sols des cases en fonction de l'excrétion moyenne des porcs qui s'y trouvent pour l'élevage I	291
Figure 16 :	Contamination des parois et des sols des cases en fonction de l'excrétion moyenne des porcs qui s'y trouvent pour l'élevage II	292

LISTE DES ANNEXES

CHAPITRE II

Annexe 1 :	Caractéristiques culturales et biochimiques des principales espèces de <i>Campylobacter spp.</i> thermotolérants d'intérêt en sécurité des aliments	185
Annexe 2 :	Systèmes de détection des produits PCR lors d'une PCR quantitative en temps réel	186

CHAPITRE V

Annexe 1 :	Planification des visites et des différents prélèvements pour l'élevage I	300
Annexe 2 :	Planification des visites et des différents prélèvements pour l'élevage II	301
Annexe 3 :	Composition des principaux milieux de récupération, d'enrichissement ou de sélection utilisés pour la détection des <i>Campylobacter spp.</i>	302
Annexe 4 :	Protocole d'extraction d'ADN à partir des différents prélèvements	303
Annexe 5 :	Excrétion fécale de <i>Campylobacter</i> en log (UFC/g MF) par les porcelets pour l'élevage I	304
Annexe 6 :	Excrétion fécale de <i>Campylobacter</i> en log (UFC/g MF) par les porcelets pour l'élevage II	305

CHAPITRE I :

INTRODUCTION GENERALE

Dans le domaine de l'hygiène des aliments, *Campylobacter* thermotolérant est un danger émergent dont l'importance s'accroît au fil des années. L'augmentation des cas de campylobactérioses, l'existence de complications rares mais graves telles que le Syndrome de Guillain-Barré, et l'inquiétante augmentation des résistances de *Campylobacter spp.* à certains antibiotiques, expliquent l'intérêt porté à ce genre bactérien. Ainsi ce problème de santé publique fait désormais l'objet d'une surveillance renforcée au niveau national, européen et mondial. Deux espèces thermotolérantes *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) et *Campylobacter coli* (*C. coli*) (respectivement impliquées (i) dans 80-90% et 5-10% des cas selon Weber *et al.*, 2003 et (ii) dans 76% et 17% des cas selon Gallay *et al.*, 2007a) ainsi que *Campylobacter fetus* (*C. fetus*) (5% des cas, Gallay *et al.*, 2007a) sont décrites comme étant responsables des troubles de santé observés chez l'Homme.

L'épidémiologie des *Campylobacter* thermotolérants reste à l'heure actuelle mal connue. La fréquence élevée du portage sain chez les animaux d'élevage ou sauvage (mammifères et oiseaux) constitue un véritable danger. Bien que le réservoir animal soit le plus important à considérer, le réservoir hydrotellurique n'est pas à négliger puisque *Campylobacter* est fréquemment isolé dans l'environnement et notamment dans l'eau (Savill *et al.*, 2001 ; Hänninen *et al.*, 2003). La consommation d'aliments contaminés (80% des cas, Mead *et al.*, 1999), est identifiée comme la principale voie de contamination de l'Homme. Cependant la connaissance de la contribution relative de chacune de ces sources potentielles de contamination pour l'Homme reste encore partiellement inconnue et de nombreuses recherches sont en cours. Contrairement à la filière avicole, la filière porcine a fait l'objet de peu d'investigations pour le moment alors que la viande de porc est l'une des viandes les plus consommées et produites en France. De plus, les produits de charcuterie à risque car consommés crus ou peu cuits sont de plus en plus prisés. Des informations complémentaires sont indispensables afin d'évaluer les modalités de transmission des *Campylobacter* et d'établir un statut de dangerosité pour la filière porcine.

Cette étude bibliographique sur les *Campylobacter* thermotolérants présente ces bactéries, particulièrement exigeantes pour leur culture, ainsi que les méthodes actuelles validées pour leur caractérisation. Après avoir souligné l'importance préoccupante de ce danger émergent en santé publique, nous ferons le point sur l'état actuel des connaissances concernant l'épidémiologie des *Campylobacter* thermotolérants en élevage porcin et à l'abattoir. Enfin, après avoir présenté le contexte réglementaire, il sera intéressant de connaître les particularités de l'élevage porcin en France qui constitue notre modèle d'étude.

PHYLUM DES *PROTEOBACTERIA*

5 classes (définies suite à la comparaison des séquences ARNr 16S)

<i>Alpha-proteobacteria</i>	<i>Beta-proteobacteria</i>	<i>Epsilon-proteobacteria</i>
<i>Gamma-proteobacteria</i>	<i>Delta-proteobacteria</i>	

Superfamille VI de bacilles à gram négatif : Les *Epsilon-Proteobacteria*

(bâtonnets minces, gram négatifs, qui peuvent être droits, incurvés ou hélicoïdaux)

Ordre des <i>Campylobacterales</i>					
Famille des <i>Campylobacteraceae</i>			Famille des <i>Helicobacteraceae</i>		Famille des <i>Hydrogenimonadaceae</i>
Genre <i>Campylobacter</i> Pathogène	Genre <i>Arcobacter</i> Pathogène	Genre <i>Sulfurospirillum</i> Non pathogène	Genre <i>Helicobacter</i> Pathogène	4 Genres Non pathogène	1 seule Espèce : Non pathogène
17 Espèces : <i>C. coli</i> <i>C. concisus</i> <i>C. curvus</i> <i>C. fetus</i> (subsp. <i>fetus</i> et subsp. <i>venerealis</i>) <i>C. gracilis</i> <i>C. helveticus</i> <i>C. hominis</i> <i>C. hyointestinalis</i> (subsp. <i>hyointestinalis</i> et subsp. <i>lawsonii</i>) <i>C. insulaenigrae</i> <i>C. jejuni</i> (subsp. <i>doylei</i> et subsp. <i>jejuni</i>) <i>C. lanienae</i> <i>C. lari</i> <i>C. mucosalis</i> <i>C. rectus</i> <i>C. showae</i> <i>C. sputorum</i> (subsp. <i>bubulus</i> et subsp. <i>sputorum</i>) <i>C. upsaliensis</i>	5 Espèces : <i>A. nitrofigilis</i> <i>A. cryaerophilus</i> <i>A. butzleri</i> <i>A. skirrowii</i> <i>A. cibarius</i>	4 Espèces: <i>S. deleyianum</i> <i>S. arcachonense</i> <i>S. arsenophilum</i> <i>S. barnesii</i>	29 Espèces, parmi lesquelles: <i>H. acinonychis</i> <i>H. bilis</i> <i>H. bizzozeronii</i> <i>H. canis</i> <i>H. cholecystus</i> <i>H. cinaedi</i> <i>H. felis</i> <i>H. fennelliae</i> <i>H. heilmannii</i> <i>H. hepaticus</i> <i>H. muridarum</i> <i>H. mustelae</i> <i>H. nemestrinae</i> <i>H. pametensis</i> <i>H. pullorum</i> <i>H. pylori</i> <i>H. rodentium</i> <i>H. salomonis</i> <i>H. trogontum</i>	peu d'intérêt en médecine vétérinaire <i>Wolinella</i> Espèce : <i>Wolinella succinogenes</i> <i>Sulfurimonas</i> Espèce : <i>Sulfurimonas autotrophica</i> <i>Sulfurovum</i> Espèce : <i>Sulfurovum lithotrophicum</i> <i>Thiovulum</i> Espèce : <i>Thiovulum majus</i>	<i>Hydrogenimonas thermophila</i>

Tableau 1 : Présentation du Phylum des *Protéobactéries*.

Genres et Espèces actuellement rattachés à la classe des *Epsilon-Proteobacteria*.

Source : Euzéby J.P., 2005

1. ETUDE SYNTHETIQUE DES *CAMPYLOBACTER*

1.1. GENERALITES

1.1.1. HISTORIQUE

Campylobacter est aujourd'hui connu comme l'un des principaux responsables de Toxi Infection Alimentaire (TIA) dans les pays développés. Néanmoins, il a d'abord été associé à des problèmes de santé animale mais il a probablement été responsable d'un grand nombre d'infection chez l'animal et chez l'Homme pendant des siècles. Il faudra attendre le milieu des années quarante pour avoir les premières descriptions fiables de cas humains (Doyle, 1981). Toutefois, en 1886, en Allemagne, une série d'articles écrits par le pédiatre et bactériologiste Théodore Escherich dans le *Münchener Medizinische Wochenschrift* décrivait des bactéries spiralées présentes dans des selles d'enfants diarrhéiques (bactéries présentes dans les colons de 35 enfants morts de ce qu'il a appelé le « cholera infantum ») (Kist, 1983).

Par la suite, les vétérinaires furent les premiers à s'intéresser à *Campylobacter* du fait de son rôle pathogène chez les animaux (problèmes d'avortements et d'épisodes diarrhéiques), en particulier chez les bovins et les ovins. Les *Campylobacter* ont été isolés pour la première fois en 1909, par Mac Fadyean et Stockman, suite à un avortement épizootique chez des brebis (Butzler, 2004) mais jusqu'au début des années 60, ils ont été assimilés aux *Vibrio*, et considérés comme non pathogènes pour l'Homme. Ces micro-organismes se différenciaient cependant des véritables vibrions par leur caractère micro-aérophile. Smith et Taylor, en 1919, baptisent cette nouvelle espèce issue du produit d'avortement d'ovins *Vibrio fetus* (Doyle, 1981). *Vibrio jejuni* a été décrit en 1931 dans des matières fécales de bovins (Jones *et al.*, 1931) et *Vibrio coli*, en 1944, dans des matières fécales de porcs (Doyle, 1944).

Leur probable implication dans une maladie infectieuse d'origine alimentaire est établie en 1946 lorsque Lévy relate un foyer de gastro-entérite aiguë dans deux établissements pénitentiaires voisins en mai 1938 dans l'Illinois (Etats-Unis) dû à la consommation de lait et affectant 357 détenus sur 6019. Il rapporte que des micro-organismes semblables à *Vibrio jejuni* sont retrouvés (i) dans les hémocultures de 13 victimes sur les 73 examinées, (ii) dans

20% des prélèvements fécaux et (iii) dans le lait distribué aux prisonniers (Lévy *et al.*, 1946). La distribution, par erreur, de lait cru à la place du lait pasteurisé habituel serait à l'origine de l'accident (Doyle, 1981). Il s'agit vraisemblablement de la première description de campylobactériose digestive d'origine alimentaire.

En 1947, en France, Vinzent et son équipe isolent *Vibrio fetus* à partir du sang de trois femmes enceintes admises à l'hôpital en raison de fièvres d'origine inconnue (Vinzent *et al.*, 1947). La maladie dure environ quatre semaines, deux femmes font une fausse couche et, par la suite, des zones de nécrose et des zones inflammatoires sont décrites sur le placenta (Butzler, 2004). En 1957, King relate quelques cas humains d'entérites associées à des micro-organismes microaérophiles ayant des caractéristiques communes avec les agents décrits par Vinzent mais ayant des caractéristiques biochimiques et culturelles différentes, en particulier, leur température de culture qui est de 42°C et non de 25°C. Elisabeth King distingue alors deux groupes parmi tous les isollements qu'elle obtient : le premier correspond aux descriptions de *Vibrio fetus* de Vinzente *et al.* (1947) et contient les souches se cultivant à 25°C et 37°C mais pas à 42°C. Le second groupe, qualifié de « *related Vibrio* », est lui constitué par des espèces à tendance thermophile se cultivant bien à 37 °C et à 42°C, mais pas à 25°C. Ces derniers seraient identiques aux *Vibrio jejuni* et *Vibrio coli* précédemment décrits par Jones et Doyle (King, 1957).

En 1963, Sébald et Véron séparent ces bactéries du genre *Vibrio* et créent un nouveau genre : *Campylobacter* (du grec *Kampulos* : incurvé, et *Bacter* : bâtonnet), avec *C. fetus* comme espèce type, suite à une étude sur l'ADN (faible teneur en guanine et cytosine de l'ADN des *Campylobacter*) et sur le métabolisme de ces bactéries (germes microaérophiles et absence de métabolisme fermentatif des sucres) (Sébald et Véron, 1963).

Dans les années 70, le développement de techniques permettant une identification plus aisée des *Campylobacter* a permis de souligner leur rôle dans les maladies diarrhéiques. Butzler, en utilisant une méthode de filtration différentielle des suspensions fécales, a montré leur importance comme source de gastro-entérites humaines (Butzler *et al.*, 1973) et les travaux de Skirrow, qui a mis au point un milieu sélectif d'isolement, ont confirmé les résultats précédents (Skirrow, 1977). En 1979, Butzler et Skirrow publient une description commune et systématique de l'entérite due à *Campylobacter* chez l'Homme.

En 1973, Véron et Chatelain proposent une classification du genre *Campylobacter* avec *Vibrio fetus* sous-espèce *intestinalis*, mentionnée par Florent en 1953, comme espèce type devenant *Campylobacter fetus* sous-espèce *fetus*. Les « *related Vibrio* » décrits par King deviennent *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli* (Smibert, 1984). Dans la huitième édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, le genre *Campylobacter* appartient au groupe des bactéries aérobies, microaérophiles, mobiles, de forme hélicoïdale à coloration de Gram négative (Smibert, 1984). Ensuite, dans les années 80, de nouvelles espèces ont été isolées chez l'Homme et l'animal comme par exemple *Campylobacter concisus* (cavité buccale humaine) ou *Campylobacter cryophila*, futur *Arcobacter* (Vandamme, 2000).

1.1.2. TAXONOMIE- PHYLOGENIE

Le genre *Campylobacter* fait partie, avec les genres *Arcobacter* et *Sulfurospirillum*, de la famille des *Campylobacteraceae*, réunis avec les familles des *Helicobacteraceae* et *Hydrogenimonadaceae* au sein de l'ordre des *Campylobacterales*, de la classe des *Epsilonproteobacteria*, du phylum des *Proteobacteria*, dans le domaine des *Eubacteria* (Moore *et al.*, 2005). La branche Epsilon du phylum des *Proteobacteria* est aussi appelée « superfamille VI de bacilles à Gram négatif » (Vandamme *et al.*, 1991). Au sein de cette superfamille, l'ordre des *Campylobacterales* est défini sur la base des séquences d'ARNr *16S* et rassemble des procaryotes gram négatifs avec une morphologie en bâtonnets minces (droits, incurvés ou spiralés) et présentant une grande diversité métabolique et écologique avec de nombreuses espèces pathogènes pour l'Homme et les animaux.

La famille des *Campylobacteraceae* regroupe deux genres phylogénétiquement et morphologiquement proches : *Campylobacter* et *Arcobacter* (Vandamme et De Ley, 1991) ainsi que le genre *Sulfurospirillum* (Tableau 1). Leur proximité phylogénétique et leurs points communs sur le plan du pouvoir pathogène font que de nombreuses études sur les *Campylobacter* s'intéressent également aux *Arcobacter* (comme *A. butzleri*). De même, de nombreux travaux s'intéressent également aux *Helicobacter* (comme *H. pylori* ou *H. pullorum*) de la famille des *Helicobacteraceae*, relativement proches, avec le genre *Wolinella*, du genre *Campylobacter* et souvent désignés sous le terme de « bactéries apparentées aux *Campylobacter* » (pour exemple Gallay *et al.*, 2007a).

Actuellement, le genre *Campylobacter* rassemble une variété d'espèces très hétérogènes ayant des habitats diversifiés, tels que le tube digestif des animaux à sang chaud (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* ou *C. hyointestinalis*), la cavité buccale de l'Homme (*C. consisus*, *C. curvus* ou *C. showae*), ou la cavité préputiale des taureaux (*C. fetus* subsp. *venerealis* ou *C. sputorum* subsp. *bubulus*) (Tableau 1).

Les *Campylobacter* spp. sont des germes mésophiles, ils se développent tous à 37°C. Parmi les 17 espèces répertoriées aujourd'hui, la plupart sont qualifiées de thermotolérantes : elles ont en effet la particularité de pouvoir se développer également à 42°C. C'est à l'intérieur de ce groupe des thermotolérants que se trouvent quatre espèces d'intérêt majeur en santé publique : *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* et *C. upsaliensis*. *C. jejuni* et *C. coli* sont les deux espèces rencontrées le plus fréquemment en pathologie humaine (Skirrow et Blaser, 1995), suivies par *C. fetus* subsp. *fetus*, *Campylobacter* non-thermotolérant se développant à 25°C. *C. lari* et *C. upsaliensis* peuvent, elles aussi, causer des toxi-infections chez l'Homme, mais dans une moindre mesure. En général, l'expression *C. jejuni* désigne la plupart du temps *C. jejuni* subsp. *jejuni* car les auteurs ne font pas la distinction entre *C. jejuni* subsp. *doylei* et *C. jejuni* subsp. *jejuni* (absence de croissance à 42°C pour *C. jejuni* subsp. *doylei* entre autre), il en sera de même dans la suite de cette étude.

1.2. BACTERIOLOGIE

1.2.1. DESCRIPTION GENERALE DU GENRE

Les *Campylobacter* sont des bacilles fins (bâtonnets avec un diamètre de 0,2 à 0,3µm), à coloration de Gram négative. De longueur variable (0,5 à 8µm), ils peuvent être soit incurvés, soit en forme de S, en hélice ou en spirale (Figure 1). Les *Campylobacter* présentent une ou plusieurs ondulations et possèdent généralement un unique flagelle polaire, d'environ 20 nm de diamètre. Ils peuvent parfois avoir un flagelle à chaque pôle (amphitriche) (décrit dans les stades de pré-division) (Penner, 1988) (Figures 1 et 2). Néanmoins, *C. gracilis* est une espèce immobile et dépourvue de flagelles.

Cette structure confère à *Campylobacter* une grande mobilité, très caractéristique (dite en « vol de moucheron » ou en « tire-bouchon »), facilement observable au microscope et souvent utilisée comme élément d'identification et de diagnostic.

Les *Campylobacter* sont asporulés. Des travaux récents ont montré la présence d'une capsule et l'existence du locus correspondant chez certaines souches de *C. jejuni* (Karlyshev *et al.*, 2001). Le rôle exact n'est pas déterminé mais l'hypothèse de son implication dans la virulence et la survie de cette souche est à considérer (Bacon *et al.*, 2001 ; Dorell *et al.*, 2001).

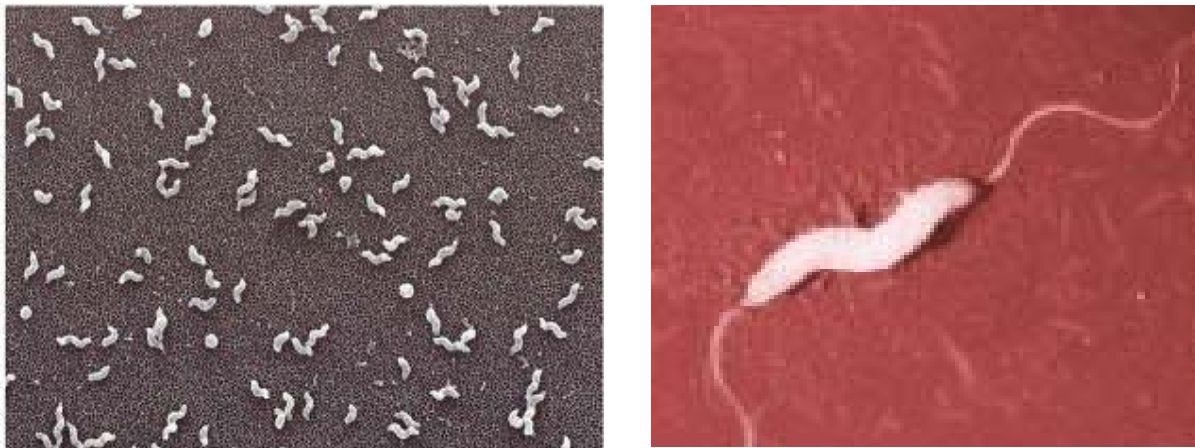


Figure 1 : Microphotographies de *C. jejuni* - microscopie électronique
Grossissement x 4000 et Grossissement x 10⁵
Source : UMR-INRA SECALIM

Après plusieurs jours de culture et/ou lorsque la température diminue, on observe des formes arrondies ou coccoïdes de 0,5µm de diamètre se colorant plus faiblement. Ces formes peuvent être assimilées (i) à des formes de dégénérescence impossibles à repiquer ou (ii) à des cellules viables mais ne pouvant être mises en culture (Takkinen *et al.*, 2003).

1.2.2. MORPHOLOGIE ET STRUCTURE

1.2.2.1. Enveloppes cellulaires et cytoplasme

Les enveloppes cellulaires de *Campylobacter spp.* sont caractéristiques d'une bactérie à coloration de Gram négative. Ces bactéries possèdent une paroi composée de la membrane

externe contenant en abondance le lipopolysaccharide (LPS) et d'une fine couche de peptidoglycane (région périplasmique) ainsi qu'une membrane interne cytoplasmique.

La membrane cellulaire externe, faiblement liée au peptidoglycane pariétal, a une structure ondulée en forme de vagues (Smibert, 1984). Elle contient 80% de glucose et comprend également, outre le LPS (composé abondant), des phospholipides, des glycolipides et des protéines. La surface des cellules de *C. jejuni* notamment a un aspect gaufré très caractéristique pouvant être observé au microscope électronique, au microscope à transmission ou au microscope à balayage (Figures 2 et 3).

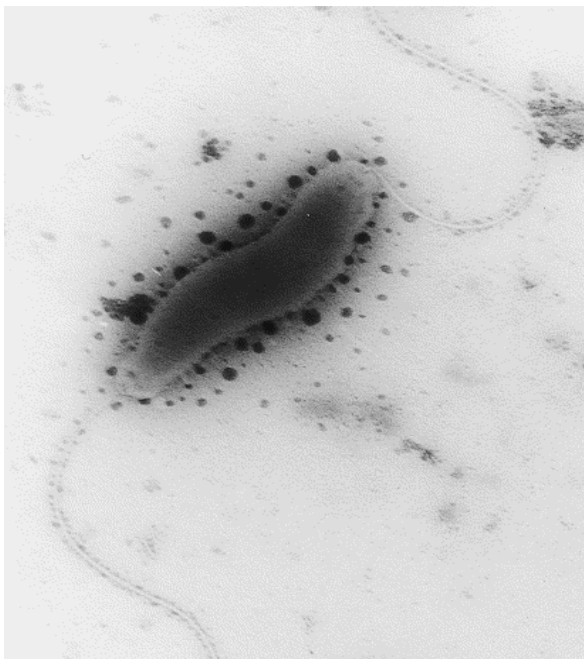


Figure 2 :
C. jejuni - microscopie à transmission
Grossissement $\times 10^5$
Source : Benjamin Fry



Figure 3 :
C. jejuni - microscopie électronique à balayage
Grossissement $\times 10^5$
Source : US Department of Agriculture

Le peptidoglycane pariétal a une composition classique avec de l'acide N-acétyl muramique, du N-acétyl-glucosamine, de l'alanine, de l'acide glutamique et de l'acide diamino-pimélique (Smibert, 1978).

Enfin, la membrane cytoplasmique présente une structure particulière : elle est épaissie et pluristratifiée dans les régions polaires aux deux extrémités de la cellule. En 1979,

l'étude de Pead en microscopie électronique a souligné la présence éventuelle dans le cytoplasme des *Campylobacter* de granules formés de phosphates inorganiques et d'inclusions en forme de disques (Pead, 1979).

1.2.2.2. Le flagelle de *Campylobacter*

Le flagelle de *Campylobacter* peut être décomposé en trois unités structurales : le corps basal ancré dans la membrane cytoplasmique, le crochet et le filament flagellaire, qui se trouvent tous les deux à la surface cellulaire (Figure 4).

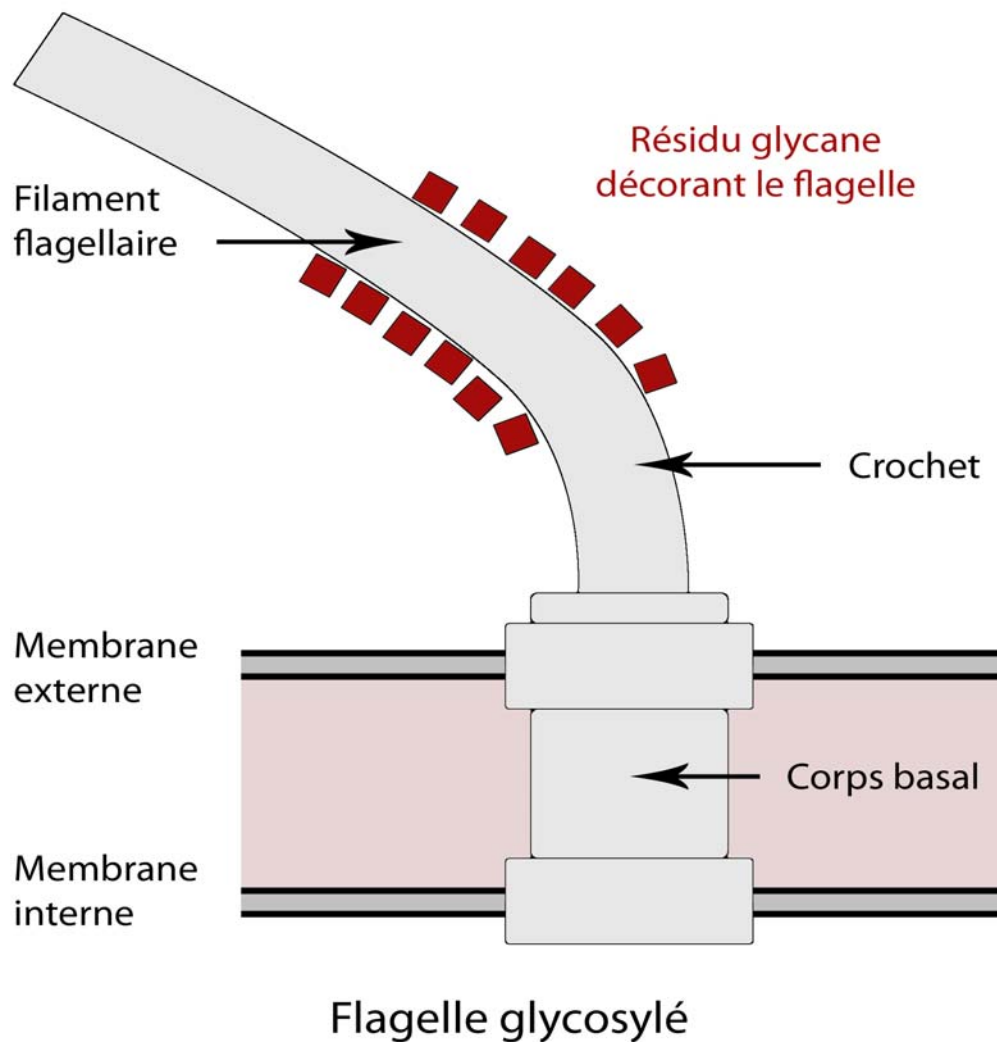


Figure 4 : Schéma d'un flagelle de *Campylobacter*
Source : Karlyshev *et al.*, 2005

Le filament flagellaire épais (20 nm) est complexe et constitué de deux sous unités protéiques apparentées (FlaA et FlaB), et non d'une flagelline unique comme chez la plupart des espèces bactériennes. Les flagellines FlaA et FlaB sont codées par des gènes dupliqués (*flaA* et *flaB*) possédant des séquences très proches (au moins 93% d'homologie), adjacents sur le chromosome mais régulés par des promoteurs distincts. Ce système de gènes dupliqués, orientés en tandem, est habituellement rapidement éliminé chez les bactéries par des réarrangements inter-génomiques et les raisons pour lesquelles les *Campylobacter* maintiennent ces deux gènes fortement apparentés sont spéculatives. L'expression des deux flagellines semble être nécessaire pour la motilité maximale (Alm *et al.*, 1993a). Le maintien de ces deux gènes flagellaires peut également être expliqué par la régulation des deux gènes par des promoteurs différents (Alm *et al.*, 1993b). En outre, *flaB* possède un promoteur régulé par l'environnement et les états de croissance, et il semble capable de servir de « copie de secours » de gène de flagelline (Guerry *et al.*, 2002 ; Hendrixson et DiRita, 2003).

Cependant, des souches peuvent présenter une variation phénotypique réversible entre forme flagellée et aflagellée. Cette propriété décrite par Caldwell *et al.* (1985) est appelée variation de phase et son expression semble être dépendante de l'environnement. Hendrixson (2006) rappelle que, chez les bactéries, la variation de phase est un mécanisme de modification de l'expression des gènes ou de la production de protéines par l'intermédiaire du changement réversible aléatoire de la longueur de séquences courtes d'ADN.

La fonction principale du flagelle est d'assurer une certaine mobilité à la bactérie (Ketley, 1997). Cependant, différentes études ont souligné son rôle dans l'adhésion et la colonisation du tractus digestif de l'Homme et des animaux (Fauchère *et al.*, 1989 ; Pavloskis *et al.*, 1991 ; Nachamkin *et al.*, 1993 ; Ketley *et al.*, 1997).

1.2.2.3. Génome de *Campylobacter* : chromosome et plasmides

C. jejuni NCTC 11168 est la première souche de *C. jejuni* à avoir été séquencée (Parkhill *et al.*, 2000). Elle possède un unique chromosome circulaire de petite taille (de l'ordre de 1,641 Mb comparativement au génome d'*Escherichia coli* de 4,55 Mb) (Taylor *et al.*, 1992 ; Kim *et al.*, 1992). Pour la plupart des espèces de *Campylobacter*, le contenu de l'ADN en GC (guanine, cytosine) est de 30 à 36%, bien que, pour le genre dans son ensemble, il varie de 29 à 47% (Vandamme *et al.*, 1991). La petite taille du génome est peut

être reflétée dans des caractères particuliers de *Campylobacter* tels que le caractère fastidieux lors de la culture et le besoin de milieu supplémenté, l'incapacité à fermenter les hydrates de carbone ou à dégrader des substances complexes, l'absence d'activité de lipase ou de lécithinase, l'absence de croissance au dessous de pH 4,9 et la relative inertie biochimique.

Fouts *et al.*, en 2005, ont présenté les caractéristiques des génomes de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* et *Campylobacter upsaliensis*. Le génome de *C. upsaliensis* ATCC 43954, avec une taille supérieure à 3 Mb, est considérablement plus grand que celui des autres *Campylobacter* et cette différence pourrait être due à la présence de duplications chromosomiques (Bourke *et al.*, 1995). L'étude et le séquençage d'autres souches de *Campylobacter* nous permettent ainsi de mieux comprendre le fonctionnement de cette bactérie (Pearson *et al.*, 2007 ; Miller *et al.*, 2008).

Concernant *C. jejuni* NCTC 11168, son génome contient peu de GC (G+C = 30,6%) mais il possède un pourcentage extrêmement élevé de séquences programmées de protéines (Parkhill *et al.*, 2000) puisqu'il est en effet censé coder 1 654 protéines. Les séquences codantes identifiées font en moyenne 948 pb et représentent 94,3% du génome total, ce qui fait du génome de *C. jejuni* le plus dense des génomes jamais séquencés. Pour le moment, une fonction a pu être prédite pour 80% de ces 1 654 protéines potentielles (Barloy-Hubler 2007). De plus, ce génome est original : il possède très peu de séquences d'insertion ou de séquences d'origine phagique et seulement quatre séquences d'ADN sont répétées dans tout le génome. En revanche, on note la présence de régions hypervariables, généralement au niveau des gènes codant pour des enzymes de biosynthèse ou impliquant une modification de structure de la membrane externe de la bactérie. Le taux élevé de variation des séquences hypervariables pourrait expliquer comment des caractères génétiques sont modifiés dans des populations de *C. jejuni* et comment le micro-organisme peut survivre à des conditions environnementales changeantes (Hook, 2005).

Les cartes génomiques de plusieurs souches de *C. coli* et de *C. jejuni* ont été établies en utilisant la macrorestriction suivie d'une électrophorèse en champs pulsés et des sondes d'ADN homologue ou hétérologue. Taylor *et al.* (1992) ont ainsi mis en évidence la présence de trois copies des gènes ARNr 16S et ARNr 23S pour les génomes de *C. jejuni* UA581 et de *C. coli* UA417. Newham *et al.*, en 1996, ont confirmé cette observation pour la souche *C. jejuni* UA580 et ils ont également observé la présence de trois copies du gène ARNr 5S.

Différentes études soulignent que la localisation de ces gènes sur le chromosome de *Campylobacter* n'est pas conservée au sein de l'espèce, par exemple les trois copies de chacun des gènes peuvent être voisines l'une de l'autre ou adjacentes et les différents loci des ARNr peuvent être ou non contigus (Taylor *et al.*, 1992 ; Kim *et al.*, 1993 ; Newham *et al.*, 1996). En revanche, ces auteurs ont pu constater que les positions relatives des gènes *flaA* vis à vis des copies du gène *16S* ARNr sont relativement conservées au sein d'une même espèce. La variabilité des localisations des gènes sur le chromosome d'une souche à l'autre peut s'expliquer par des réarrangements génomiques entraînés par exemple par la transformation naturelle (Chapitre I, Paragraphe 1.3.3. Variabilité génomique).

1.2.3. FACTEURS DE DEVELOPPEMENT IN VITRO

La culture de *Campylobacter spp.* est longue, difficile et exigeante (On, 2001).

Quelques particularités sont à souligner :

- ✓ Atmosphère de croissance : microaérophilie, capnophilie

Les *Campylobacter* nécessitent pour leur culture une atmosphère appauvrie en O₂ (microaérophile) et enrichie en CO₂ (capnophile). Le mélange gazeux dit de Kiggins et Plastridge préconisé pour la culture de *Campylobacter spp.* contient donc : 5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂ (Kiggins et Plastridge, 1956). Dans l'atmosphère ambiante, où la concentration en oxygène est plus élevée, l'accumulation de peroxydes dans la cellule inhibe la croissance et entraîne la mort cellulaire. Pour avoir un rendement optimum, les milieux de culture devront ainsi contenir des composés permettant le piégage et la neutralisation d'éléments toxiques et favorisant la synthèse d'enzymes détoxifiantes par *Campylobacter* (thioglycolate, sang, pyruvate de sodium, charbon, sulfate ferreux) (Mégraud, 1987).

- ✓ Température d'incubation

Tous les *Campylobacter* sont mésophiles et se développent à 37°C. La capacité de croissance à d'autres températures constitue un caractère différentiel d'espèce important, notamment les tests de croissance entre les espèces se développant à 25°C comme *C. fetus* et celles pouvant se développer à 42°C telles que *C. jejuni* et *C. coli*. Du fait de leur caractère

faiblement compétiteur, une température d'incubation de 42°C semble constituer un avantage pour les *Campylobacter* thermotolérants. Moore et Madden, en 1993, ont mis en évidence la possibilité pour certaines sous-populations de *C. coli* de se développer à des températures plus élevées (supérieures à 56°C). *C. jejuni* peut se développer dans une gamme de température allant de 31°C à 45°C (Doyle, 1984). Hazeleger *et al.* (1998) ont étudié la croissance de *C. jejuni* en fonction de la température : pour les espèces 104 et ATCC 33560, les températures minimales de croissance se sont avérées être de 32°C et 31°C.

✓ pH et chlorure de sodium

La zone optimale de pH pour les *Campylobacter* est de 6,5 à 7,5. Il est à noter toutefois que la plupart des souches sont capables de se développer à un pH variant de 6 à 8 (Doyle, 1984).

L'influence du chlorure de sodium (NaCl) sur la croissance des *Campylobacter* thermotolérants est variable et dépend de l'espèce. Néanmoins, la présence de 0,5% de NaCl dans le milieu est recommandée pour la culture et semble être la concentration optimale pour la croissance des *Campylobacter* alors que des concentrations supérieures à 1,5% ont, elles, par contre, tendance à l'inhiber.

Les conditions optimales pour la croissance des *Campylobacter* thermotolérants sont récapitulées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Récapitulatif des conditions de croissance optimale des *Campylobacter* thermotolérants

Température	42°C
pH	6,5 - 7,5
O ₂	5 à 10%
CO ₂	10%
Activité de l'eau	0,997
NaCl	0,5%

✓ Milieux de culture

Le recours à des milieux sélectifs est nécessaire en particulier pour la culture des *Campylobacter* thermotolérants (Corry *et al.*, 1995). Le milieu Butzler, à base de sang, et le milieu Karmali, à base de charbon, sont, avec le milieu Skirrow, les plus connus pour l'isolement des *Campylobacter* thermotolérants. Tous les trois contiennent un mélange d'antibiotiques différents (Karmali *et al.*, 1986 ; Gun-Munro *et al.*, 1987). Les milieux Butzler et Karmali, plus récents, sont plus sélectifs que le milieu Skirrow et permettent une meilleure détection des *Campylobacter* (Karmali *et al.*, 1986 ; Gun-Munro *et al.*, 1987).

Des milieux non sélectifs, d'enrichissement, de transport et de conservation existent aussi. L'utilisation de plusieurs milieux augmente la probabilité de mettre en évidence *Campylobacter* lors d'une analyse bactériologique (Bolton et Coates, 1983 ; Koene *et al.*, 2004).

✓ Durée d'incubation et caractéristiques de culture

Les colonies apparaissent en règle générale en 24 - 48 heures mais la culture de certaines souches peut durer jusqu'à cinq jours. Ainsi le délai de rendu d'un résultat négatif en culture est de cinq jours.

Différents aspects morphologiques des colonies sont classiquement décrits en boîtes de pétri :

- S (« Smooth » = lisse) : Les colonies sont rondes, élevées, convexes, de faible diamètre (2mm), lisses et brillantes. Le bord est régulier et, à maturité, des reflets métalliques sont observés.
- R (« Rough » = rugueux) : Les colonies sont étalées, plates, quelques fois granuleuses, grises ou transparentes avec un bord régulier.
- CG (« Cut Glass ») : On observe de petites colonies (1mm de diamètre), rondes, élevées et translucides.

Un dernier aspect mérite d'être évoqué : les formes viables mais non cultivables. En bactériologie, la capacité à former des colonies comme mesure de la viabilité constitue souvent une méthode fiable et suffisante pour évaluer la fraction vivante/morte d'une population bactérienne. Pourtant, si une bactérie perd la capacité de produire une colonie sur une gélose nutritive, ceci ne signifie pas nécessairement que cette bactérie soit morte (ou était morte au moment de son prélèvement). On a ainsi défini ce dernier état par l'oxymore « viables mais non cultivables » (Viable But Not Culturable : VBNC). Il s'agit d'un concept de plus en plus favorablement reconnu et accepté aujourd'hui (Rollins et Colwell, 1986 ; Barer et Harwood, 1999 ; Keer et Birch, 2003).

Comme un certain nombre de bactéries impliquées dans les toxi-infections alimentaires, les *Campylobacter*, ou plus exactement certaines souches, ont été décrits sous une forme VBNC lors d'un séjour dans un milieu aqueux (Federighi *et al.*, 1998 ; Tholozan *et al.*, 1999). Le nombre de cellules bactériennes reste constant mais certaines perdent leur caractère cultivable. Néanmoins, 1 à 10% des cellules gardent une activité métabolique résiduelle et ces cellules « en coma » peuvent donc dans certaines conditions se développer à nouveau. Ainsi, après passage dans le tube digestif d'animaux à sang chaud, des formes VBNC de *Campylobacter* ont retrouvé leur caractère cultivable (Cappelier *et al.*, 1999a et 1999b). De plus, le passage aux formes VBNC fait généralement suite à des stress identiques à ceux subis dans les industries agro-alimentaires, comme par exemple un stress thermique (Tangwatcharin *et al.*, 2006).

La présence de formes VBNC dans l'environnement et notamment dans l'eau et leur implication dans des intoxications ayant pour point de départ l'eau de boisson est désormais fortement suspectée (Baffone *et al.*, 2006).

L'existence de ces formes représente un problème de santé publique potentiel puisque ces souches pourraient redevenir cultivables, donc pathogènes, à la faveur d'un passage dans le tube digestif d'un animal à sang chaud qui pourrait être le consommateur, ceci sans détection préalable lors d'une investigation microbiologique traditionnelle. Seules des analyses moléculaires permettraient donc de les identifier.

1.2.4. CARACTERES BIOCHIMIQUES

Les principaux caractères biochimiques des *Campylobacter* thermotolérants sont :

- le caractère oxydase positive systématique
- le caractère uréase négative
- le caractère catalase positive pour *C. coli*, *C. jejuni* et *C. lari*
- l'absence de production d'indole
- l'absence d'enzymes extracellulaires (protéases, lipases)
- l'absence de métabolisme fermentatif des sucres
- une production de sulfure d'hydrogène variable
- une réaction d'hydrolyse de l'hippurate variable (présente chez *C. jejuni*)

Cette liste n'est pas exhaustive, d'autres caractères biochimiques existent, ils ont été mis à profit pour réaliser divers biotypages. Les auteurs combinent plusieurs caractéristiques proposant de nombreux schémas de biotypage qui ont été utilisés dans des enquêtes épidémiologiques réalisées sur un grand nombre de souches. Cependant, même si un certain nombre de caractères biochimiques propres aux *Campylobacter* ont un intérêt taxonomique et diagnostique, le biotypage est de moins en moins utilisé.

A la multiplicité des tests non standardisés s'ajoute une grande variété de réponses pour les souches d'une même espèce. Les tests peuvent en effet être de réalisation et/ou d'interprétation difficiles et parfois, il y a une absence de corrélation avec d'autres méthodes de typage (Nachamkin et Blaser, 2000 ; Allos, 2001 ; Meinersmann *et al.*, 2002). Par exemple, le test de l'hydrolyse de l'hippurate longtemps utilisé pour différencier *C. coli* et *C. jejuni* est d'interprétation délicate avec l'apparition d'isolats cliniques de *C. jejuni* donnant un résultat négatif (Linton *et al.*, 1997 ; Englen *et al.*, 2003). De la même façon, classiquement les *Campylobacter* ont un caractère uréase négative, pourtant dès 1985, Bolton *et al.*, ont isolé dix souches à caractère uréase positive à partir de prélèvements de l'environnement. Ces souches, appelées « Urease Positive Thermophilic *Campylobacter* » (UPTC), ont été isolées en 1988 chez l'Homme à partir de prélèvements cliniques par Mégraud *et al.* (1988). Environ 100 souches UPTC ont été reportées en Europe et dans l'Extrême Orient (Matsuda et Moore,

2004). Actuellement, des études sur le caractère « uréase » et son organisation génétique dans les UPTC sont en cours (Sekizuka *et al.*, 2004 ; Kakinuma *et al.*, 2006 ; Ito *et al.*, 2007).

1.2.5. SENSIBILITE NATURELLE AUX ANTIBIOTIQUES

Les *Campylobacter* sont sensibles à la plupart des familles d'antibiotiques, mais des résistances naturelles existent (Tableau 3) (Ng *et al.*, 1987 et 1988 ; Taylor *et al.*, 1988 ; Nachamkin et Blaser, 2000). Ces antibiotiques sont utilisés dans les différents milieux sélectifs pour la détection des *Campylobacter*. A côté de ces résistances intrinsèques, il existe des résistances acquises notamment par *C. jejuni* et *C. coli* aux macrolides, aux aminosides, aux β -lactamines, aux tétracyclines et aux quinolones (Nachamkin et Blaser, 2000 ; Van Looveren *et al.*, 2001).

Tableau 3 : Résistances naturelles des *Campylobacter* aux antibiotiques

ESPECES	ANTIBIOTIQUES auxquels les <i>Campylobacter</i> sont naturellement résistants
<i>Campylobacter spp.</i>	Vancomycine, bacitracine, novobiocine, colimycine, streptogramine B, triméthoprime
<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. lari</i>	Céphalotine, sulfaméthoxazole
<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. fetus</i> , <i>C. hyointestinalis</i>	Rifampicine

Depuis 15 ans, ces résistances étaient restées relativement stables en France, excepté pour les quinolones (pic dans les années 90). L'augmentation de la fréquence des résistances aux quinolones (Pezzotti *et al.*, 2003 ; Payot *et al.*, 2004 ; Espié *et al.*, 2007 ; Gallay *et al.*, 2007b) continue d'inquiéter les médecins puisque cette classe d'antibiotiques est très utilisée dans le traitement à long terme des infections systémiques et des entérites sévères.

1.2.6. POUVOIR PATHOGENE

Globalement les *Campylobacter* sont assez peu pathogènes pour les animaux alors que la plupart des espèces, et notamment les plus courantes *C. jejuni*, *C. coli* et *C. fetus*, sont pathogènes pour l'Homme (Tableau 4). Chez l'Homme, les *Campylobacter* peuvent être à l'origine des maladies suivantes :

- des gastro-entérites : notamment les *Campylobacter* thermotolérants (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*) mais également *C. fetus*
- des septicémies, généralement à point de départ digestif, pouvant entraîner des avortements : en particulier *C. fetus*, parfois certains *C. jejuni*
- des maladies parodontales : *C. rectus* (anciennement *Wolinella recta*), *C. concisus*, *C. curvus*, *C. showae* et *C. gracilis*. L'implication de *C. rectus* dans les maladies parodontales semble fréquente bien qu'encore incomplètement élucidée (Rams *et al.*, 1993).
- différents syndromes d'origine immunopathologique comme le syndrome de Guillain Barré.

Tableau 4 : Pouvoir pathogène des différentes espèces de *Campylobacter* chez l'Homme et chez l'animal
Source : Euzéby J.P., 2005

Espèce	Source(s)	Pouvoir pathogène (éventuel) pour l'Homme	Pouvoir pathogène (éventuel) pour l'animal
<i>C. jejuni subsp. doylei</i>	Homme	Gastro-entérite, gastrite, septicémie	?
<i>C. jejuni subsp. jejuni</i>	Oiseaux, porcs, ruminants, chiens, chats, eau, visons, lapins, insectes	Gastro-entérite, septicémie, méningite, avortement, rectite, syndrome de Guillain-Barré	Gastro-entérite, hépatite aviaire
<i>C. coli</i>	Porcs, oiseaux, bovins, ovins	Gastro-entérite, septicémie	Gastro-entérite
<i>C. fetus subsp. fetus</i>	Bovins, ovins	Septicémie, gastro-entérite, avortement, méningite	Avortement chez les bovins et les ovins
<i>C. fetus subsp. venerealis</i>	Bovins	Septicémie	Stérilité enzootique des bovins
<i>C. lari</i>	Oiseaux, eau douce, eau de mer, chiens, chats, singes, chevaux, otaries	Gastro-entérite, septicémie	Gastro-entérite chez les oiseaux
<i>C. upsaliensis</i>	Chiens, chats, Homme	Gastro-entérite, septicémie, abcès	Gastro-entérite chez le chien et le chat
<i>C. concisus</i>	Homme	Parodontite, gastro-entérite	?
<i>C. curvus</i>	Homme	Parodontite, gastro-entérite	?
<i>C. gracilis</i>	Homme	Parodontite, empyème, abcès	?
<i>C. helveticus</i>	Chiens, chats	?	Gastro-entérite chez le chien et le chat
<i>C. hominis</i>	Homme	Espèce commensale de l'intestin	?
<i>C. hyointestinalis subsp. hyointestinalis</i>	Porcs, bovins, hamsters, daims	Gastro-entérite	Entérite chez le porc et les bovins
<i>C. hyointestinalis subsp. lawsonii</i>	Porcs (estomac)	?	?
<i>C. insulaenigrae</i>	Mammifères marins	?	?
<i>C. lanienae</i>	Homme	?	?
<i>C. mucosalis</i>	Porcs	?	Entérite nécrotique et iléite chez le porc
<i>C. rectus</i>	Homme	Parodontites	?
<i>C. showae</i>	Homme	Parodontite	?
<i>C. sputorum</i> bv. <i>Fecalis</i>	Ovins, bovins	?	?
<i>C. sputorum</i> bv. <i>Paraureolyticus</i>	Bovins, Homme	Entérite	?
<i>C. sputorum</i> bv. <i>Sputorum</i>	Homme, bovins, ovins, porcs	Abcès, gastro-entérite	?

Les résultats des études concernant le pouvoir pathogène des *Campylobacter* thermotolérants concernent essentiellement *C. jejuni* (Bereswill et Kist, 2003 ; Poly et Guerry, 2008). *In vivo*, il est admis que *Campylobacter* agit selon un schéma commun à la plupart des bactéries entéropathogènes (Figure 5).

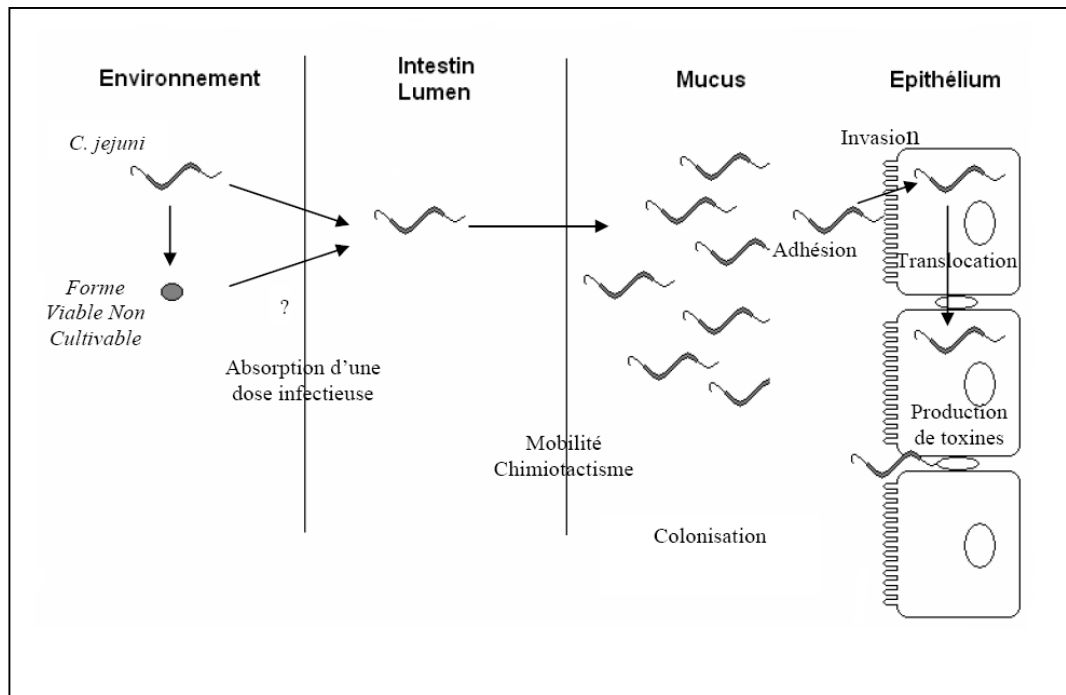


Figure 5 : Etapes de la pathogénie de *C. jejuni*. Source : Snelling *et al.*, 2005

✓ Colonisation du tube digestif :

Campylobacter a la faculté de survivre lors du passage de l'estomac et de se multiplier à l'intérieur du tube digestif où il trouve des conditions optimales pour son développement (température élevée, 37 ou 42°C, et microaérobie). De plus, *Campylobacter* présente un avantage sélectif sur la flore commensale du fait notamment de sa résistance aux sels biliaires et de sa mobilité. Par exemple, *C. jejuni* est capable de pénétrer le mucus de l'estomac et de l'intestin puis de se mouvoir dans la muqueuse intestinale et d'y puiser des nutriments du fait de sa forme hélicoïdale, de son flagelle polaire et de son chimiotactisme (Caldwell *et al.*, 1985 ; Wassenaar et Blaser, 1999).

Le rôle de la motilité dans la pathogénie de *Campylobacter* est maintenant bien établi (Guerry, 2007). La motilité est nécessaire pour atteindre les emplacements d'attachement, mais elle est également exigée pour la pénétration des bactéries dans les cellules intestinales, associée au chimiotactisme (Penn, 2001). Un hôte colonisé peut excréter de 10^6 à 10^9 UFC de *Campylobacter*/g de matières fécales (Yuki *et al.*, 1997).

✓ Adhésion aux cellules intestinales :

Hu et Kopecko, en 1999, ont montré qu'*in vitro* *C. jejuni* pouvait adhérer et s'internaliser dans des cellules épithéliales, le nombre de cellules infectées et le nombre de bactéries internalisées par cellule augmentant avec le temps. L'adhérence est réversible et semble dépendre de la mobilité et des éléments présents à la surface des bactéries : les pili, la flagelline, les protéines de membrane externe et le lipopolysaccharide, éléments qui pourraient jouer le rôle d'adhésine (Konkel *et al.*, 2000).

L'adhésion se réalise au niveau de la bordure en brosse des entérocytes ou bien au niveau des cellules à mucus des cryptes glandulaires. On a ainsi adhésion à la surface du mucus, pénétration dans le mucus et attachement aux cellules épithéliales intestinales. L'adhérence évite l'élimination de la bactérie par le péristaltisme et précède obligatoirement la pénétration dans la cellule. Cette adhésion fait intervenir différentes adhésines identifiées, comme PEB1 (Pei et Blaser, 1993), JLPa (Jin *et al.*, 2001 ; Jin *et al.*, 2003), CadF (Konkel *et al.*, 1997 ; Monteville *et al.*, 2003) ou MOMP (Moser *et al.*, 1997).

✓ Invasion : Effet cytotoxique ou cytotonique sur les cellules intestinales.

Le mécanisme de l'invasion de la muqueuse intestinale (adhérence suivie de pénétration) par les *Campylobacter* reste à préciser. Deux phénomènes, classiquement décrits dans l'invasion des cellules intestinales par d'autres bactéries entéropathogènes, semblent coexister chez *Campylobacter* : internalisation passive et entéroinvasivité active.

De même que pour l'adhésion, l'invasion fait intervenir à la fois la bactérie et la cellule eucaryote. *C. jejuni* entre dans une phase active où sont impliquées les protéines de type Cia (*Campylobacter* Invasion Antigen), notamment la protéine CiaB (Konkel *et al.*, 1997). Pour ce gène, une régulation environnementale et une sécrétion dépendante de la

présence du flagelle a été observée (Rivera-Amill *et al.*, 2001 ; Konkel *et al.*, 2004 ; Biswas *et al.*, 2006). Du côté de la cellule hôte, on note une modification du cytosquelette (microfilaments et microtubules), une augmentation du Ca₂₊ intracytoplasmique et une relation entre fibronectine et cytosquelette. Pour survivre à l'intérieur de la cellule-hôte, *C. jejuni* doit développer des mécanismes de défense face au stress oxydant causé à la fois par la teneur en fer et par les attaques du système immunitaire (macrophages) (Wooldridge et Ketley, 1997 ; Crushell *et al.*, 2004 ; Raphael *et al.*, 2005).

✓ Translocation

C. jejuni peut transloquer soit au travers des cellules épithéliales par endocytose (voie transcellulaire), soit en migrant entre les cellules (voie paracellulaire) (Konkel *et al.*, 1992). Pour passer entre les cellules, la bactérie entraîne une altération des « tight junctions » et la production d'une cytokine pro-inflammatoire (Bras et Ketley, 1999 ; Chen *et al.*, 2006).

✓ Production de toxines

Plusieurs types de toxines ont été caractérisées chez *C. jejuni* mais la production de la plupart d'entre elles est controversée. Dans le contexte de l'entéropathogénicité, on définit deux classes pour les toxines selon leur mode primaire d'action : les entérotoxines et les cytotoxines, toutes les deux ont été décrites chez *Campylobacter* (Wassenaar, 1997). Les entérotoxines ou toxines cytotoniques sont des protéines sécrétées par la bactérie capables de se lier à un récepteur cellulaire spécifique et d'entrer dans la cellule hôte. Cette entrée entraîne alors l'élévation d'AMP cyclique cellulaire (Walker *et al.*, 1986). Les cytotoxines sont des protéines sécrétées par la bactérie ayant pour but de tuer les cellules cibles soit par un mode d'action intracellulaire ou par la formation de pores dans les cellules (Walker *et al.*, 1986).

La production d'une entérotoxine de type *cholera*-like par *C. jejuni* a été décrite pour la première fois en 1983 par Ruiz-Palacios *et al.*. Cependant, les études suivant cette découverte restent obscures et remettent en question la production d'une telle toxine (Ketley, 1997). *C. jejuni* semble posséder une entérotoxine (CJT) et une hémolysine mais leur production varie considérablement selon les souches isolées (Wassenaar, 1997) et leur implication dans la pathogénicité reste à confirmer.

Différentes activités cytotoxiques ont été décrites chez *C. jejuni*, mais une seule cytotoxine a pu être identifiée après séquençage du génome, la CDT (Cytolethal Distending Toxin). Les trois gènes codant pour cette protéine (*cdtA*, *cdtB* et *cdtC*) sont présents chez la quasi-totalité des souches (Pickett *et al.*, 1996). Cette protéine présente une sous-unité active (desoxyribonucléase) et une sous-unité de transport. Elle entraîne un effet cytotoxique sur la cellule-hôte avec arrêt du cycle et mort cellulaire, induction de la sécrétion d'interleukine 8 pro-inflammatoire et immuno-suppression (Eyigor *et al.*, 1999 ; Hickey *et al.*, 2000 ; Purdy *et al.*, 2000 ; Bang *et al.*, 2001 ; Hassane *et al.*, 2003).

C. fetus possède une microcapsule S qui le rend résistant à la phagocytose (Blaser *et al.*, 1988). Certaines souches de *C. jejuni* possèdent également une capsule qui pourrait avoir une implication dans la virulence et la survie de la bactérie (Karlyshev *et al.*, 2001 ; Dorell *et al.*, 2001).

Le pouvoir pathogène de *C. jejuni* est loin d'être élucidé et les recherches sur ce sujet continuent. Endtz *et al.*, en 2000, ont souligné que l'apparition du syndrome de Guillain-Barré survenait préférentiellement avec certaines souches de *C. jejuni*.

1.2.7. DETECTION BACTERIOLOGIQUE DES CAMPYLOBACTER

1.2.7.1. Nature et conservation des prélèvements pour l'identification

Chez l'Homme et chez les animaux, la recherche des *Campylobacter* se fait sur matières fécales ou sur le produit d'un écouvillonnage, qui permet le raclage de la muqueuse rectale riche en *Campylobacter* (Mégraud, 1987 ; Butzler et Oosterom, 1991). La méthode employée dans la plupart des cas est l'examen direct des matières fécales au microscope. Dans tous les cas, l'échantillon doit être conservé sous couvert du froid positif et ensemencé au plus tôt. Des cultures peuvent également être obtenues à partir de prélèvements sanguins dans le cas de septicémies, et à partir de prélèvements effectués au contact de la zone lésée dans le cas de maladies parodontales.

Différentes méthodes de détection et de caractérisation peuvent ensuite être employées pour identifier les *Campylobacter spp.*

1.2.7.2. Protocole d'isolement et identification du genre *Campylobacter*

L'isolement se fait sur milieux sélectifs incubés sous atmosphère microaéroophile et capnophile à 42°C. Après incubation, chaque colonie suspecte repérée sur une boîte est prélevée pour réaliser une coloration de Gram (bactéries à coloration de Gram négative), un état frais (l'examen morphologique à l'état frais dans une goutte de bouillon montre une mobilité caractéristique en « vol de moucheron ») et des tests biochimiques rapides (recherche de l'activité oxydase, catalase et uréase). Ces tests sont généralement suffisants pour identifier le genre *Campylobacter*.

Toute colonie présentant les caractéristiques morphologiques et biochimiques des *Campylobacter* est alors repiquée afin d'isoler la souche. Chaque souche isolée est ensuite conservée à -80°C pour l'identification de l'espèce bactérienne.

1.2.7.3. Identification du genre *Campylobacter* à partir de prélèvements polycontaminés

Bien qu'étant de faibles compétiteurs, il est relativement facile d'isoler des *Campylobacter* thermotolérants à partir de prélèvements polycontaminés (cas des matières fécales ou des prélèvements réalisés à l'abattoir) du fait de leur capacité à se développer dans des conditions spécifiques, atmosphère microaérobie et enrichie en CO₂, en présence de certains antibiotiques et, pour les *Campylobacter* thermotolérants, à une température de 42°C. Il s'agit de conditions de culture particulières dans lesquelles très peu d'autres germes peuvent se développer, notamment ceux habituellement rencontrés dans ce type de prélèvements.

La plupart des techniques, en particulier celles utilisées en bactériologie alimentaire, utilisent des milieux d'enrichissement (bouillon de Preston, bouillon de Bolton, milieu de Park et Sanders, CAMPY-BAP agar, ...) puis différents milieux d'isolement contenant des antibiotiques (milieu Karmali, milieu Butzler, milieu MCCDA...), ce qui suffit dans la majorité des cas à isoler les *Campylobacter*. Parmi les milieux d'isolement employés, le milieu Karmali semble être le plus sélectif devant les milieux Butzler et Skirrow, ce dernier apparaissant comme le moins performant (Ono *et al.*, 1995).

Une nouvelle méthode d'isolement des *Campylobacter* ne nécessitant pas l'emploi d'antibiotiques a été mise au point par Valdivieso-Garcia *et al.*, en 2007. Cette technique,

basée sur l'utilisation d'une membrane de filtration constituée d'une grille hydrophobe et d'un milieu de culture semi-solide, utilise la mobilité naturelle des *Campylobacter* pour les séparer des autres bactéries présentes dans le milieu d'enrichissement. D'après les auteurs, cette méthode serait plus simple, plus rapide et moins coûteuse que les techniques à base d'antibiotiques, et elle permettrait de mettre en évidence un plus grand nombre de *Campylobacter*.

Toutefois, la nature des milieux employés et les différentes procédures utilisées ont un impact sur la sensibilité de la technique d'identification et il convient d'en tenir compte dans l'interprétation des résultats d'isolement. En effet, on peut observer des variations « artificielles » en fonction des milieux et des procédures employés (i) au niveau quantitatif (le nombre de prélèvements trouvés positifs est différent), et (ii) au niveau qualitatif (capacité préférentielle à isoler certaines espèces ou certaines souches de *Campylobacter* par rapport à d'autres) (Madden *et al.*, 2000). De plus, il faut également considérer les variations dues à la nature du prélèvement puisque celle-ci peut influencer significativement sur les résultats : par exemple, en 2006, dans l'étude de Fosse *et al.*, seuls 66% des *Campylobacter* inoculés dans des échantillons de viande de porc ont été retrouvés suite à l'analyse bactériologique. L'utilisation conjointe de plusieurs milieux lors d'une analyse bactériologique augmente ainsi la probabilité de mettre en évidence *Campylobacter* (Bolton et Coates, 1983 ; Koene *et al.*, 2004).

1.3. METHODES D'IDENTIFICATION ET DE CARACTERISATION

1.3.1. IDENTIFICATION DE L'ESPECE

1.3.1.1. Identification par des tests biochimiques

Les diagnostics de genre et d'espèce à l'aide de tests biochimiques sont assez difficiles car les *Campylobacter* sont inactifs sur les sucres et, d'une manière générale, biochimiquement peu actifs, ce qui peut entraîner des confusions notamment avec les *Helicobacter*.

Une identification phénotypique classique peut être réalisée grâce aux techniques standardisées (Tableau 5) décrites par On et Holmes (On et Holmes, 1995 ; On, 1996).

Tableau 5 : Résultats des tests biochimiques d'identification pour chaque espèce de *Campylobacter*.

Source : Euzéby J.P., 2005

Espèces	Résultats des tests biochimiques									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>C. jejuni subsp. jejuni</i>	+	+	+	+	-	+	+	(+)	(+)	+
<i>C. jejuni subsp. doylei</i>	(+)	+	+	+	-	-	+	-	(-)	(+)
<i>C. coli</i>	+	+	-	+	-	+	+	(+)	(+)	+
<i>C. fetus subsp. fetus</i>	+	+	-	-	+	(+)	+	+	+	+
<i>C. fetus subsp. venerealis</i>	(+)	+	-	-	(+)	-	+	(+)	(-)	(-)
<i>C. lari</i>	+	+	-	(-)	-	+	+	+	+	(-)
<i>C. upsaliensis</i>	-	+	-	+	-	(+)	+	+	+	d
<i>C. concisus</i>	-	d	-	-	-	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>C. curvus</i>	-	+	(-)	d	-	d	-	-	+	(+)
<i>C. gracilis</i>	(-)	-	-	(+)	-	(+)	-	-	+	+
<i>C. helveticus</i>	-	+	-	+	-	+	+	d	d	-
<i>C. hominis</i>	-		-	-	-	-	d	d	+	-
<i>C. hyointestinalis subsp. hyointestinalis</i>	+	+	-	-	(-)	+	+	(+)	+	(+)
<i>C. hyointestinalis subsp. lawsonii</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	(-)	-
<i>C. insulaenigrae</i>	+	+	-	-	-	-			+	
<i>C. lanienae</i>	+	+	-	-	-	+			-	
<i>C. mucosalis</i>	-	+	-	-	-	+	(+)	(+)	d	-
<i>C. rectus</i>	(-)	+	-	+	-	(-)	-	-	+	-
<i>C. showae</i>	+	d	-	d	-	d	-	-	d	-
<i>C. sputorum</i>	d	+	-	-	-	(+)	d	d	+	-

1) Catalase ; 2) Oxydase ; 3) Hydrolyse de l'hippurate ; 4) Indoxyl acétate estérase ; 5) Croissance à 25 °C ; 6) Croissance à 42 °C ; 7) Croissance en présence de 1,5 p. cent de bile ; 8) Croissance en présence de 2 p. cent de bile ; 9) Croissance en présence de 1 p. cent de glycine ; 10) Croissance en présence de 0,1 p. cent de permanganate de potassium.

+ : toutes les souches donnent un résultat positif.
- : toutes les souches donnent un résultat négatif.
(+) : 70 à 90 p. cent des souches donnent un résultat positif.
(-) : 7 à 29 p. cent des souches donnent un résultat positif.
d : 40 à 64 p. cent des souches donnent un résultat positif.

Des tests biochimiques pratiqués sur des souches dont les caractères morphologiques sont évocateurs du genre *Campylobacter* permettent d'identifier les quatre espèces majeures de *Campylobacter* thermotolérants. Ainsi, la recherche de l'activité oxydase, la recherche de l'activité catalase et le test d'hydrolyse de l'hippurate sont menés en association avec l'évaluation de la sensibilité à deux antibiotiques, l'acide nalidixique et la céphalotine. Ces tests sont préconisés par la norme NF ISO 10 272 (méthode de référence pour la recherche des *Campylobacter* thermotolérants dans les aliments) (Tableau 6).

Tableau 6 : Tests biochimiques utilisés pour l'identification des quatre espèces de *Campylobacter* thermotolérants (norme NF ISO 10272)

	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Culture à 42°C	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	- ou faible
Hydrolyse de l'hippurate	+	-	-	-
Acide nalidixique (disque à 32 µg) (Antibiotique)	Sensible	Résistant	Résistant	Sensible
Céphalotine (disque à 32 µg) (Antibiotique)	Résistant	Résistant	Résistant	Sensible

En pratique, l'identification biochimique des *Campylobacter spp.* présente des difficultés d'interprétation. Le test d'hydrolyse de l'hippurate était très utilisé pour distinguer *C. coli* de *C. jejuni* (*C. jejuni* y répond positivement, *C. coli* négativement) mais la découverte de souches de *C. jejuni* négatives au test de l'hippurate remet en question cette méthode pour l'établissement d'une distinction formelle entre les deux espèces (Bär et Fricke, 1987). De même, des souches de *C. jejuni* résistantes à l'acide nalidixique sont apparues et posent problème pour l'utilisation du critère de sensibilité aux antibiotiques. Des kits d'identification existent (API Campy, API Biomérieux) mais des difficultés d'identification de certaines souches de *C. coli* et de *C. lari* ont été rapportées (Reina *et al.*, 1993).

Actuellement, les techniques de biologie moléculaire, et en particulier la PCR (Polymerase Chain Reaction), sont de plus en plus fréquemment utilisées pour identifier le genre *Campylobacter* et les différentes espèces.

1.3.1.2. Méthode avec amplification génique : la PCR (Polymerase Chain Reaction)

Depuis sa mise au point, la PCR a permis la détection d'agents microbiens parfois difficilement mis en évidence par les méthodes classiques de diagnostic. De nombreuses études soulignent l'intérêt de la PCR pour l'identification de *Campylobacter* : Wegmüller *et al.*, 1993 ; Docherty *et al.*, 1996 ; Jackson *et al.*, 1996 ; Waage *et al.*, 1999.

En raison des difficultés décrites lors de l'utilisation des caractères biochimiques des bactéries pour leur identification et du délai d'attente de plusieurs jours lors de la culture, l'amplification du génome bactérien par PCR constitue une alternative intéressante.

L'identification de l'espèce après isolement repose sur la détection et l'amplification d'une fraction de génome caractéristique d'une espèce donnée à l'aide d'amorces spécifiques. En 1992, Oyoyo *et al.* ont démontré la validité d'une méthode PCR permettant d'identifier sans les distinguer les espèces *C. jejuni* et *C. coli* par amplification d'une région d'ADN codant pour une protéine d'attachement, la flagelline (*flaA*), au moyen d'amorces spécifiques du genre. Pour le diagnostic des espèces *C. coli* et *C. jejuni*, d'autres méthodes utilisant plusieurs couples d'amorces (multiplex PCR) ont par la suite été développées ; elles utilisent notamment des amorces discriminantes pour les deux espèces, spécifiques d'une région d'ADN codant pour l'ARN ribosomal *16S* (Linton *et al.*, 1997 ; Wassenaar et Newell, 2000).

L'aspect quantitatif de la PCR est également à souligner puisqu'une analyse génétique directe permettant de détecter et de dénombrer les *Campylobacter* dans les prélèvements sans passer par l'étape de culture est attractive. Jusqu'à présent, cette technique appliquée à des prélèvements complexes polycontaminés susceptibles de présenter des inhibiteurs de la réaction d'amplification génique comme les matières fécales, nécessitait souvent une étape préalable d'isolement bactérien et de purification de l'ADN (Inglis et Kalischuk, 2003). Cependant des travaux récents font état de la mise au point d'une technique de PCR quantitative en temps réel non seulement pour détecter des souches bactériennes de *C. jejuni* et de *C. coli* après isolement (Best *et al.*, 2003) mais également directement à partir de matières fécales chez l'Homme (Lagier *et al.*, 2004). Une PCR en temps réel pour détecter les *Campylobacter* thermotolérants directement à partir de matières fécales de poulet a été également décrite par Lund *et al.* (2004) ainsi que par Rudi *et al.* (2004).

Ces techniques ont une sensibilité et une spécificité équivalentes voire supérieures à la culture et elles pourraient même constituer un moyen de détecter les formes viables non cultivables de *Campylobacter*.

1.3.2. METHODES DE CARACTERISATION DES SOUCHES DE *CAMPYLOBACTER*

1.3.2.1. Biotypage

Les caractères biochimiques ont été mis à profit pour réaliser divers systèmes de biotypages dans lesquels les auteurs combinent plusieurs caractéristiques. En 1980, Skirrow et Benjamin ont proposé un schéma de biotypage basé sur des tests simples : test d'hydrolyse de l'hippurate, production rapide de sulfure d'hydrogène (H₂S) dans un milieu contenant du fer et résistance à l'acide nalidixique. Ce test permet uniquement de différencier les espèces *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*. En 1982, Hebert *et al.* proposent un schéma permettant de différencier pour *C. jejuni* huit biotypes. Ce test est basé sur le test d'hydrolyse de l'hippurate, d'hydrolyse de l'ADN et sur la croissance sur une gélose contenant du charbon et de la levure.

Actuellement, le schéma de biotypage le plus utilisé est celui proposé par Lior en 1984. Il permet non seulement de différencier les trois espèces de *Campylobacter* thermotolérants les plus répandues (*C. jejuni*, *C. coli* et *C. « laridis »* correspondant à *C. lari*) mais également d'établir une division au sein même de ces espèces en biotypes (Tableau 7). Chez les souches d'origine humaine, les biotypes I (I et II pour *C. jejuni*) sont les plus fréquents pour les trois espèces (Lior et Butzler, 1986 ; Lior, 1989).

Tableau 7 : Schéma de biotypage pour *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari* selon Lior (1984)

		<i>C. jejuni</i>				<i>C. coli</i>		<i>C. lari</i>	
		4 Biotypes				2 Biotypes		2 Biotypes	
		I	II	III	IV	I	II	I	II
TESTS	Hydrolyse de l'hippurate	+	+	+	+	-	-	-	-
	Production rapide d'H ₂ S	-	-	+	+	-	-	+	+
	Hydrolyse de l'ADN	-	+	-	-	-	+	-	+

✓ Test de l'hydrolyse de l'hippurate

Ce test repose sur la capacité de certaines bactéries à hydrolyser l'hippurate en glycine et en acide benzoïque, en l'occurrence les *C. jejuni*. Après deux heures d'incubation à 37°C, la glycine est détectée par ajout d'un réactif à la ninhydrine : une coloration violette apparaît en 10 minutes. Cependant, ce test rapide pose un problème dans environ 10% des cas du fait d'une coloration « douteuse » ne permettant pas de différencier des souches de *C. jejuni* faiblement positives ou des réactions faussement positives dues à la présence d'autres acides aminés, de peptides ou d'amines biogènes (Morris *et al.*, 1985). Pour confirmer ce test, on réalise alors une chromatographie en phase gazeuse mettant en évidence l'acide benzoïque (Kodaka *et al.*, 1982) ou une chromatographie en couche mince unidimensionnelle permettant de révéler la glycine (Lin *et al.*, 1986). De plus, ce test est devenu d'interprétation délicate avec l'apparition d'isolats cliniques de *C. jejuni* donnant un résultat négatif (Linton *et al.*, 1997 ; Englen *et al.*, 2003).

✓ Test rapide de production de sulfure d'hydrogène (H₂S)

Etant donné que certains *Campylobacter* possèdent une capacité à produire de l'H₂S au cours de leur métabolisme, ce test consiste en l'observation d'un noircissement en 2 à 4 heures d'un milieu de culture tamponné supplémenté en FBP (Supplément FBP : ferrous sulphate-sodium metabisulphite-sodium pyruvate) (Skirrow et Benjamin, 1980). Dans son schéma de biotypage, Lior a repris ce test et l'a appliqué à 1826 souches de différentes origines. 9,8% des souches d'origine humaine et 18,9% des souches d'une autre origine étaient H₂S positives sur ce milieu FBP en sachant que les souches de *C. coli* sont H₂S négatives (Lior, 1984).

✓ Test d'hydrolyse de l'ADN

Hänninen, en 1982, a mis en évidence la production d'une désoxyribonucléase chez certaines souches de *Campylobacter*. Ce test d'hydrolyse de l'ADN consiste donc en l'observation d'une zone d'éclaircissement autour d'un dépôt de bactéries cultivées sur un milieu contenant de l'ADN et un indicateur coloré, le bleu de toluidine. Sur les souches testées, 37,4% possèdent une activité DNAsique en sachant que les trois espèces peuvent présenter ce caractère (Lior, 1984).

D'autres schémas de biotypage existent comme celui de Roop *et al.* (1984) qui repose sur les tests d'hydrolyse de l'hippurate, d'hydrolyse de l'ADN et de la phosphatase alcaline. Le schéma de biotypage de Preston, proposé par Bolton *et al.* (1984), comprend différents tests biochimiques (test de production d'H₂S et test d'hydrolyse de l'ADN) et des tests de sensibilité à différents composants (céphalotine, arsenite de sodium, chlorure de triphényltétrazolium, pyronine, métrodiazole, 5-fluorouracil, D-cyclosérine, safranine, permanganate de potassium et acide nalidixique). Ces agents de biotypage ont été incorporés à une agar-base dépourvue de sang comportant un bouillon nutritif, du charbon, de l'hydrolysate de caséine, du sulfate ferreux, du pyruvate de sodium et de l'agar « New Zealand » (agar permettant d'inhiber l'étalement des colonies pour pouvoir inoculer plusieurs souches sur une boîte). En 1986, El Harrif et Mégraud, caractérisent les *Campylobacter* en fonction de leurs profils enzymatiques et de tests d'utilisation de substrats carbonés tels que le succinate, le fumarate ou encore le lactate.

Néanmoins, il convient d'utiliser ces tests avec prudence puisqu'à la variabilité de tests non standardisés s'ajoute une grande variété de réponses pour les souches d'une même espèce de *Campylobacter*. Certains souches de *C. jejuni* sont par exemple hippurate négative (Linton *et al.*, 1997 ; Englen *et al.*, 2003) et certains *Campylobacter* thermotolérants, isolés dans l'environnement et à partir de prélèvements cliniques, sont uréase positive (Bolton *et al.*, 1985 ; Mégraud *et al.*, 1988). Il existe également des souches d'*Helicobacter pylori* uréase négative pouvant être confondues avec *C. jejuni* subsp *doylei* (Mégraud *et al.*, 1988 ; Euzéby, 2002).

1.3.2.2. Tests sérologiques et typage phénotypique

Deux méthodes ont été développées dans les années 80, l'une fondée sur les antigènes protéiques thermolabiles utilisant une réaction d'agglutination sur lame (Lior *et al.*, 1982), l'autre fondée sur les antigènes thermostables utilisant une réaction d'hémagglutination passive (Penner et Hennessy, 1980 ; Penner *et al.*, 1983). Ces méthodes permettent une caractérisation phénotypique des souches au sein des espèces de *C. jejuni* et de *C. coli*. Actuellement, pour effectuer l'identification antigénique d'une souche pure, on applique l'un des deux schémas de typage reconnus et recommandés par le comité international sur le Sérotypage des *Campylobacter*, à savoir le schéma de Penner et Hennessy (1980) (appelé

aussi schéma de Penner) et celui de Lior (1982). Le système d'Hebert *et al.* (1982) reposant sur une technique d'immunofluorescence directe pour séparer 20 groupes de *C. jejuni* et de *C. coli* n'est lui pratiquement pas utilisé.

Le schéma de Penner (1983) permet donc la détection des antigènes thermostables par hémagglutination passive. La désignation du sérotype se fait par le préfixe HS pour Heat Stable antigens. Cette technique est difficile à mettre en œuvre et de faible spécificité, du fait notamment de l'utilisation d'antisérums non absorbés. Pour pallier ces problèmes, un système utilisant les antigènes thermostables et une réaction d'agglutination directe a été développé récemment au Royaume-Uni (Frost *et al.*, 1998) pour identifier et distinguer les souches de *Campylobacter*. Cependant, sur les 2407 isolats testés, 19% des *C. jejuni* et 12% des *C. coli* n'ont pas pu être typés par cette technique.

Le schéma de Lior *et al.* (1982) permet la détection d'antigènes thermolabiles par agglutination sur lame en utilisant des antisérums spécifiques. Le système permet de différencier une centaine de groupes parmi les trois principales espèces de *Campylobacter* thermotolérants (63 sérogroupes pour *C. jejuni*, 37 sérogroupes pour *C. coli*, 8 sérogroupes pour *C. lari*). La désignation du sérotype se fait par le suffixe HL pour Heat Labile antigens.

En 1985, deux équipes (Jones *et al.*, 1985 ; Patton *et al.*, 1985) ont comparé ces deux systèmes de typage en les appliquant à des études épidémiologiques comprenant respectivement 500 et 1405 isolats. Les résultats soulignent que les systèmes sont comparables pour le sérotypage d'isolats d'origine humaine ou non, ainsi que pour l'évaluation des relations entre les souches isolées au cours d'épidémies à *Campylobacter*. De plus, ils ont mis en évidence la complémentarité des deux systèmes de sérotypage et la présence à la fois d'associations et de variations. Toutefois, ces techniques, souvent lourdes et difficiles à mettre en œuvre, ne sont pas adaptées à l'étude du portage du fait notamment de leurs limites : leur capacité de typage des isolats est restreinte (beaucoup ne permettent pas l'obtention d'un résultat) et leur caractère discriminant est faible (On, 1996 ; Wassenaar et Newell, 2000). En revanche, elles présentent un intérêt en contexte clinique pour un diagnostic rapide de campylobactériose. Dans ce cadre, il est recommandé d'utiliser ces systèmes de sérotypage en combinaison avec d'autres méthodes.

1.3.2.3. Lysotypage

Le lysotypage est une technique d'identification fondée sur la lyse sélective par des bactériophages permettant ainsi la détermination de différents lysotypes. Le premier phage lytique a été décrit chez *C. fetus* en 1970 (Bryner *et al.*, 1970).

Grajewski *et al.*, en 1985, mettent au point une technique standardisée de lysotypie pour l'étude de l'épidémiologie des infections humaines à *C. jejuni* et à *C. coli*. Ce premier système, composé de 14 bactériophages isolés à partir de fientes de volailles, a permis de mettre en évidence 77 lysotypes parmi 255 isolats issus d'une même région. 94,5% de ces isolats étaient typables alors que pour des isolats provenant de différentes régions, seulement 88% présentaient un lysotype (Grajewski *et al.*, 1985). Depuis, ce schéma de lysotypage est régulièrement amélioré et étendu. Lior, en 1989, indique qu'il a caractérisé 38 lysotypes chez *C. jejuni* (Lior 1989). Ce travail est confirmé en 1992 par Khakhria et Lior qui, sur 754 isolats de *Campylobacter* issus de 17 pays différents (672 *C. jejuni* et 82 *C. coli*), réussissent à typer 80 % de ces isolats en 46 lysotypes différents. Néanmoins, le schéma de typage utilisé dans cette étude ne s'applique pas aux autres espèces de *Campylobacter* (Khakhria et Lior, 1992). Salama *et al.* (1990) ont décrit un nouveau système de lysotypage (10 nouveaux phages ont été ajoutés à 6 bactériophages du schéma de Grajewski *et al.* (1985)). Cent quarante lysotypes différents ont été obtenus à partir d'isolats issus de 5 épidémies différentes (100% des isolats d'origine humaine ont pu être typés). Dans une publication de 2002, Wareing *et al.* mettent en évidence, dans une collection de 754 souches de *C. jejuni* isolées de cas sporadiques humains de campylobactériose, 33 et 42 sous-types différents après l'emploi du schéma de sérotypage de Penner et du lysotypage de Salama (1990). Il est à noter que dans bien des études des souches restent non typables par ces méthodes. Lors d'études épidémiologiques, la lysotypie apporte des informations plus précises que la sérotypie sur l'origine des souches et semble, en tous les cas, plus fiable car moins soumise aux variations antigéniques.

1.3.2.4. Profils de résistance aux antibiotiques

Il est également possible de caractériser les souches bactériennes en déterminant leur profil de résistance aux antibiotiques. La technique de l'antibiogramme standard est la plus souvent utilisée et son interprétation est réalisée selon des critères standardisés.

Cependant, l'utilisation des résultats d'antibiorésistance dans un but épidémiologique semble délicate. En effet, Wang et Taylor (1990) ont souligné la plasticité du génome des *Campylobacter* ainsi que leur capacité à échanger des plasmides. Ce transfert horizontal entre bactéries d'éléments génétiques mobiles, supports de certains gènes d'antibiorésistance, semble fréquent chez *Campylobacter* et ne permet pas de caractériser aisément dans un but épidémiologique les différentes souches. Cette méthode est par conséquent relativement peu discriminante.

1.3.2.5. Typage moléculaire

Actuellement, les méthodes génotypiques sont les plus prisées car considérées comme susceptibles d'apporter les informations les plus pertinentes à des fins épidémiologiques. Néanmoins, le coût et la complexité de ces techniques de typage réservent encore leur utilisation à des travaux de recherche.

Parmi les différentes techniques de typage moléculaire (Tableau 8), certaines sont plus fréquemment utilisées pour caractériser et constituer des groupes en fonction du degré d'identité du génome des différentes souches de *Campylobacter*.

✓ La technique PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

On appelle polymorphisme de restriction, des variations de la séquence d'ADN révélées par des modifications de la carte de restriction qui traduisent un polymorphisme génotypique.

Cette technique consiste en la comparaison des fragments d'ADN obtenus après digestion par des enzymes de restriction des produits de PCR, la PCR étant ciblée sur un ou plusieurs gènes relativement conservés. Pour *Campylobacter*, il s'agit en général du gène codant pour la flagelline (Alm *et al.*, 1993c ; Nachamkin *et al.*, 1993), des gènes codant pour les ARN ribosomiaux ou des deux types de gènes (Weijtens *et al.*, 1997). Shi *et al.* (2002) ainsi que Klena *et al.* (2004) ont travaillé sur un groupe de gènes codant pour le lipopolysaccharide. Plus récemment, Miller *et al.*, en 2007, ont utilisé un gène codant pour la nitrate réductase.

✓ **La technique ERIC-PCR** (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus)

Des séquences d'ADN répétitives présentes sur le génome en position intergénique (le nombre de répétition étant plus ou moins caractéristique d'une souche) sont amplifiées par PCR. Une électrophorèse des fragments obtenus permet de visualiser les différentes portions d'ADN et les profils peuvent alors être comparés (Weijtens *et al.*, 1997).

✓ **La macrorestriction génomique suivie d'une électrophorèse en champ pulsé**
(RFLP - PFGE : Pulse Field Gel Electrophoresis)

Cette analyse porte sur la totalité du génome bactérien. Ce dernier est soumis à l'action d'enzymes de restriction avec un site de coupure relativement rare. Une électrophorèse en champ pulsé permettant la séparation des fragments de grande taille est ensuite mise en oeuvre. Les profils d'électrophorèse obtenus sont alors caractéristiques pour chacune des souches. Cette technique est actuellement considérée comme la plus performante pour la caractérisation des souches de *Campylobacter* en raison de son fort pouvoir discriminant. En revanche, elle nécessite un investissement en équipement plus onéreux que les deux autres méthodes précédemment décrites.

✓ **La technique MLST** (Multi Locus Sequence Typing)

Cette technique est encore assez peu utilisée du fait de son coût, de la charge en travail et/ou de la nécessité d'un investissement matériel conséquent pour le séquençage. Elle est cependant très intéressante du fait de la reproductibilité des données du séquençage d'un laboratoire à un autre et de l'accessibilité à des bases de données. Le principe de la technique est d'amplifier puis de séquencer plusieurs gènes conservés au sein de l'espèce (en général sept) et d'en définir les différents allèles présents pour chaque souche : on obtient ainsi une séquence-type, spécifique d'une souche (Dingle *et al.*, 2001). Ces gènes sont des gènes dits « de ménage » (« housekeeping genes ») qui codent pour des enzymes du métabolisme intermédiaire.

Cette méthode permet une analyse précise de la génétique et de l'évolution des populations. Une base de données spécialisée est disponible sur Internet pour la centralisation des résultats et l'analyse globale de la population. Il a cependant été démontré par Sails *et al.*

(2003b) que même si la technique MLST présente différents avantages (reproductibilité, standardisation, contribution à la centralisation des données), il est nécessaire de la coupler à une autre méthode pour obtenir un niveau de discrimination équivalent à celui obtenu par PFGE.

✓ D'autres méthodes, existent :

- La RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Fayos *et al.*, 1993)

Cette technique utilise des amorces de petite taille (de 6 à 9 bases) de séquence aléatoire. Ces amorces vont se fixer sur l'ADN cible au hasard et la nature des produits d'amplification obtenus est inconnue. Cette technique permet d'obtenir rapidement des fragments variés d'ADN génomique, qui seront ensuite analysés.

- L'AFLP™ (Amplified fragment Length Polymorphism) (Zabeau et Vos, 1993)

Cette technique repose sur l'amplification sélective de fragments de restriction générés à partir d'un échantillon d'ADN génomique. Elle a été appliquée à *Campylobacter* (Duim *et al.*, 1999) et fait partie des trois méthodes standardisées dans le réseau européen Campynet.

- Le ribotypage (Stanley *et al.*, 1995).

Pour cette technique, la totalité de l'ADN bactérien est digéré par une enzyme de restriction avant séparation par électrophorèse et révélation des fragments grâce à des sondes correspondant à des ARNr *16S* et *23S*

- La technique SNP (Single Nucleotide Polymorphism),

Elle distingue les différentes souches en les identifiant par les variations d'une seule paire de bases dans plusieurs loci (Price *et al.*, 2006).

Les techniques de typage permettent une identification précise des souches et peuvent apporter des informations sur les relations phylogénétiques entre celles-ci, ce qui en fait des outils intéressants en épidémiologie (Dingle *et al.*, 2005 ; Thakur et Gebreyes, 2005). Trois méthodes ont été récemment évaluées et standardisées dans un réseau européen appelé

Campynet : le typage des gènes *flaA* et *flaB* par PCR-RFLP, la macrorestriction du génome par électrophorèse en champ pulsé avec *Sma* I et *Kpn*I et l'AFLP™.

Ces méthodes de caractérisation épidémiologique des souches de *Campylobacter* apparaissent comme informatives ponctuellement mais sont spécifiques à l'étude, ce qui rend difficile la comparaison des résultats obtenus dans différents travaux. De plus, elles ont été jusqu'à présent relativement peu utilisées pour la description épidémiologique des souches en élevage porcin et en abattoir. Etant donné le peu de recul concernant l'exploitation des données obtenues par ces méthodes, leur intérêt pour identifier l'origine des contaminations et les modalités de transmission n'est pas connu.

Tableau 8 : Méthodes de typage moléculaire de *C. jejuni* et *C. coli*. Source : AFSSA, 2004

	Pouvoir discriminant	Facilité	Coût	Méthode d'application globale
PCR-RFLP des gènes <i>flaA</i> et <i>flaB</i> (Wassenar & Newell, 2000)	++	+++	++	+
Macro restriction par électrophorèse en champs pulsés (<i>Sma</i> I, <i>Kpn</i> I) (Imai <i>et al.</i> , 1994)	+++	+	+	+++
Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (Duim <i>et al.</i> , 1999)	+++	+	+	+++
Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Fayos <i>et al.</i> , 1993)	+++	+++	++	+
Ribotypage automatisé (Stanley <i>et al.</i> , 1995)	+	++	+	++
Multi Locus Sequence Typing (MLST) (Dingle <i>et al.</i> , 2001)	+++	+	+	+++

+++ : très bien, ++ : moyen, + : peu attractif

1.3.2.6. Autres systèmes de typage

✓ La détermination de l'auxotype

La détermination de l'auxotype est une technique permettant de différencier les souches bactériennes en fonction de leurs besoins nutritionnels. Tenover *et al.* (1985a) ont étudié les besoins nutritionnels de *C. coli* et de *C. jejuni*. Ils ont mis en évidence à partir d'un milieu minimum défini et élaboré par leurs soins que toutes les souches de *C. coli* testées étaient prototrophes alors que 58% des souches de *C. jejuni* nécessitaient la présence d'un acide aminé pour leur croissance. Dans une autre étude, ils ont mis en évidence l'absence de

corrélation entre l'auxotype et le sérotype ou entre l'auxotype et la présence de plasmide (Tenover *et al.*, 1985b). Cette technique est très peu utilisée pour la caractérisation des différentes souches de *Campylobacter*.

✓ Typage basé sur la réaction aux lectines

Ce système de typage est basé sur la liaison spécifique des lectines (protéines ou glycoprotéines dérivées de plantes) avec certains carbohydrates provoquant l'agglutination de la bactérie. Wong *et al.*, en 1986, ont mis en évidence 12 profils parmi les 155 isolats de *Campylobacter* en utilisant 5 lectines (98 % des isolats testés ont pu être typés). Cependant, ils n'ont pas observé de corrélation entre le sérotype HS et les profils obtenus. Cette absence de corrélation a été confirmée lors d'une étude de Corbel et Gill (1987) qui avaient utilisé 11 lectines différentes. De plus, ce système présente une typabilité restreinte avec une discrimination limitée comme le démontre l'étude de O'Sullivan *et al.* (1990). En effet, en utilisant les 5 lectines décrites par Wong *et al.* (1986) pour discriminer 376 isolats cliniques de *Campylobacter*, ils ont identifié 23 profils parmi lesquels 42 % des *C. jejuni* et 35 % des *C. coli* présentaient un profil identique (O'Sullivan *et al.*, 1990).

✓ Electrophorèse d'iso-enzymes

L'électrophorèse d'iso-enzymes, ou Multilocus Enzyme Electrophoresis, consiste en l'analyse du polymorphisme électrophorétique d'un ensemble d'enzymes solubles, polymorphisme relié ensuite à des variations alléliques dans les loci des gènes de structure des différentes enzymes. Cette technique est considérée comme une méthode génotypique indirecte (Selander *et al.*, 1986) et permet d'évaluer le niveau de diversité génétique au sein d'une population ainsi que les degrés de parenté existant entre des isolats, des populations ou des espèces bactériennes. En utilisant cette technique, Aeschaeber et Piffaretti (1989) ont mis en évidence un important degré de diversité chez *C. jejuni* et chez *C. coli* (respectivement 50 et 14 profils différents observés parmi 104 et 21 isolats de *C. jejuni* et de *C. coli*). De plus, ils ont observé des profils électrophorétiques identiques pour des isolats d'origine humaine et animale.

1.3.3. VARIABILITE GENOMIQUE

L'instabilité génétique est définie par Wassenaar comme un événement simple, ou une série d'évènements, menant à un changement de l'organisation d'une souche donnée de bactéries. Il exclut les mutations se produisant à une fréquence normale pendant la réplication, de l'ordre de 10^{-11} à 10^{-9} par paire de base par cellule et par génération pour les bactéries en général (Wassenaar, 2000). Toutefois, selon Meinersmann, ces mutations peuvent survenir tous les 600 à 60 000 individus si l'on considère un génome de 1,7 millions de paires de bases (Meinersmann, 2000).

Les résultats des études portant sur la caractérisation génotypique des *Campylobacter* font apparaître une grande variabilité génomique (Colles *et al.*, 2003). Ceci est en accord avec leur capacité à modifier leur matériel génétique via l'intégration d'ADN exogène par transformation naturelle (Wang et Taylor, 1990) et via des phénomènes de réarrangements au sein de leur propre ADN (Mills *et al.*, 1991).

Cette plasticité génétique pourrait être due à différents facteurs : un déficit des fonctions de réparation de l'ADN et/ou la présence de régions homopolymériques où de nombreux réarrangements génomiques sont susceptibles de se produire avec une fréquence élevée (Parkhill *et al.*, 2000 ; Park, 2002 ; Martinez-Rodriguez *et al.*, 2004). On peut en effet souligner, outre la transformation naturelle, différents processus responsables de cette instabilité génomique propre aux *Campylobacter*. Certains des réarrangements chromosomiques observés chez *Campylobacter* correspondent à des recombinaisons programmées de segments d'ADN ayant pour résultat l'inversion de gènes ou de promoteurs. D'autre part, des variations de profil PFGE peuvent être provoquées par des recombinaisons aléatoires des segments d'ADN correspondant le plus souvent à des duplications ou à des délétions (ce type de recombinaisons de grands fragments d'ADN est plus souvent observé chez *C. coli*) (Wassenaar, 2000). Toutefois, aucune activité d'éléments mobiles (insertions, transpositions ou suppressions de fragments d'ADN dus à des bactériophages, des transposons et des séquences d'insertion) n'a été rapportée pour *Campylobacter*. La fréquence de transposition est probablement trop basse pour être d'importance dans l'instabilité génétique observée chez *Campylobacter*. De nombreux bactériophages ont été décrits (plus de 170) mais il n'y a pas de données concernant l'insertion chromosomique d'ADN bactériophagique (Wassenaar, 2000).

La transformation naturelle est un des mécanismes potentiels du transfert horizontal de gènes, entraînant ainsi de la diversité génétique au sein d'une population. La compétence naturelle est un état physiologique permettant l'acquisition de matériel génétique par pénétration de molécules d'ADN nu présentes dans l'environnement (Dubnau, 1999). Les *Campylobacter* sont des bactéries naturellement compétentes pour lesquelles on observe une fréquence de transformation de l'ordre de 10^{-4} avec de l'ADN chromosomal comme source d'ADN (Wang et Taylor, 1990). La fréquence de transformation avec de l'ADN chromosomal homologue semble plus fréquente chez *C. coli* que chez *C. jejuni*. Par ailleurs, l'ADN hétérologue semble lui être intégré à une fréquence plus faible (Wang et Taylor, 1990). Le mécanisme de transformation naturelle de *Campylobacter* semble reposer sur la reconnaissance d'une séquence nucléotidique composée de quelques bases, comme c'est le cas chez *Neisseria gonorrhoeae* (Goodman et Scocca, 1988). Néanmoins, peu de choses sont connues concernant le mécanisme de transformation chez *C. jejuni*. Wiesner *et al.* (2003) tentent d'identifier les gènes du chromosome de *C. jejuni* qui codent pour les différents composants essentiels pour la transformation naturelle, comme par exemple ceux du système de sécrétion de type II. Ils concluent sur le fait que pour la transformation naturelle de *C. jejuni*, outre les composants du système de sécrétion de type II, il existe probablement d'autres systèmes et d'autres composants apportés dans l'ADN via l'environnement.

Les *Campylobacter*, naturellement compétents, et en particulier les *C. coli* peuvent également acquérir de l'ADN plasmidique. Richardson et Park, en 1997, ont montré l'intégration d'ADN plasmidique homologue par *C. coli*. Par ailleurs, on a mis également en évidence chez *C. coli* l'intégration d'ADN plasmidique non homologue (ADN ne présentant aucune similitude significative avec l'ADN génomique de *Campylobacter*) à des emplacements multiples sur le chromosome par recombinaison illégitime (Wassenaar, 2000). Cette capacité de *C. coli* à acquérir un plasmide hétérologue par transformation naturelle et à l'intégrer à son génome par recombinaison illégitime entraîne des implications importantes du point de vue de la diversité génomique et de l'évolution de l'espèce.

En effet, les plasmides transmis sont relativement souvent porteurs de caractéristiques particulières. Bacon *et al.* (2000) soulignent l'implication des plasmides dans la virulence de certains *C. jejuni* pathogènes. Par exemple, le plasmide circulaire pVir de *C. jejuni* 81-176 contient sept gènes qui codent pour des orthologues des protéines de sécrétion de type IV retrouvées chez *Helicobacter pylori* et cinq gènes qui sont impliqués dans l'invasion des

cellules épithéliales intestinales (Bacon *et al.*, 2002). Plusieurs auteurs ont également mis en évidence que les plasmides étaient porteurs d'une antibiorésistance (plasmides R) (Tenover *et al.*, 1985b) ou impliqués dans le mécanisme d'acquisition de la résistance, par exemple à la tétracycline (Taylor *et al.*, 1983 ; Cabrita *et al.*, 1992 ; Prasad *et al.*, 1994).

Ces facultés de variabilité génomique des *Campylobacter spp.* ont pu être observées également *in vivo* (De Boer *et al.*, 2002), où elles permettent une adaptation aux modifications de leur milieu et notamment l'acquisition de résistance aux antibiotiques (Kim *et al.*, 2006). Kim *et al.*, en 2006, ont ainsi mis en évidence le rôle de la transformation naturelle dans le transfert de la résistance à l'erythromicine à des souches de *C. coli*, résistance généralement associée à l'existence d'une mutation ponctuelle sur le gène 23S ARNr. Ces adaptations peuvent être très rapides, en effet, Delsol *et al.* (2004) ont montré que cinq jours de traitement à l'enrofloxaciné suffisaient pour que des *C. coli* développent des résistances aux fluoroquinolones

Cependant on remarquera que Manning *et al.* (2001) souligne la stabilité du génotype de *C. jejuni* 81116 souche de laboratoire depuis plus de 20 ans présentant un profil AFLP stable et identique aux profils de toute autre souche de sérotype P6/L6.

2. LES CAMPYLOBACTER : UN PROBLEME DE SANTE PUBLIQUE

2.1. UN DANGER AVERE POUR L'HOMME

2.1.1. IMPORTANCE : FREQUENCE ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE

2.1.1.1. Dans le Monde et en Europe

Les *Campylobacter* sont fréquemment à l'origine d'infections intestinales et constituent un problème majeur en hygiène des aliments.

Dans tous les pays industrialisés, les campylobactérioses sont au minimum en deuxième position des infections bactériennes d'origine alimentaire responsables de gastro-entérites (Skirrow, 1990). Dans de nombreux cas, elles précèdent même les salmonelloses, comme c'est le cas en Europe, aux Etats-Unis ou en Nouvelle-Zélande.

En Europe, en se limitant uniquement aux cas déclarés, les *Campylobacter* apparaissent déjà comme les pathogènes les plus fréquemment isolés dans les intoxications alimentaires, devant les *Salmonella* : en 2005, l'incidence des campylobactérioses en Europe était de 51,6 cas pour 100 000 habitants contre 38,2 pour les salmonelloses (EFSA, 2006). En 2006, le rapport annuel communautaire de l'EFSA (Autorité européenne de sécurité des aliments) et de l'EDCD (Centre européen de prévention et de contrôle des maladies) souligne une diminution du nombre d'infection à *Campylobacter* et à *Salmonella* (respectivement 46,1 cas et 35,6 cas pour 100 000 habitants) (Tableau 9) (EFSA, 2007). Néanmoins, les infections à *Campylobacter* figurent encore en tête de liste des zoonoses signalées chez l'Homme et plus de 175 000 personnes au sein de l'UE ont souffert de campylobactérioses en 2006.

En Angleterre et au Pays de Galles, entre 1996 et 2000, *Campylobacter* a été à l'origine de 160 788 soins médicaux et 15 918 hospitalisations (Adak *et al.*, 2005). En France, le Centre National de Référence a reçu 2675 souches en 2006 et 3058 souches en 2007 (respectivement 2280 et 2855 ont pu être identifiées comme étant des *Campylobacter*) (Espié *et al.*, 2007 ; King *et al.*, 2008).

Tableau 9 : Cas rapportés de campylobactérioses chez l'Homme en Europe entre 2002 et 2006 ; nombre total de cas rapportés, nombre de cas confirmés et incidence pour les cas confirmés en 2006 en Europe. Source : EFSA, 2007

Country	2006				2005	2004	2003	2002
	Report type ²	Total cases	Con-firmed cases	Confirmed cases/100,000 population				
Austria	C	5,020	5,020	60.7	5,065	5,365	3,926	4,446
Belgium	C	5,771	5,771	54.9	6,879	6,716	6,556	7,354
Cyprus	C	2	2	0.3	-	-	-	-
Czech Republic	C	22,713	22,571	220.2	30,268	25,492	-	-
Denmark	C	3,239	3,239	59.7	3,677	3,724	3,537	4,385
Estonia	C	124	124	9.2	124	124	98	114
Finland	C	3,439	3,439	65.4	4,002	3,583	3,190	3,738
France	C	2,675	2,675	4.2	2,049	2,127	1,997	1,353
Germany	C	52,035	52,035	63.1	62,114	55,796	47,876	56,350
Greece					-	392	1	-
Hungary	C	6,829	6,807	67.6	8,288	9,087	-	-
Ireland	C	1,812	1,810	43.0	1,801	1,710	1,568	1,336
Italy					-	-	1	5
Latvia					-	-	1	3
Lithuania	A	624	624	18.3	694	797	617	
Luxembourg	C	285	285	62.0	194	-	-	-
Malta	C	54	54	13.4	91	-	-	-
Netherlands	C	3,401	3,186	19.5	3,761	3,273	2,805	3,421
Poland	C	157	156	0.4	47	24	-	-
Portugal					-	-	-	-
Slovakia	C	2,788	2,718	50.4	2,204	1,691	1,195	1,267
Slovenia	C	944	944	47.1	-	1,063	890	-
Spain	C	5,889	5,889	13.5	5,513	5,958	6,048	5,051
Sweden	C	6,078	6,078	67.2	5,969	6,169	7,149	7,137
United Kingdom	C	52,134	52,134	86.3	52,686	50,388	52,126	54,372
EU Total		176,013	175,561	46.1	195,426	183,479	139,581	150,332
Bulgaria ³	A	75	0	0	-	-	-	-
Iceland	C	117	117	39.0	128	-	-	-
Liechtenstein	C	10	10	0.2	-	-	-	-
Norway	C	2,588	2,588	55.8	2,631	-	-	-
Romania ³					-	-	-	-
Switzerland	C				5,259	5,584	5,692	6,740
Total		178,806	178,276	45.3	203,444	189,063	145,273	157,072

1. EU-total incidence is based on population in reporting countries
Number of confirmed cases for 2005 and number of total cases for 2002-2004

2. A: aggregated data; C: case-based data

3. EU membership began in 2007

Aux Etats-Unis, les infections à *Campylobacter* sont suivies depuis le début des années 80 par différents réseaux de surveillance, en particulier depuis 1996 par le programme Foodnet (Foodborne Disease Active Surveillance Network). On estime que l'incidence annuelle des campylobactérioses est deux fois supérieure à celle des salmonelloses, ce qui en fait la principale cause d'intoxication alimentaire dans ce pays entre 1996 et 2000 (Friedman *et al.*, 2000). En 2004, un rapport préliminaire sur les données du programme Foodnet fait état d'une diminution de 27% de l'incidence des campylobactérioses entre 1996 et 2001 (Friedman *et al.*, 2004), diminution qui se poursuit en 2004 (CDCP, 2004).

En Nouvelle-Zélande, le taux de campylobactérioses est relativement élevé comparé à d'autres pays, avec environ 12 000 à 14 000 cas notifiés par an (soit une incidence annuelle de 300 cas pour 100 000 habitants) (Nelson et Harris, 2006). En 1998, le nombre de cas était de 11 573, en 2003 de 14 790 et en 2004 de 12 213 (Lake *et al.*, 2005). Par ailleurs, ces auteurs estiment approximativement à 75 000 les cas annuels alimentaires de campylobactérioses.

Il faut cependant être conscient qu'étant donné l'extrême diversité du mode de déclaration des épidémies¹, les chiffres ne reflètent certainement que grossièrement la réalité. En effet, les chiffres avancés par les différents auteurs varient dans des proportions très importantes selon qu'ils se fondent sur des estimations tenant compte des cas sporadiques non déclarés ou qu'ils se limitent aux cas certifiés. Quoiqu'il en soit, il y a un consensus pour affirmer que le nombre total de cas déclarés augmente chaque année dans de nombreux pays industrialisés (Takkinen *et al.*, 2003).

L'étude menée en Europe dans 24 états membres fait état de 176 013 cas recensés de campylobactérioses alors que 167 240 cas recensés de salmonelloses ont été identifiés en 2006 (Tableau 9). Si on y ajoute une estimation du nombre de campylobactérioses non déclarées, les chiffres obtenus montrent alors une incidence très élevée, sans doute plus proche de la réalité (Tableau 10).

¹ Epidémie : D'une manière générale, une épidémie est définie par un regroupement spatio-temporel d'un nombre de cas supérieur au nombre de cas attendu, ces cas étant recensés durant la même période, dans la même aire géographique et avec le même système de surveillance que celui utilisé dans les années antérieures. Le terme « cas groupés » qui sous-entend une propagation de la maladie associée à un grand nombre de cas semble ici plus approprié.

Tableau 10 : Importance des campylobactérioses dans le monde occidental : estimation du total des cas de campylobactérioses par an dans 3 pays occidentaux

	USA	Royaume Uni	France
Nombre d'infections à <i>Campylobacter</i> par an cas confirmés ou non	2,1 à 2,4 millions Friedman <i>et al.</i>, 2000 CDCP, 2006	337 655 Adak <i>et al.</i>, 2005	800 000 à 2 millions 18845 confirmés microbiologiquement Gallay <i>et al.</i>, 2007a
Incidence annuelle Cas estimés pour 100 000 habitants	880 Friedman <i>et al.</i>, 2000	690 Adak <i>et al.</i>, 2002	1660 à 2730 cas estimés 31 confirmés microbiologiquement Gallay <i>et al.</i>, 2007a

Dans les pays en voie de développement, la prévalence des campylobactérioses est aussi très importante, en liaison avec une hygiène insuffisante et la promiscuité avec les animaux d'élevage. Dans ces pays, on compte de nombreux porteurs sains suite à des infections précoces et répétées et à la mise en place d'une immunité, notamment chez les enfants (Diarra, 1993). A partir du moment où des mesures d'hygiène sont mises en place, l'isolement de *C. jejuni* se fait plus rare chez les sujets sains et les taux se rapprochent de ceux des pays développés.

2.1.1.2. En France

En France, d'après un rapport de l'Institut de Veille Sanitaire publié en 2004, les campylobactérioses seraient en deuxième position des infections responsables de gastro-entérites (16 000 à 21 600 cas confirmés et 3 200 à 3 400 hospitalisations par an, soit 27 à 37 cas pour 100 000 habitants par an) et, en se fondant sur le nombre d'hospitalisations, en deuxième position des maladies infectieuses d'origine alimentaire (Vaillant *et al.*, 2005).

Entre 1997 et 2000, les campylobactérioses représentaient 0,4% des Toxi-Infection Alimentaire Collective (TIAC²) faisant l'objet de déclaration obligatoire.

Ce chiffre sous-estime largement la réalité puisque les données présentées se limitent aux déclarations et les *Campylobacter* thermotolérants sont très rarement en cause dans les anadémies³ de grande ampleur faisant l'objet d'une déclaration obligatoire. Ainsi Gallay *et al.*, en 2007, dans une synthèse sur la surveillance des infections à *Campylobacter* en France entre 2004 et 2005, soulignaient que les chiffres de 18 845 cas confirmés microbiologiquement, soit une incidence de 31 cas pour 100 000 habitants par an, étaient probablement inférieurs aux valeurs réelles d'incidence des campylobactérioses (Tableau 10) (Gallay *et al.*, 2007a). La répartition des laboratoires hospitaliers participant à la surveillance n'est pas homogène sur l'ensemble des départements et le nombre de souches par département d'isolement envoyées au Centre National de Référence reflète ainsi la participation des laboratoires (Figure 6) (Gallay *et al.*, 2007a).

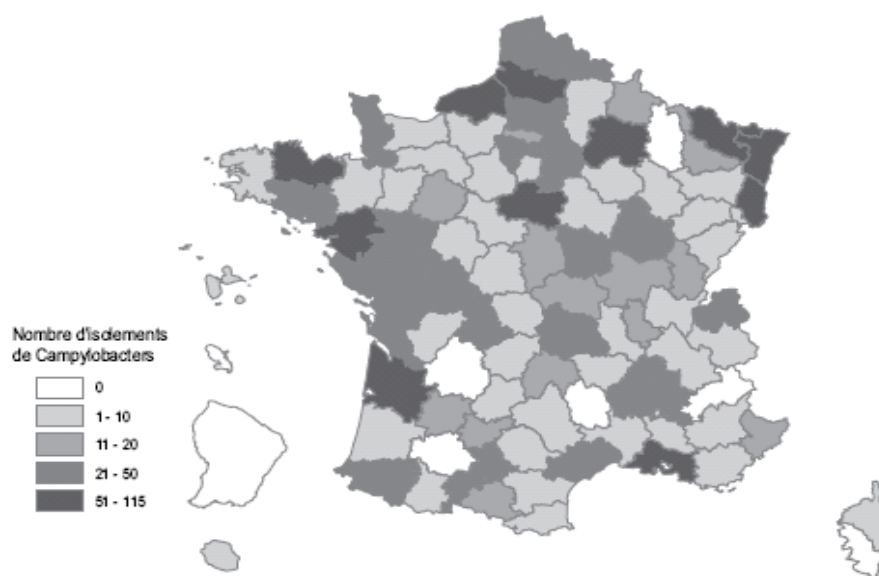


Figure 6 : Nombre d'isollements de *Campylobacter* par département en France en 2005.

Source : Gallay *et al.*, 2007a

²TIAC : une toxi-infection alimentaire collective à *Campylobacter* est définie par un regroupement spatio-temporel d'au moins deux cas dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire.

³ Anadémie : maladie non contagieuse pouvant être contractée à partir d'une source commune chez l'Homme (on parle d'anazootie pour les animaux).

De plus, il existe un défaut de diagnostic des campylobactérioses (Gallay *et al.*, 2004 ; Gallay *et al.*, 2005) dû :

- à un diagnostic bactériologique techniquement difficile, aussi bien chez l'Homme que dans l'aliment incriminé,
- à une durée d'incubation parfois longue de la maladie (de 1 à 10 jours) qui rend plus difficile l'établissement du lien avec l'aliment contaminé,
- à une majorité de campylobactérioses bénignes ne faisant pas l'objet d'une consultation et/ou d'une recherche de *Campylobacter*
- à l'absence de recherche systématique par les laboratoires de *Campylobacter* dans les coprocultures contrairement à *Salmonella*,
- au manque de sensibilisation des médecins.

La prise en compte de tous ces éléments amène certains auteurs à placer *Campylobacter* en tête des causes d'infections intestinales bactériennes en France comme dans les autres pays industrialisés (AFSSA, 2004). Ils considèrent également que le nombre de cas de campylobactérioses est actuellement en augmentation.

Globalement, jusqu'en 2002, la surveillance de l'infection est restée partielle puisqu'elle reposait sur le Centre National de Référence des *Campylobacter* et des *Helicobacter* de Bordeaux (CNRCH) en lien avec 15 laboratoires hospitaliers et l'Institut National de Veille Sanitaire (InVS). Le système a pris de l'ampleur en avril 2002 avec l'ajout de laboratoires privés d'analyses de biologie médicale volontaires (661 réponses favorables sur les 1389 laboratoires sollicités) (Gallay *et al.*, 2003 ; Gallay *et al.*, 2004). En 2007, 10% des 3853 laboratoires privés et hospitaliers réalisant des analyses bactériologiques ont envoyé des souches au CNRCH (*versus* 9% en 2006) (King *et al.*, 2008).

Les laboratoires participants recherchent systématiquement *Campylobacter* dans toute coproculture et envoient volontairement les souches qu'ils isolent au CNRCH avec une fiche d'informations épidémiologiques. Pour chaque souche, le CNRCH caractérise l'espèce, réalise des tests de sensibilité aux antibiotiques et signale hebdomadairement les cas groupés à l'InVS, qui met en œuvre, si besoin, une investigation en vue d'identifier une éventuelle source de contamination commune (Figure 7).

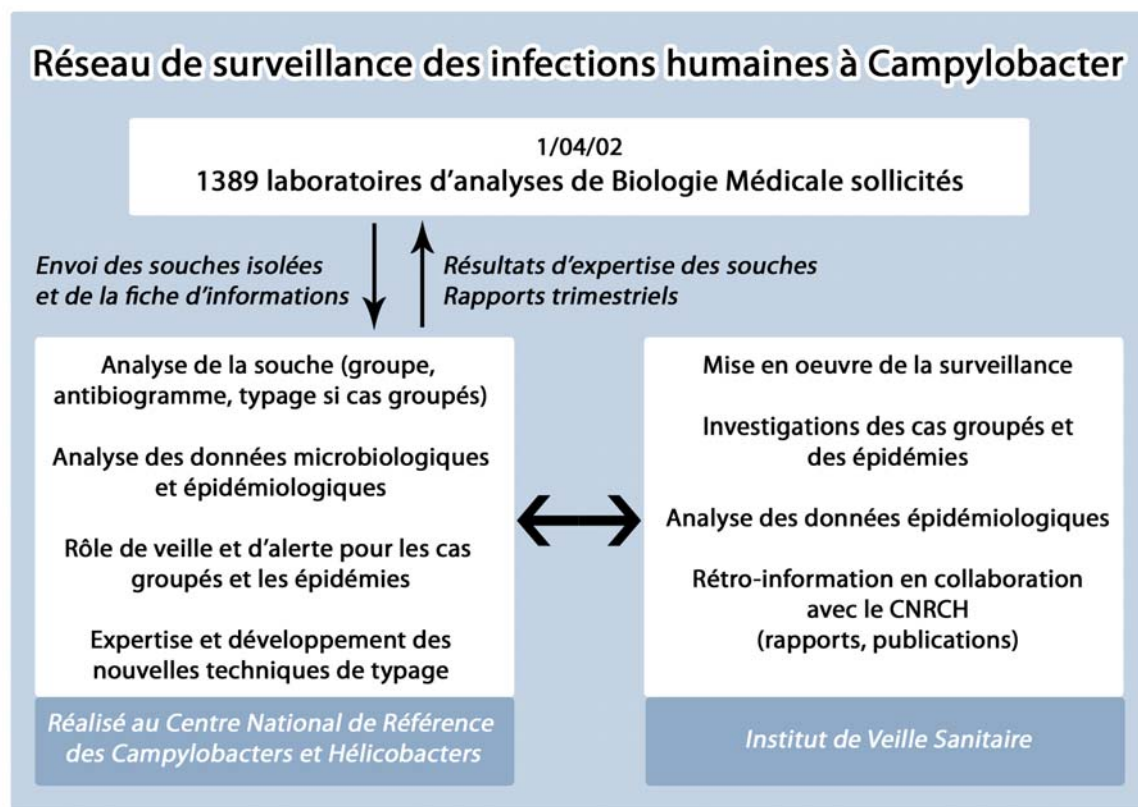


Figure 7 : Réseau de surveillance des infections humaines à *Campylobacter* en France.

Source : Gallay *et al.*, 2003

Ce tout récent réseau d'épidémiosurveillance associé à la caractérisation des souches de *Campylobacter* par des méthodes de typage moléculaire devrait augmenter la sensibilité de détection des cas groupés en identifiant les souches ayant les mêmes caractéristiques. Néanmoins, malgré un regain d'intérêt des pouvoirs publics pour les campylobactérioses et le lancement de réflexions nationales (création d'un groupe de travail au sein de l'AFSSA et enquêtes cas-témoins par l'Institut national de Veille Sanitaire des facteurs de risques des campylobactérioses en 2002), l'importance des infections à *Campylobacter* reste largement méconnue en France.

2.1.2. ESPECES EN CAUSE

La plupart des infections dues à des *Campylobacter* sont le fait de *Campylobacter* thermotolérants : 93,5% des *Campylobacter* identifiés au Centre National de Référence français sont thermotolérants, que ce soit entre 2004 et 2005 ou en 2006, 95% en 2007

(Gallay *et al.*, 2007a ; Espié *et al.*, 2007 ; King *et al.*, 2008). Quatre espèces de *Campylobacter* thermotolérants sont reconnus comme étant pathogènes pour l'Homme, mais leurs impacts sont très différents (Tableau 11).

Tableau 11 : Répartition des espèces des espèces de *Campylobacter* et bactéries apparentées identifiées au Centre National de Référence par type de prélèvement, France, 2007. Source : King *et al.*, 2008

Espèces	Selles	Hémocultures	Autre prélèvements	Inconnu	Total (%*)
<i>C. jejuni</i>	2187	29	2	13	2231 (78,1)
<i>C. coli</i>	462	5	1	5	473 (16,6)
<i>C. fetus</i>	29	70	3	12	114 (4,0)
<i>A. butzleri</i>	18	0	0	0	18 (0,6)
<i>C. lari</i>	7	2	0	0	9 (0,3)
<i>C. upsaliensis</i>	5	0	0	0	5 (0,2)
<i>A. cryaerophila</i>	1	0	0	0	1 (0,04)
<i>H. canadensis</i>	4	0	0	0	4 (0,1)
Inconnu**	197	5	0	1	203
Total	2910	111	6	31	3058

C : Campylobacter ; A : Arcobacter ; H : Helicobacter ; * % calculé sur le total de souches identifiées ; ** absence de subculture.

C. jejuni est responsable de 77 à 90 % des cas de gastro-entérites provoquées par *Campylobacter* chez l'Homme, *C. coli* arrive en deuxième position et est mis en cause dans 3 à 16 % des cas alors que *C. lari* et *C. upsaliensis* sont plus rarement impliqués dans des infections humaines (Tauxe *et al.*, 1985 ; Goossens *et al.*, 1990 ; Labarca *et al.*, 2002 ; Gallay *et al.*, 2007a). Néanmoins, une étude colombienne, citée par Fernandez, révélait la présence de *C. lari* chez 4,8 % des enfants diarrhéiques (Fernandez, 1992).

D'autres *Campylobacter*, non thermotolérants, sont également pathogènes pour l'Homme, parmi ceux-ci les *C. fetus* sont les plus fréquemment rencontrés (4-5%) et arrivent en 3^e position des *Campylobacter* isolés sur des malades. *C. fetus* est responsable de 90% des septicémies à *Campylobacter*.

La grande majorité des souches a été isolée à partir de selles (95,2 %) et 3,6 % ont été isolées à partir d'hémocultures (Tableau 11). *C. jejuni* était majoritairement retrouvé dans les

selles (80,6 %), alors que *C. fetus* représentait 66,0 % des souches isolées à partir d'hémocultures (King *et al.*, 2008)

En France, trois espèces sont majoritairement impliquées dans les campylobactérioses chez l'Homme : *C. jejuni*, *C. coli* et *C. fetus* (les fréquences pour ces trois espèces sont respectivement de 89 %, 9,8% et 1,2% en 2003 selon l'étude de Weber *et al.* (2003) ; 77,6 % ; 15,7 % et 5,3 % entre 2004 et 2005 selon l'étude de Gallay *et al.* (2007a) ; 78,1% ; 16,6% et 4,0% en 2007 selon l'étude de King *et al.* (2008)). Les *Arcobacter* et les *Helicobacter*, proches des *Campylobacter*, font partie des bactéries apparentées et peuvent également être impliquées dans des infections humaines.

Ce schéma général est à nuancer selon les pays avec des variations dans les proportions sans pour autant remettre en cause la prépondérance des *C. jejuni*, d'autant qu'une part des variations est vraisemblablement liée aux différences dans les systèmes de surveillance et dans les méthodes d'identification (Gallay *et al.*, 2005). Le nombre de cas impliquant *C. coli* est différent selon les pays : avec une fréquence de 17% en France, de 11% en Belgique, de 5% aux Pays-Bas et inférieure à 1% aux Etats-Unis (Vandenberg *et al.*, 2004). *C. coli* semble également plus présent dans les pays sous-développés (Taylor *et al.*, 1992), ainsi qu'en Europe de l'Est (Kalenic *et al.*, 1985).

2.1.3. POPULATION TOUCHEE ET SAISONNALITE

2.1.3.1. Population touchée et sensibilité à l'infection

Tous les groupes d'âge sont affectés, le maximum d'incidence étant observé chez le nourrisson et le jeune enfant ainsi que chez les personnes âgées de plus de 65 ans (Friedman *et al.*, 2000 ; Espié *et al.*, 2007 ; Gallay *et al.*, 2007a ; King *et al.*, 2008) (Figure 8a). Dans l'Union Européenne, en 2005, on observe une prédominance des cas humains de campylobactérioses parmi les catégories d'âge 1-4 ans et 25-55 ans (EFSA, 2006) et en 2006, la plus grande incidence est observée pour les enfant de moins de 5 ans (EFSA, 2007) (Figure 8b). Lors de cette enquête, la forte proportion d'individus ayant souffert de campylobactérioses chez les 25-44 ans et chez les 45-64 ans est à nuancer étant donné qu'il s'agissait de deux catégories couvrant une gamme d'âge plus large et par conséquent avec en

proportion un plus grand nombre de personnes comparativement aux catégories concernant des personnes plus jeunes ou plus âgées.

La sensibilité de l'hôte intervient fortement dans la susceptibilité à développer une campylobactériose et dans l'expression clinique. De plus, la médicalisation plus importante des individus en bas-âge et des personnes âgées peut également expliquer une proportion de cas détectés plus élevée par rapport à d'autres catégories moins médicalisées.

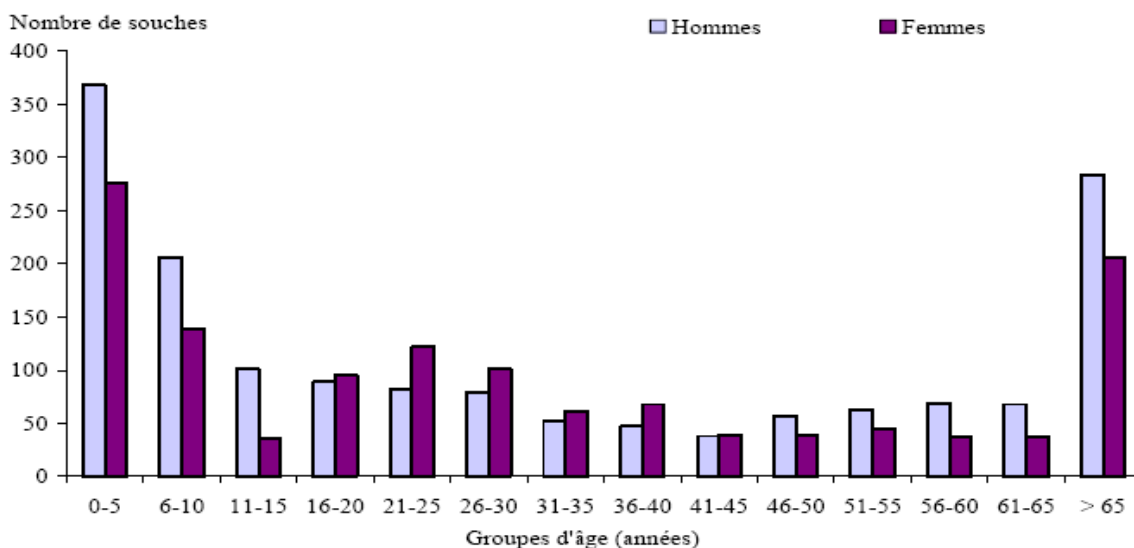


Figure 8a : Fréquence des isolations de *Campylobacter* selon l'âge et le sexe en France en 2007. Source : King *et al.*, 2007

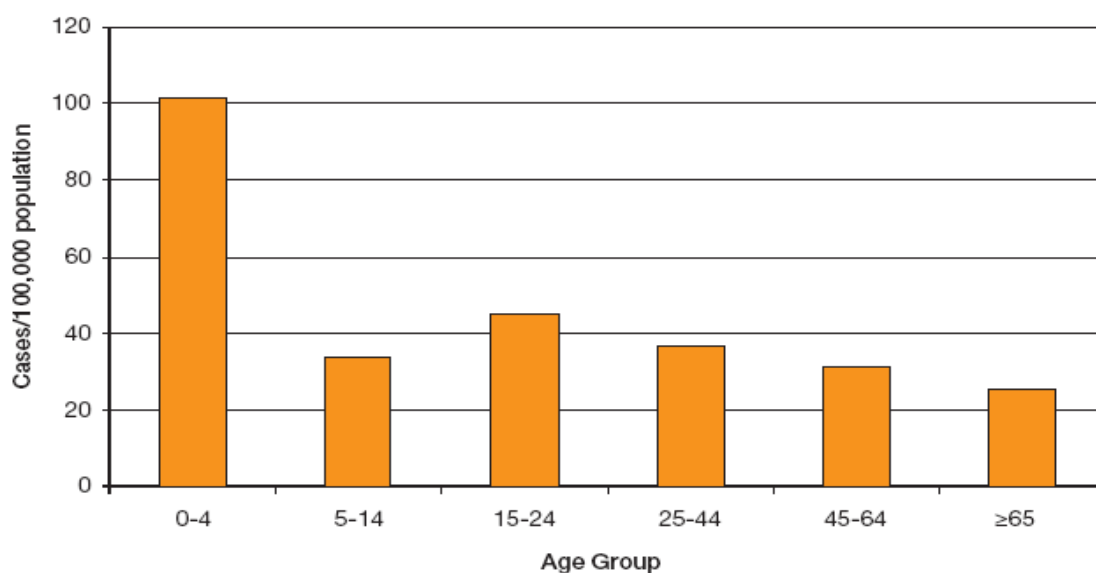


Figure 8b : Incidence de *Campylobacter* selon les catégories d'âge en Europe en 2006. Source : EFSA, 2007

La sévérité des signes cliniques varie selon les individus (Butzler, 2004). Des facteurs génétiques, immunitaires (la sensibilité est augmentée chez les individus naïfs tels que les nourrissons, chez les personnes immuno-déprimées et/ou âgées) et liés au sexe (les hommes sont plus souvent touchés que les femmes) sont en cause. Néanmoins, le bilan de la surveillance des infections à *Campylobacter* chez l'Homme en France en 2007 rapporte qu'un nombre plus important de souches de *Campylobacter* a été isolé chez les femmes âgées de 16 à 40 ans comparé aux hommes. L'inverse était observé chez les enfants et les personnes âgées de plus de 40 ans (King *et al.*, 2008).

2.1.3.2. Saisonnalité

De nombreux auteurs rapportent une recrudescence des cas de campylobactérioses pendant les mois les plus chauds, en particulier, on observe une augmentation des cas pendant les mois d'été à partir de juin jusqu'à octobre dans l'Union Européenne (EFSA, 2006 et 2007). En France, une recrudescence saisonnière des isollements de *Campylobacter* a été observée pendant la période estivale et 35,5% des souches ont été isolées entre juin et août 2007. Cette saisonnalité est, comme en 2006, plus marquée pour *C. jejuni* (Figure 9a et 9b).

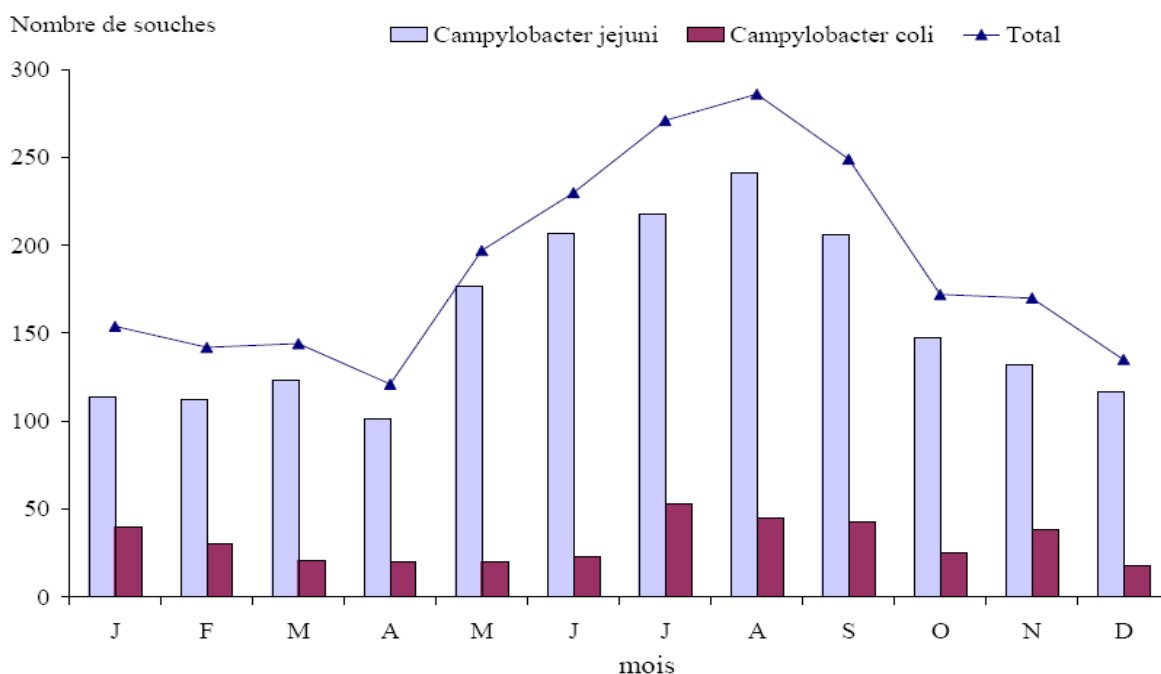


Figure 9a : Nombre d'isollements de *Campylobacter* selon le mois de prélèvement de l'échantillon biologique et l'espèce, France, 2006. Source : Espié *et al.*, 2007

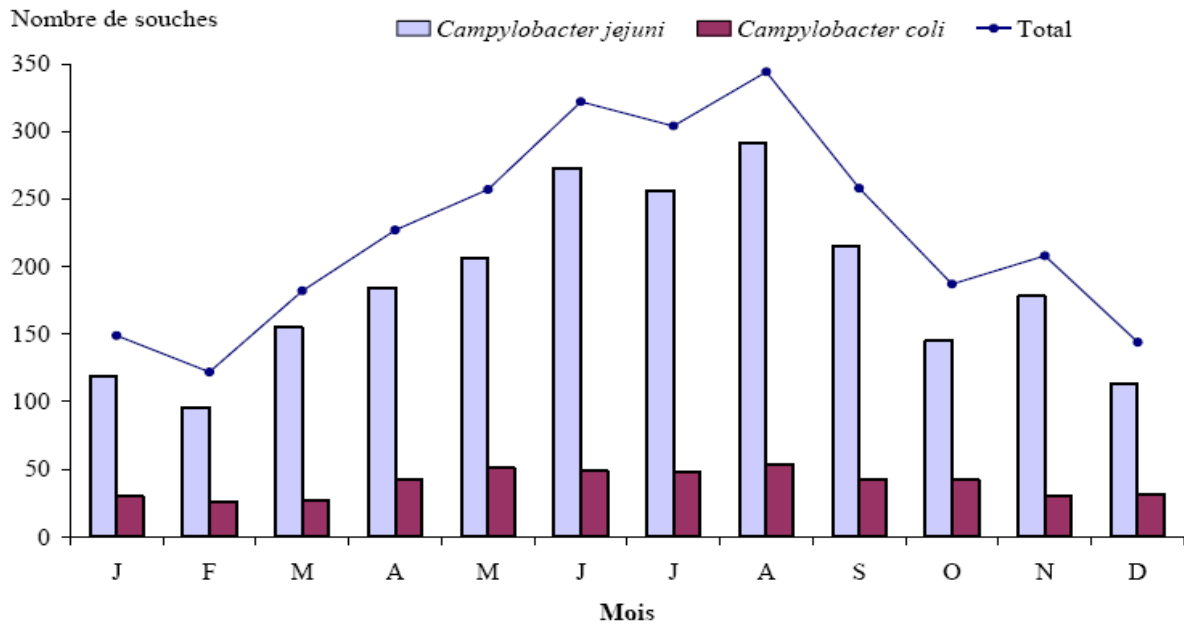


Figure 9b : Nombre d'isolations de *Campylobacter* selon le mois de prélèvement de l'échantillon biologique et l'espèce, France, 2007. Source : King *et al.*, 2007

Un pic pendant les mois d'été (de novembre à février) est également observé en Nouvelle-Zélande (Nelson et Harris, 2006). Les pics de cas observés au printemps et en été dans les pays tempérés, comme c'est le cas en France (Figure 9a et 9b) (Gallay *et al.*, 2003 ; Espié *et al.*, 2007 ; King *et al.*, 2008), pourraient s'expliquer par les changements d'habitudes alimentaires observés en été avec une augmentation de la consommation de viandes grillées au barbecue (grillades de poulet, de bœuf, de porc) (Nylen *et al.*, 2002). Dans ces circonstances, les règles d'hygiène sont souvent moins respectées, les risques de contaminations croisées par contact de la viande crue avec d'autres aliments ou la probabilité de consommer des viandes peu cuites sont ainsi augmentés.

2.1.3.3. Mouvements de personnes : influence des voyages

Dans l'étude réalisée en France, en 2006, 111 patients parmi les 673 pour lesquels l'information était disponible ont mentionné un voyage dans un pays étranger dans les 15 jours précédant le début de leurs symptômes (Espié *et al.*, 2007). En 2007, l'information était disponible pour 867 patients, 137 avaient mentionné un voyage dans un pays étranger. Les

destinations les plus fréquemment citées étaient l'Afrique du Nord, l'Afrique Sub-saharienne et l'Asie. L'étude sur les facteurs de risque de survenue des infections sporadiques à *Campylobacter* en France a mis en évidence une association avec un voyage à l'étranger (Gallay, 2006).

2.1.4. IMPACT

L'impact des campylobactérioses le plus évident est l'impact sur la santé humaine. Il se décline selon trois aspects :

- la morbidité (gastro-entérites) : elle entraîne des consultations médicales, des arrêts de travail et des frais d'hospitalisation,
- la mortalité, peu étudiée à ce jour (Havelaar *et al.*, 2000),
- le syndrome de Guillain-Barré, complication rare mais grave.

Cet impact sur la santé humaine a été chiffré aux Pays-Bas entre 1990 et 1995 par Havelaar *et al.* (2000) en une unité de mesure de santé publique appelée DALY (Disability Adjusted Life Year) qui correspond à la somme des années de vie perdues du fait d'une mortalité prématurée ou des années de vie avec une incapacité, cette somme étant pondérée par un facteur allant de 0 à 1 selon la sévérité de la maladie. Cet impact a été chiffré pour les campylobactérioses à 1403 DALY, ce qui implique que pour une population de 15 millions d'habitants, environ 0,01% de toutes les années de vie perdues sont dues à cette infection (Havelaar *et al.*, 2000).

Par ailleurs, l'impact économique des campylobactérioses a pu être évalué aux Etats-Unis : il a été estimé entre 1,5 et 8 milliards de dollars par an, dont 0,2 à 1,8 milliards imputables aux syndromes de Guillain-Barré consécutifs aux campylobactérioses (Buzby *et al.*, 1997). L'incidence du syndrome de Guillain Barré (SGB) est estimé de 0,5 à 1,5 cas pour 100 000 personnes et s'ensuit d'un décès dans 5% des cas ou d'invalidité sévère dans 10% des cas. Dans une étude finlandaise, on estime à 1 sur 3000 le nombre de cas de SGB suivant une infection par *Campylobacter* (MacCarthy et Giesecke, 2001). En France, aucun travail n'a estimé le coût financier des campylobactérioses, néanmoins, une étude récente, réalisée dans un hôpital français, a confirmé que *C. jejuni* était bien la cause la plus fréquente des cas de SGB (Sivadon *et al.*, 2005).

L'impact des campylobactérioses sur les populations humaines est donc important aussi bien en terme de santé que sur le plan économique. Il explique l'enjeu que représente la lutte contre les *Campylobacter* dans les aliments, lutte qui pourrait avoir elle aussi dans l'avenir un impact économique sur les filières de volailles et de porcs.

Pour toutes ces raisons les organisations internationales pour la santé se préoccupent d'ailleurs de plus en plus des campylobactérioses, comme l'illustre la création de 14 groupes de travail sur les campylobactérioses au sein de la FAO-OMS (AFSSA, 2004).

2.2. ETUDE EPIDEMIO-CLINIQUE

2.2.1. FORME EPIDEMIOLOGIQUE DES CAMPYLOBACTERIOSES

Les campylobactérioses digestives humaines peuvent revêtir différentes formes épidémiologiques :

- une maladie professionnelle,
- une anadémie (en collectivité fermée ou ouverte),
- un cas sporadique.

Aujourd'hui, la très grande majorité des infections à *Campylobacter* revêt une forme sporadique. Ceci est expliqué par de nombreux auteurs par l'absence de multiplication de *Campylobacter* dans les aliments entraînant des difficultés d'isolement et par une durée d'incubation parfois longue de la maladie (jusqu'à 10 jours). De ce fait, un nombre indéterminé d'anadémies n'est vraisemblablement pas diagnostiqué. Néanmoins, il existe une dichotomie entre d'une part, les Etats-Unis et l'Europe du Nord, où de réelles épidémies de campylobactérioses sont assez fréquentes, et, d'autre part, l'Europe occidentale, où elles ne sont pratiquement pas observées. Certains auteurs suggèrent que des cas dits sporadiques pourraient en réalité être des anadémies diffuses non détectées ayant pour origine un même aliment contaminé mais sur une grande aire géographique et avec peu de cas (AFSSA, 2004).

Cette rareté globale des anadémies de campylobactérioses complique l'étude de l'épidémiologie de la maladie. On est face à un paradoxe : la campylobactériose est l'une des plus fréquentes gastro-entérites d'origine alimentaire, mais sa transmission à l'Homme est encore peu comprise.

2.2.2. SIGNES CLINIQUES

Le plus souvent, les *Campylobacter* sont responsables chez l'Homme d'une gastro-entérite aigüe et peu spécifique qui dure dans la majorité des cas moins d'une semaine (80% des cas) et qui se manifeste généralement par une diarrhée (90% des cas) (Gallay *et al.*, 2005). Elle peut se compliquer de bactériémie, de localisations secondaires et d'un syndrome post-infectieux. Les signes cliniques et les symptômes ne s'expriment pas avec la même intensité, ni avec la même fréquence chez tous les malades : d'un bref épisode de gastro-entérite à une entérocolite sévère durant plusieurs semaines, accompagnée de douleurs abdominales et d'une diarrhée sanglante (Ketley, 1997). La durée d'incubation est longue, on compte en moyenne de un à dix jours.

2.2.2.1. Tableau et évolution clinique d'une campylobactériose digestive (Figure 10)

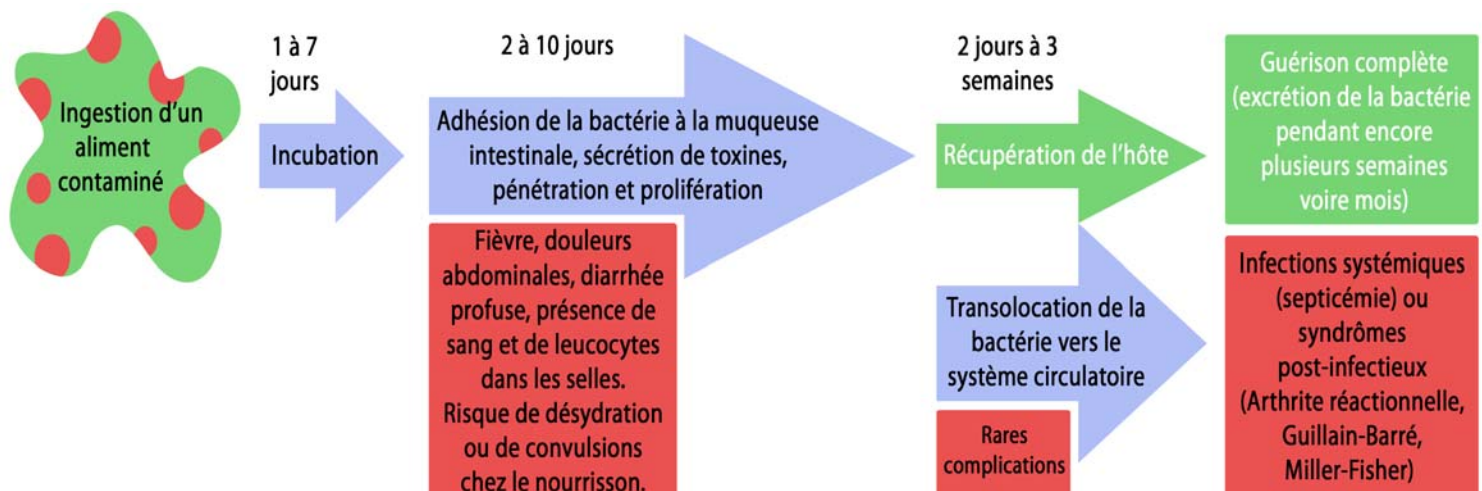


Figure 10. Tableau et évolution clinique d'une campylobactériose digestive

✓ Phase prodromique

Elle dure de quelques heures à quelques jours. Les premiers signes sont variables : fièvre modérée à forte, malaises, maux de tête, anorexie, douleurs musculaires et articulaires, asthénie.

✓ Phase diarrhéique

Elle dure de deux à dix jours. La diarrhée inflammatoire peut être profuse, aqueuse ou muqueuse, avec des douleurs abdominales. Les matières fécales contiennent des leucocytes, du sang en nature ou du méléna et un exsudat. L'inflammation concerne préférentiellement le côlon. Des manifestations telles que fièvre, douleurs abdominales, diarrhée sanglante et nausées sont communément observées pendant la phase d'état. La variété, l'intensité et la durée des signes cliniques varient selon les individus, notamment en fonction de leur capacité de réponse immunitaire.

✓ Phase de récupération

Elle dure de deux jours à trois semaines. La guérison intervient le plus souvent en moins d'une semaine. Cependant la douleur abdominale peut durer jusqu'à six semaines. Le patient reste excréteur du germe pendant deux à cinq semaines voire plusieurs mois. Un traitement antibiotique adapté élimine la bactérie et interrompt l'excrétion fécale. Les rechutes sont possibles.

✓ Décès rares

Les décès sont rares (létalité inférieure à 0.1 %) et surviennent surtout chez des personnes immunodéprimées, des enfants en bas-âge ou des personnes âgées. Cependant, Helms *et al.*, en 2003, signalent une mortalité importante au Danemark après des épisodes de campylobactérioses.

2.2.2.2. Existence de complications rares mais graves

✓ Complications suite à une entérite

Des complications locales non spécifiques de type appendicite, péritonite, adénite mésentérique, pancréatite et cholécystite ont été décrites mais sont exceptionnelles.

Chez le nourrisson, un risque de déshydratation et de convulsion existe. L'allaitement maternel protège en partie de l'expression clinique de l'infection (Nachamkin *et al.*, 1994) mais les symptômes peuvent alors être maximaux au moment du sevrage. Dans les pays en voie de développement où l'exposition est très fréquente, on observe souvent un portage asymptomatique chez les enfants. En effet, du fait d'infections successives par *Campylobacter*, une immunité s'installe chez ces enfants qui deviennent alors des porteurs asymptomatiques (Diarra *et al.*, 1993).

✓ Risques d'infections systémiques

Les *Campylobacter* sont des bactéries invasives qui peuvent migrer du tractus digestif vers la circulation sanguine. Cependant, ce cas de figure reste très rare notamment pour les entérites dues à des *Campylobacter* thermotolérants avec une fréquence de bactériémies et de septicémies détectées de 0,1 % (Skirrow et Blaser, 1995). Néanmoins, *C. fetus* est souvent associé à une infection systémique chez des patients déjà immunodéprimés. Les bactériémies et septicémies éventuelles s'accompagnent de fièvre et sont à l'origine de localisations secondaires : endothélium vasculaire, os, articulations, méninges (Canton *et al.*, 1989). En général, *C. fetus* est impliqué dans 90 % de ces infections avec un aspect allant de la simple bactériémie avec peu de fièvre et disparaissant rapidement à une véritable septicémie associée à une longue période fébrile (Mandal *et al.*, 1984).

Comme pour de nombreuses autres infections, une campylobactériose pendant une grossesse peut présenter un danger pour la femme et le fœtus : une bactériémie puis une infection intra-utérine peuvent entraîner un avortement, une naissance prématurée ou une mortalité néonatale (Euzéby, 2002). Une hygiène alimentaire stricte pendant la grossesse est donc préconisée.

✓ Syndromes post-infectieux

Comme d'autres bactéries entéropathogènes, les *Campylobacter* peuvent entraîner des syndromes post-infectieux tels que l'arthrite réactionnelle (syndrome de Reiter) (Eastmond *et al.*, 1981 ; Canton *et al.*, 1989), l'érythème noueux (Eastmond *et al.*, 1982) ou l'urticaire

(Bretag *et al.*, 1984) (ces complications se produisent dans moins de 1 % des cas) (Bereswill et Kist, 2003).

Toutefois, le syndrome de Guillain-Barré (SGB) (Guillain *et al.*, 1916) survient plus fréquemment : on estime que 20 à 50 % des cas seraient dus à une infection à *Campylobacter* (Mishu *et al.*, 1993 ; Vriesendorp *et al.*, 1993 ; Gallay *et al.*, 2005) et environ 0,05 % des infections par *Campylobacter* sont suivies de complications de type SGB (Allos, 2001). On estime l'incidence des cas de SGB consécutifs à une campylobactériose entre 1 et 3 pour 1000 personnes par an (MacCarthy et Giesecke, 2001).

Ce syndrome de Guillain-Barré se traduit par des troubles nerveux avec paralysie flasque descendante plus ou moins réversible (récupération partielle, séquelles neurologiques dans 20 % des cas, mortalité dans 3 % des cas). La pathogénie s'explique par une démyélinisation du système nerveux périphérique et une réaction lymphocytaire dues à un mimétisme antigénique entre un composant membranaire du nerf périphérique et le lipopolysaccharide de la paroi bactérienne des *Campylobacter*. Cette réponse auto-immune est déclenchée après infection par certaines souches de *C. jejuni* présentant en surface des structures polysaccharidiques qui miment les structures des gangliosides humains (Prendergast et Moran, 2000 ; Yuki *et al.*, 2004).

On peut en distinguer trois formes : une polyneuropathie démyélinisante aigüe inflammatoire avec dégénérescence axonale secondaire majoritaire dans les pays occidentaux, une neuropathie axonale motrice aigüe majoritaire en Asie et le syndrome de Miller Fisher avec ataxie et ophtalmoplégie (Ho *et al.*, 1999).

Enfin, un syndrome hémolytique et urémique (SHU), attribué à *C. jejuni*, peut également survenir, plus souvent chez l'enfant, au cours ou à la suite d'une entérite aigüe (Canton *et al.*, 1989).

2.2.3. DIAGNOSTIC

Les signes cliniques et les symptômes d'infection à *Campylobacter* ne sont pas pathognomoniques et ne permettent pas un diagnostic différentiel aisé avec les affections digestives provoquées par d'autres entéropathogènes. Ainsi, le diagnostic au laboratoire se

fait essentiellement lors d'une coproculture (diagnostic bactériologique) pour laquelle la recherche de *Campylobacter* doit être expressément demandée (la culture de *Campylobacter* nécessite un milieu de culture spécifique (enrichi et sélectif) et une incubation en atmosphère microaérophile). L'identification au niveau du genre est basée sur la morphologie et sur des tests biochimiques d'orientation simples comme la catalase, l'oxydase et le test d'hydrolyse de l'hippurate. Un examen direct au microscope des selles liquides fraîches associé à un gram peut permettre de suspecter une entérite à *Campylobacter* du fait de la morphologie particulière (bacille spiralé gram négatif) et des mouvements spécifiques de *Campylobacter* (« vol de moucheron »).

Des kits commerciaux sont disponibles pour la détection directe des antigènes de *C. jejuni* et de *C. coli* dans les selles, par exemple, par agglutination au latex. Les méthodes moléculaires (PCR) se développent, en particulier pour la recherche directe dans les aliments et dans les matières fécales (Tableau 12).

Tableau 12 : Quelques méthodes rapides de détection de *Campylobacter*

Source : Seafood Network Information Center, 2006

Système (nom déposé)	Format	Fabricant	Délai Système automatisé
Api-Campy	Biochimique	bioMérieux	24h - NON
AccuProbe	Sonde nucléique	Gen-Probe	16-24h - NON
Gene-Trak	Sonde nucléique	Neogen	50h - NON
VIDAS	ELFA	bioMérieux	48h - OUI
EiaFOSS	ELISA	Foss	48h - OUI
Transia Plate <i>Campylobacter</i>	ELISA	Diffchamb	46h - NON
Probelia PCR	PCR	BioControl systems	24h - NON

ELFA : *Enzyme linked fluorescent assay* ELISA : *Enzyme linked immunosorbent assay*

Néanmoins, ces méthodes rapides ne fournissent pas un isolat pour le test de sensibilité aux antibiotiques et les méthodes d'isolement doivent être mises en œuvre par la

suite. Hindiyeh *et al.* comparent un test immuno-enzymatique avec un isolement sur milieu CAT (céfopérazone, amphotéricine B et teicoplanine) et concluent à une bonne efficacité de ce test rapide, qu'il faut cependant compléter par un isolement direct si le test est négatif et les symptômes fortement évocateurs d'une campylobactériose (Hindiyeh *et al.*, 2000). Le diagnostic sérologique présente un intérêt pour confirmer l'étiologie d'un syndrome de Guillain-Barré.

2.2.4. TRAITEMENT ET AUGMENTATION DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Le traitement de base consiste en une antibiothérapie utilisant essentiellement les macrolides (érythromycine), famille de choix du fait d'une résorption rapide et d'un spectre étroit perturbant peu la flore digestive normale (Mégraud et Prouzet-Mauléon, 2004). Il est plus ou moins complété en fonction de l'intensité de la maladie par des traitements symptomatiques. Néanmoins, la sensibilité aux antibiotiques doit toujours être testée en raison de la fréquence des résistances acquises aux antibiotiques, notamment aux macrolides, à la tétracycline ou encore aux fluoroquinolones.

La résistance des *Campylobacter* aux antibiotiques était restée stable en France, excepté pour les quinolones, pour lesquelles un pic de résistance a été observé dans les années 90. Cette résistance aux quinolones de première génération (acide nalidixique) et aux fluoroquinolones (ciprofloxacine, enrofloxacine) est en effet passée de moins de 5 % en 1988 à 25 % en 2000 pour *C. jejuni* et de moins de 5 % en 1988 à 40% en 2000 pour *C. coli*. Une tendance à la baisse pour l'évolution de la résistance aux quinolones était observée depuis 2000 jusqu'en 2004 pour les *Campylobacter* isolés chez l'Homme et chez le poulet.

Cependant, alors que la résistance chez le poulet est restée stable et faible (<10 %), les données de surveillance pour les années 2005, 2006 et 2007 sont à nouveau en faveur d'une progression sensible de cette résistance (Figure 11), ce qui continue d'inquiéter les médecins (Mégraud et Prouzet-Mauléon, 2004 ; Espié *et al.*, 2007 ; Gallay *et al.*, 2007b ; King *et al.*, 2008). Cette classe d'antibiotiques est en effet très utilisée dans le traitement à long terme des infections systémiques et des entérites sévères (Mégraud, 2003). Dans l'ensemble, *C. coli* s'avère plus résistant que *C. jejuni* (King *et al.*, 2008).

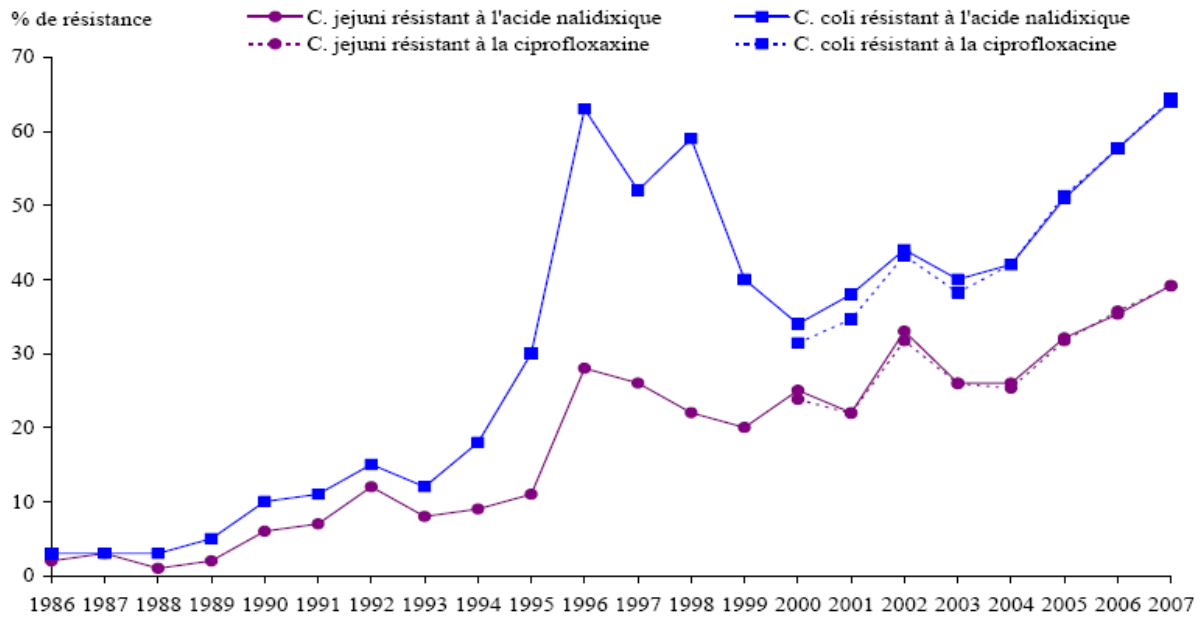


Figure 11 : Résistance à l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine des *C. jejuni* et *C. coli* isolés chez l'Homme en France entre 1986 et 2007. Source : King *et al.*, 2008

En 2007, les taux de résistance aux quinolones observés sont les plus élevés depuis le début de la surveillance avec 39,2 % des souches de *C. jejuni* et 63,5 % des souches de *C. coli* résistantes à l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine. En revanche, la résistance aux autres antibiotiques est stable comparée aux années précédentes : la résistance à l'érythromycine reste faible (2,7 %), quasi nulle pour la gentamicine et pour l'association acide clavulanique/amoxicilline, et élevée pour l'amoxicilline (34 %) et la doxycycline (24 %). Les hypothèses avancées pour le pic de résistance des années 90 étaient l'augmentation des prescriptions de fluoroquinolones en médecine humaine et l'utilisation à visée thérapeutique dans les élevages de fluoroquinolones comme l'enrofloxacin, très proche de la ciprofloxacine utilisée en humaine.

2.3. MODALITES DE TRANSMISSION A L'HOMME

2.3.1. LES PRINCIPAUX RESERVOIRS

Classiquement, il est décrit trois types de réservoirs pour *Campylobacter* : le réservoir animal, le réservoir hydrotellurique et le réservoir humain.

2.3.1.1. Le réservoir animal

Il constitue le réservoir de *Campylobacter* le plus important. Il est caractérisé par une fréquence élevée du portage sain chez les animaux d'élevage ou sauvages (mammifères et oiseaux), par sa nature digestive et son importance quantitative (10^3 à 10^7 cellules/g de matières fécales) (Brown *et al.*, 2004 ; Jensen *et al.*, 2006).

Dans le tube digestif des hôtes, *Campylobacter* se multiplie fortement et peut devenir une flore très abondante de l'intestin, particulièrement dans le caecum des volailles (Newell et Fearnley, 2003). La température du tractus intestinal des oiseaux (supérieure à 40°C) est proche de 42°C, température optimale de développement des *Campylobacter* thermotolérants.

Lorsqu'il y a excrétion, une petite proportion peut survivre dans l'environnement jusqu'à l'ingestion par l'hôte suivant. L'existence de vecteurs entre les hôtes n'a jamais été démontrée. Récemment, deux études ont évoqué le rôle des mouches dans la transmission de *Campylobacter* à l'Homme et à l'animal (Ekdhal *et al.*, 2005 ; Hald *et al.*, 2008). En ce qui concerne les *Campylobacter* thermotolérants, *C. jejuni* et *C. lari* sont principalement isolés chez les oiseaux, *C. jejuni* et *C. coli* sont également présents chez les mammifères d'élevage (porcins, bovins et ovins) et *C. upsaliensis* est plus fréquemment retrouvé chez les animaux domestiques (chiens et chats) (Nielsen *et al.*, 1997 ; Broman *et al.*, 2004 ; Fouts *et al.*, 2005 ; Açik *et al.*, 2006).

2.3.1.2. Le réservoir hydrotellurique

Campylobacter spp. n'est pas un germe d'environnement. Il ne se multiplie pas dans le milieu extérieur mais possède une certaine aptitude à la survie dans l'eau. Les résultats sont très variables selon les espèces, les souches et les protocoles employés. Des facteurs comme l'aération et l'oxygénation interviennent également dans la survie des *Campylobacter* (Buswell *et al.*, 1998 ; Obiri-Danso *et al.*, 2001).

Quoi qu'il en soit, *Campylobacter spp.* est couramment isolé dans les eaux de ruissellement et les nappes superficielles (Savill *et al.*, 2001). La charge en *Campylobacter* des eaux et des boues d'égouts non traitées est généralement peu élevée et comprise entre 10 et 10^3 cellules/100 mL, celle des eaux de rivière entre 10 et 230 cellules/100 mL. Des épidémies de campylobactérioses survenues aux Etats-Unis et en Europe du Nord ont été

reliées à la contamination de l'eau de boisson par *Campylobacter* (Engberg *et al.*, 1998 ; Hänninen *et al.*, 2003). Le lien a été confirmé en Finlande par des techniques de sérotypage couplées à des analyses de génotypage ayant montré la similitude entre les isolats de l'eau et ceux isolés dans les matières fécales des patients (Hänninen *et al.*, 2003). Des études complémentaires ont montré que l'eau responsable était contaminée par des matières fécales d'animaux. Ainsi, on soupçonne les animaux sauvages et les animaux domestiques sur pâtures de contaminer l'environnement, dont l'eau (Friedman *et al.*, 2000 ; Wilson, 2003). Certains auteurs soulignent également l'importance de la contamination des eaux usées et des boues d'épandage provenant des abattoirs et des élevages (Easton, 1996 ; Jones, 2001).

L'eau n'est donc pas un véritable réservoir mais plutôt une voie de transmission importante dans l'apparition des anadémies de campylobactérioses.

2.3.1.3. Le réservoir humain

Il est mineur et discuté : le portage sain humain est extrêmement rare dans les pays industrialisés et la transmission inter-humaine n'a été que très peu de fois observée, à l'occasion de contacts rapprochés (Gallay *et al.*, 2005). Par contre, les malades atteints de campylobactériose excrètent le germe à des taux très élevés pendant plusieurs jours et cette excrétion continue pendant deux ou trois semaines (Pilet *et al.*, 1997).

Au bilan, il existe ainsi une véritable interaction entre les différents réservoirs puisque la contamination du réservoir animal et de l'Homme agissent sur celle du réservoir hydrotellurique dans la mesure où des *Campylobacter* sont diffusés dans l'environnement par l'intermédiaire des eaux de ruissellement, des égouts et des boues d'épandage. Ces eaux contaminées entrent ensuite de nouveau en contact avec le réservoir animal voire avec l'Homme.

2.3.2. LA TRANSMISSION DIRECTE

La transmission par contact direct avec un réservoir possible de *Campylobacter* est un événement relativement rare touchant principalement les agriculteurs, les vétérinaires et les ouvriers d'abattoir (cas de maladie professionnelle). Il existe également des circonstances à risque comme la proximité des animaux de ferme. Une étude de Shane (1992) souligne que

les enfants des familles vivant en contact proche avec des volailles infectées présentent douze fois plus de risque de développer une campylobactériose que les autres enfants. La transmission par contact avec les animaux de compagnie (chiots et chatons en diarrhée) (Skirrow, 1977), avec des eaux de baignade contaminées (Sumathipala et Morrison, 1983 ; Kuusi *et al.*, 2005) ou avec un malade excréteur ne doit pas être négligée.

2.3.3. LA TRANSMISSION PAR CONSOMMATION D'ALIMENTS CONTAMINÉS

La transmission indirecte se fait, dans 80% des cas, par la consommation d'aliments contaminés (Mead *et al.*, 1999 ; Alter et Scherer, 2006). C'est le mode observé dans les formes anadémiques et sporadiques de la campylobactériose, zoonose⁴ alimentaire. L'estimation de l'importance relative des sources alimentaires s'avère difficile puisque les cas groupés représentent une faible proportion parmi les cas connus de campylobactérioses. Toutefois, plusieurs enquêtes cas-témoins et différentes études permettent de mettre en évidence les aliments les plus fréquemment mis en cause (Tableau 13).

Les principaux aliments incriminés, par ordre de fréquence décroissante sont :

- les produits d'origine aviaire (excepté les œufs et les ovoproduits)
(Kapperud *et al.*, 1992 ; Black *et al.*, 2006 ; Mazick *et al.*, 2006)
- le lait cru (Doyle, 1981 ; Shane, 1992 ; Morgan *et al.*, 1994 ; Altekruuse *et al.*, 1999 ; Kalman *et al.*, 2000 ; CDCP, 2002 ; Peterson *et al.*, 2003)
- les viandes et abats rouges de boucherie (viande bovine, porcine, ovine et caprine)
(Yanagisawa, 1980 ; Kapperud, 1992 ; Gallay, 2006)
- les aliments contaminés indirectement (légumes...)
(Park et Sanders, 1992 ; Roels *et al.*, 1998)

D'autres denrées ont été impliquées dans des toxi-infections à *Campylobacter* : l'eau de distribution dans plusieurs anadémies collectives (Melby *et al.*, 1991 ; Wilson, 2003 ; Kuusi *et al.*, 2005 ; Jakopanec *et al.*, 2008), des coquillages et des huîtres dans plusieurs cas sporadiques (Abeyta *et al.*, 1993 ; Endtz *et al.*, 1997).

⁴ Zoonose : maladie (ou infection) animale, microbienne ou parasitaire, qui se transmet de l'animal à l'Homme et *vice-versa*.

Tableau 13 : Facteurs de risque associés à une entérite à *Campylobacter* dans 12 études cas-témoins dans différents pays

PAYS	Nombre de cas	Nombre de contrôles	FACTEURS DE RISQUE	REFERENCE
USA (Washington)	218	526	Consommation de poulet peu cuit, de poisson cru et fruits de mer	Harris <i>et al.</i> 1986
USA	45	45	Consommation de poulet Contact avec un chat	Deming <i>et al.</i> 1987
NORVEGE	52	103	Consommation de poulet acheté cru et de saucisses cuites au barbecue	Kapperud <i>et al.</i> 1992
NOUVELLE-ZÉLANDE	100	100	Consommation de poulet hors du foyer Consommation d'eau non traitée	Ikram <i>et al.</i> 1994
SUISSE	167	282	Voyage à l'étranger Consommation de poulet	Schorr <i>et al.</i> 1994
ROYAUME UNI	598	598	Manipulation de viande crue Contact avec un animal de compagnie diarrhéique Consommation d'eau non traitée	Adak <i>et al.</i> 1995
NOUVELLE-ZÉLANDE	621	621	Consommation de poulet mal cuit Consommation de lait cru Voyage à l'étranger Utilisation d'eau de pluie Contact avec les animaux	Eberhart-Phillips <i>et al.</i> 1997
SUEDE	101	198	Consommation de lait cru Consommation d'aliments cuits au barbecue (poulet et porc)	Studahl et Andersson 2000
USA (Hawaï)	211	211	Consommation de poulet hors du foyer	Effler <i>et al.</i> 2001
DANEMARK	282	319	Consommation de poulet mal cuit, de viande rouge cuite au barbecue Consommation de raisin et de lait cru Voyage à l'étranger	Rodrigues <i>et al.</i> 2001
NORVEGE	212	422	Consommation d'eau non traitée Consommation de viandes cuites au barbecue (porcs) et de poulet acheté cru Contact avec les animaux	Neimann <i>et al.</i> 2001
USA	1316	1316	Consommation de poulet hors foyer, de viandes rouges préparées au restaurant Contact avec des fèces d'animaux ou de jeunes animaux de compagnie	Kapperud <i>et al.</i> 2003

C'est la consommation de ces denrées, crues (cas des coquillages, légumes, steak tartare), insuffisamment chauffées (pasteurisation insuffisante du lait) ou insuffisamment cuites (cuisson des volailles et du porc au barbecue) qui est à l'origine de la maladie. La cuisson des aliments représente donc un point important dans la maîtrise du risque *Campylobacter*. Par ailleurs, il est fréquent que des cas de campylobactérioses se déclarent suite à un voyage notamment dans les pays en voie de développement. Dans ces pays, le germe est répandu et de nombreux enfants sont des porteurs sains de *Campylobacter* suite à de multiples infections et à l'acquisition d'une immunité (Diarra, 1993). Récemment une étude suédoise a souligné le rôle des voyageurs comme sentinelles permettant d'avoir une idée de l'incidence de la maladie dans différents pays (principalement d'Europe) (.

2.3.4. LES MODALITES DE CONTAMINATION DES ALIMENTS

✓ Contamination primaire de la matière première

- pour les viandes et abats rouges de boucherie (bovins, porcs et petits ruminants) : contamination à l'abattoir lors de l'éviscération à partir du tube digestif ou lors du transport
- pour les produits d'origine aviaire (viande) : le transport en provoquant une augmentation de l'excrétion et la plumaison en entraînant une augmentation de l'émission de matières fécales sont également à l'origine de contaminations
- pour le lait : contamination à partir des matières fécales lors de la traite ou plus rarement à la suite de mammites à *Campylobacter*
- pour les coquillages ou l'eau de consommation : contamination de l'eau par des effluents d'élevages (Chinivasagam *et al.*, 2004), par des eaux usées (Moore *et al.*, 2005) ou par le portage intestinal des oiseaux marins

✓ Contamination secondaire de la matière première par contamination croisée

Certains gestes effectués lors de la préparation des denrées en cuisine sont fréquemment à l'origine de contaminations croisées notamment l'utilisation, pour la découpe de volaille rôtie ou pour la découpe de légumes, de la planche sur laquelle a été découpée ou éviscérée la volaille crue (De Boer et Hahne, 1990 ; Christensen *et al.*, 2001 ; Winquist *et al.*,

2001). Kusumaningrum *et al.*, en 2003, ont démontré que *Campylobacter* était capable de survivre plusieurs heures sur des surfaces et sur des ustensiles en inox et que les éponges servant au nettoyage des surfaces pouvaient également être des sources de contamination.

2.3.5. COMPORTEMENT DE *CAMPYLOBACTER* DANS LES ALIMENTS

Les *Campylobacter* thermotolérants ne sont pas capables de se multiplier dans les animaux une fois morts, *a fortiori* dans les aliments dans des conditions de stockage normales (Park, 2002). Même si leur viabilité décroît jusqu'au consommateur, leur survie est possible et elle peut être plus ou moins importante selon les traitements mais aussi selon les souches, qui présentent des capacités de résistance variées face aux divers stress subis et aux différents facteurs utilisés.

C. jejuni peut persister plusieurs jours sur les viandes réfrigérées d'où l'importance du respect des règles d'hygiène lors de la préparation des aliments que ce soit dans les établissements commerciaux ou dans les foyers. Par exemple, la décongélation d'une carcasse de volaille dans le réfrigérateur se fera sur les étagères pleines ou dans des récipients adaptés pour ne pas conduire à un égouttage et à une éventuelle contamination croisée des aliments placés dans les étagères du bas. En revanche, les *Campylobacter* thermotolérants sont sensibles à la chaleur : une température à cœur de plus de 65° C est létale. La température joue donc un rôle important dans leur capacité de survie (AFSSA, 2004) et s'ils survivent globalement au réfrigérateur (0 à +10°C), la congélation diminue leur nombre plus ou moins fortement selon les souches, et ce d'autant plus qu'une dessiccation y est associée.

L'oxygène a un effet bactéricide indéniable *in vitro*. Cependant, en pratique, le mode de conditionnement de la denrée n'a pas une influence considérable sur la survie de *Campylobacter*. *Campylobacter* est très sensible aux rayonnements, ionisants ou non.

Au final, les *Campylobacter* sont sensibles à un certain nombre d'éléments (Tableau 14) et cette fragilité relative permet d'envisager son élimination dans les aliments et de formuler des recommandations simples quant à la prévention du risque de campylobactériose :

- la simple cuisson, aboutissant en tout point à une température supérieure à 65°C,
- les techniques usuelles de pasteurisation, la salaison et le séchage combinés,

- la chloration de l'eau.

Tableau 14 : Facteurs influençant la survie des *Campylobacter* dans les aliments.

Source : AFSSA, 2004

Facteurs	Effet sur les <i>Campylobacter</i>
Températures négatives	Stoppent la croissance bactérienne et détruisent une partie de la population
Températures positives	<ul style="list-style-type: none"> - 0 à 42°C : conditions favorables à la survie, déclin progressif du nombre de bactéries - une croissance a pu être observée sur de la viande entre 37 et 42°C (Hanninen <i>et al.</i>, 1984) - supérieure à 60°C : destruction de tous les <i>Campylobacter</i>
pH	<ul style="list-style-type: none"> - fourchette optimale de croissance : 6.5 à 7.5 - inhibition de la croissance pour pH < 4.7 et pH > 8.2 - bactéricide pour pH < 4 et pH > 9
NaCl	<ul style="list-style-type: none"> - développement en l'absence de NaCl - optimum de croissance avec 0.5% de NaCl - pas de multiplication au dessus de 2% - effet bactéricide sur <i>C. jejuni</i> au dessus de 6.5%
Acide ascorbique	Effet bactéricide à 5mmol/L dans le milieu de culture
Phosphate trisodique	Efficace pour réduire significativement la population bactérienne mais interdit en France
Atmosphère gazeuse	<ul style="list-style-type: none"> - la survie diminue quand la quantité d'O₂ augmente - la survie augmente quand la quantité de CO₂ augmente
Dessiccation	Diminue fortement la survie des <i>Campylobacter</i>
Chlore	<ul style="list-style-type: none"> - des concentrations de l'ordre de 0.625 ppm à 5 ppm suffisent à assainir totalement de l'eau contaminée - l'effet du chlore pour nettoyer des aliments contaminés (eau chlorée à 50 ppm) n'est que partiel
Rayonnements	<ul style="list-style-type: none"> - ionisant : les traitements habituels de 3 à 5 kGy sont suffisants pour détruire les <i>Campylobacter</i> - UV : les <i>Campylobacter</i> y sont très sensibles - micro-ondes : bonne efficacité selon la puissance

2.3.6. DOSE INFECTANTE ET DOSE MINIMALE INFECTIEUSE

La dose infectante est très variable en fonction de la souche bactérienne et du vecteur permettant l'absorption, mais elle peut être relativement faible, puisque quelques centaines de cellules peuvent déclencher la maladie chez l'Homme (Black *et al.*, 1988).

Les campylobactérioses reposent sur l'ingestion de cellules vivantes en quantité suffisante, qui provoqueront dans l'intestin une toxi-infection, sans que les toxines soient produites dans l'aliment. Les infections intestinales à *Campylobacter* font donc suite à l'ingestion par le patient d'une quantité de cellules ou dose infectante égale ou supérieure à la dose minimale infectieuse. L'existence d'une dose minimale infectieuse est la conséquence de l'action de la barrière gastrique, censée détruire un certain pourcentage de bactéries. Par exemple, *Campylobacter* est sensible à l'acidité gastrique et subit une réduction importante de sa population lors du transit digestif. Cependant, une intervention chirurgicale, un aliment (comme le bœuf haché, Waterman et Small, 1998) ou un autre facteur pouvant réduire l'acidité gastrique ainsi qu'un transit rapide (aliment liquide, en-cas ingéré sur un estomac vide) sont autant d'éléments qui diminuent l'action de l'acidité du transit gastrique.

Une dose minimale infectieuse faible permet des accidents alimentaires après la seule contamination de l'aliment par *Campylobacter* sans qu'une multiplication ne soit nécessaire (Park *et al.*, 1981 ; Rosenfield *et al.*, 1985 ; Evans *et al.*, 1996)

2.1. STRATEGIES DE MAITRISE DE *CAMPYLOBACTER*

La diminution de la pression de sélection par le contrôle des réservoirs animaux est une voie importante qu'il faut prendre en compte et améliorer. De plus, les traitements subis pendant la transformation, le transport et la distribution de l'aliment ainsi que les caractéristiques bactériologiques de ce micro-organisme s'opposent généralement au développement des *Campylobacter* dans le produit fini. En l'absence de recontamination, le danger ne s'accroît donc pas et l'on peut même observer une diminution du nombre de bactéries.

En ce qui concerne la maîtrise de *Campylobacter* dans les aliments transformés, deux approches se dégagent : l'élimination totale ou partielle des *Campylobacter* dans les aliments par des méthodes physiques ou chimiques et la prévention des contaminations dans les élevages, dans les usines agro-alimentaires, lors du transport et lors de la préparation au domicile ou hors foyer .

2.4.1. SURVIE ET DESTRUCTION DE *CAMPYLOBACTER* DANS LES ALIMENTS

De nombreuses expérimentations ont porté sur l'évolution du nombre de *Campylobacter* dans les aliments. Dans les conditions habituelles de transformation, transport et distribution, le nombre de *Campylobacter* diminue au cours du temps. Les travaux concernant la survie des *Campylobacter* sont souvent fragmentaires et quelquefois contradictoires. Nous allons présenter un certain nombre de facteurs influençant cette survie et tenter de dégager quelques grandes tendances.

2.4.1.1. La température

Les températures utilisées pour la congélation des aliments permettent de stopper la croissance de *Campylobacter* et de détruire une grande partie de la population. Bhaduri et Cottrell, en 2004, ont montré dans une étude menée sur du poulet que la réfrigération à 4°C entraînait une diminution de la population de 0,31 à 0,81 log₁₀ UFC/g en 3 à 7 jours, tandis que la congélation entraînait une diminution de 0,56 à 3,39 log₁₀ UFC/g en 2 semaines. Ainsi s'ils survivent globalement au réfrigérateur (0 à +10°C), la congélation diminue leur nombre plus ou moins fortement selon les souches, et ce d'autant plus qu'une dessiccation y est associée. Durant ces traitements, l'augmentation de la vitesse de l'air permet donc de diminuer la survie dans le produit en augmentant sa dessiccation. Toutefois, la texture de la peau des volailles, quand elle est conservée jusqu'à la consommation, permet la protection des bactéries vis à vis de la dessiccation.

En revanche, les *Campylobacter* thermotolérants sont sensibles à la chaleur : une température à cœur de plus de 65°C est létale pour la totalité des bactéries présentes quels que soient leur nombre et la nature de la matrice alimentaire (liquide ou solide) (AFSSA, 2004). La température joue donc un rôle important dans leur capacité de survie (AFSSA, 2004).

2.4.1.2. Traitements chimiques, désinfectants et atmosphères modifiées

La survie des *Campylobacter* est faible à des pH inférieurs à 4 ou supérieurs à 9 (effet bactériostatique important). Les aliments et boissons les plus souvent incriminés lors de cas de campylobactérioses (viande, lait, eau) ont donc un pH compatible avec leur survie.

La salaison ou l'ajout d'acide ascorbique ont un effet bactéricide et permettent également de diminuer la survie des *Campylobacter*.

Campylobacter ne semble pas présenter de résistance particulière vis-à-vis de la plupart des désinfectants utilisés dans les agro-industries, même si les travaux consacrés à ce sujet sont peu nombreux. Une étude *in vitro* de Avrain *et al.* (2003) ont montré que des traitements par le benzalkonium chlorure (1 %) et le sodium hypochlorite (0,63 %) permettaient d'éliminer facilement plusieurs souches de *Campylobacter*. L'assainissement de l'eau par un traitement au chlore permet la destruction rapide d'une contamination par *Campylobacter*. Le chlore est également utilisé aux Etats-Unis pour le nettoyage des carcasses et permet alors une réduction partielle de la population (0,5 log₁₀ UFC/ml après nettoyage avec de l'eau chlorée à 25-35 ppm) (Bashor *et al.*, 2004).

L'oxygène a un effet bactéricide indéniable *in vitro*. Cependant, en pratique, le mode de conditionnement de la denrée sous vide ou en atmosphère enrichie en CO₂ n'a pas une influence considérable sur la survie de *Campylobacter*.

2.4.1.3. Traitements ionisants et U.V.

Campylobacter est très sensible aux rayonnements ionisants. Les paramètres de traitements nécessaires à leur inactivation sont largement inférieurs à ceux requis pour l'élimination d'autres entéropathogènes, comme les salmonelles ou *E. coli*. Ainsi, des traitements inférieurs ou égaux à 1 kGy sont largement suffisants pour réduire significativement le nombre de *Campylobacter* viables et peuvent être recommandés pour prévenir les infections à *Campylobacter* (Lewis *et al.*, 2002).

L'utilisation de lampes U.V. pour des applications germicides dans la purification de l'eau est connue depuis longtemps. Butler *et al.*, en 1987, ont étudié la sensibilité de *C. jejuni*

aux radiations U.V. à 254 nm. Il est apparu que ce germe était beaucoup plus sensible aux radiations U.V. que *E. coli* qui sert de base de comparaison (1,8 contre 5 mws/cm²) et ils en concluent que les lampes U.V. existant dans le commerce pouvaient facilement inactiver *C. jejuni* dans l'eau. Pour un volume donné, trois minutes de chauffage par micro-ondes (1380 watts) suffisent pour éliminer tous les *C. jejuni* du lait. Choi *et al.*, 1993, ont montré qu'une minute de traitement permettait une réduction supérieure à 10⁵ de la population de *C. jejuni*.

2.4.1.4. Autres types de traitements

Solomon et Hoover, en 2004, soulignent l'efficacité des traitements hautes pressions (traitements de courte durée (10 min) à des pressions inférieures à 400 Mpa) pour obtenir un nombre de réductions décimales important, croissant avec l'augmentation de la pression.

D'autres traitements dits « biologiques » existent avec des efficacités variables : les bactériocines (Schoeni et Doyle 1992 ; Stern *et al.*, 2006), le système lacto-peroxydase (Beumer *et al.*, 1985), les épices (Deibel et Banwart, 1984), le thé (Diker *et al.*, 1991) et les huiles essentielles (Fischer et Phillips, 2006).

2.4.2. PREVENTION DES CONTAMINATIONS

Comme nous l'avons décrit précédemment, les sources de contamination par *Campylobacter* sont nombreuses et il semble donc essentiel de contrôler tous les points de contamination possibles : du lieu d'élevage ou de traitement de l'eau jusqu'au consommateur.

Pour éviter toute prolifération dans les réseaux de distribution d'eau, il est nécessaire que les installations soient à la fois bien conçues et bien entretenues. Le traitement des eaux doit être adapté à la contamination et son efficacité régulièrement testée.

Concernant le réservoir animal reconnu comme étant la principale source de contamination, des mesures doivent être prises dès l'élevage pour prévenir la colonisation et/ou la transmission. La détermination du statut de contamination de la filière aviaire et porcine vis-à-vis de *Campylobacter* doit permettre de donner aux gestionnaires du risque une aide à la décision pour la mise en place de plans de contrôle, d'épidémiologie ou d'autres options de gestion du risque. Il est également important de vérifier les modalités de

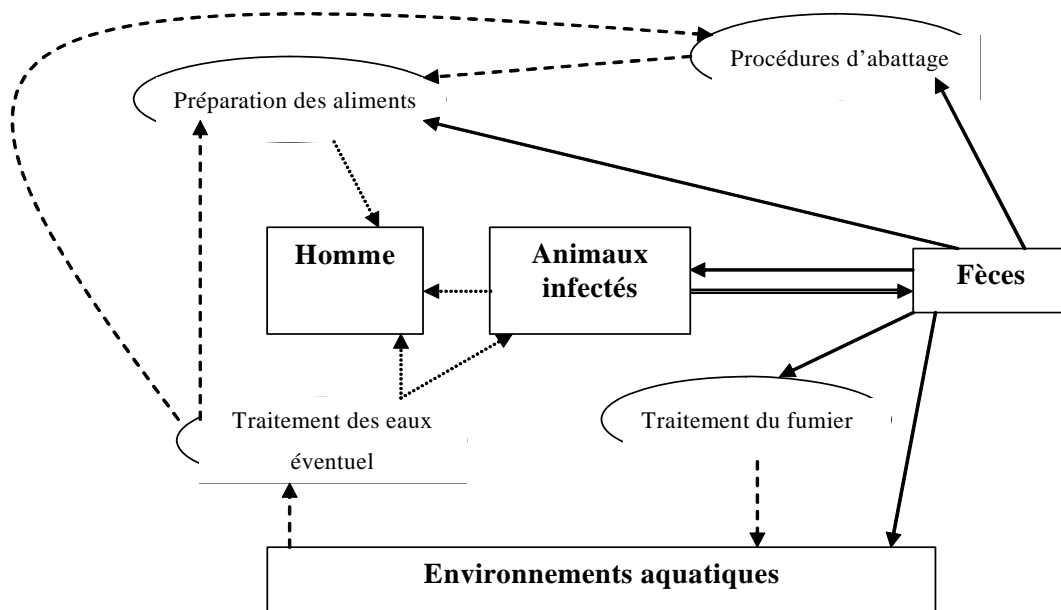
transport, notamment jusqu'à l'abattoir et de mettre en place les mesures spécifiques décrites lors de la mise au point de la démarche HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point). Ces mesures préconisent la vérification des matières premières et l'absence de croisement des différents lots. Les équipements et les surfaces doivent être régulièrement désinfectés et la maintenance des machines régulièrement effectuée. Il est important de veiller à ce que les différents barèmes d'échaudage et de refroidissement soient bien respectés. Tout au long de la chaîne, le personnel doit respecter les conditions d'hygiène et systématiquement éliminer les carcasses non conformes. Le transporteur et le distributeur doivent veiller à appliquer les bonnes conditions de stockage et à ne jamais entreposer de la viande crue avec d'autres denrées non contaminées (à défaut, l'utilisation de films protecteurs est préconisée).

Enfin, les dernières précautions concernent le consommateur. Il est essentiel de nettoyer son réfrigérateur régulièrement et de bien séparer la viande crue des autres denrées. Les ustensiles utilisés pour le découpage de la viande doivent être systématiquement lavés avant toute autre utilisation. Il faut éviter de consommer du lait cru sans avoir de garantie sur son origine ou de l'eau non traitée et cuire à coeur la viande (on peut par exemple envisager de cuire ou pré-cuire la viande avant de la passer au barbecue). Kusumaningrum *et al.*, dans une étude réalisée en 2004 sur les contaminations croisées dans les cuisines, préconisent de réserver spécifiquement certaines surfaces de travail aux volailles et recommandent d'augmenter le niveau des pratiques hygiéniques dans les cuisines familiales.

2.5. BILAN

2.5.1. MODELE EPIDEMIOLOGIQUE DES CAMPYLOBACTERIOSES HUMAINES

Il existe donc pour *Campylobacter* une circulation et une véritable interaction entre les trois réservoirs (réservoir animal, humain et hydrotellurique) (Figure 12). La transmission à l'Homme de *Campylobacter* est avant tout alimentaire, mais il ne faut pas négliger la transmission directe par contact avec un animal vivant ou via le réservoir hydrotellurique (consommation d'eau ou baignade dans des eaux contaminées).



Le modèle comprend 4 composantes : des hôtes susceptibles ou infectés, des filtres écologiques (formes ovales de la figure), des environnements aquatiques et des trajectoires les liants entre eux. La double flèche représente les micro-organismes excrétés dans les fèces des animaux porteurs (volailles, porcs... éventuellement homme). Les flèches pleines représentent les mécanismes primaires de dispersion des *Campylobacter*, les flèches en pointillés longs les mécanismes secondaires. Enfin les flèches en pointillés courts représentent les nouvelles infections.

Figure 12 : Modèle épidémiologique éco-environnemental de la campylobactériose humaine

Source : Skelly et Weinstein, 2003

La contamination du réservoir animal et humain agit sur la contamination du réservoir hydrotellurique dans la mesure où des *Campylobacter* sont diffusés dans l'environnement par l'intermédiaire des eaux de ruissellement, des égouts et des boues d'épandage (Wilson *et al.*, 2003). Ces eaux contaminées entrent ensuite de nouveau en contact avec le réservoir animal, éventuellement avec le réservoir humain.

2.5.2. CONCLUSION AU PROFIL DE RISQUE

Les bactéries appartenant au genre *Campylobacter* font désormais l'objet d'une surveillance au niveau national et international tant chez l'Homme que dans les filières animales et de nombreuses études sont en cours afin de mieux connaître l'épidémiologie des infections humaines (Friedman *et al.*, 2000 (USA) ; AFSSA, 2004 (France) ; Vaillant *et al.*, 2004 (France)).

Si une contamination à partir du réservoir hydrotellurique est parfois mise en cause, la majorité des cas humains a pour point de départ la viande de volailles contaminée ou, dans une moindre mesure, la viande de porc. En effet, le portage intestinal asymptomatique des animaux d'élevage fait du réservoir animal la source principale de contamination des denrées alimentaires, et ceci à des stades divers de la chaîne de l'alimentation de l'Homme. Cependant la connaissance de la contribution relative de chacune de ces sources potentielles de contamination pour l'Homme reste encore partiellement inconnue et de nombreuses recherches sont en cours.

Contrairement à la filière avicole, la filière porcine a fait l'objet de peu d'investigations pour le moment alors que le portage intestinal de *Campylobacter* décrit chez le porc constitue un risque de contamination des denrées alimentaires par ces bactéries. Une meilleure connaissance des sources d'infection et des modalités de transmission de *Campylobacter* semble indispensable afin notamment d'établir un statut de dangerosité pour la filière porcine. L'épidémiologie de l'infection à *Campylobacter* en élevage et à l'abattoir doit ainsi être mieux renseignée afin d'évaluer la possibilité de limiter la contamination des viande ainsi que la dissémination de ces bactéries dans l'environnement via les effluents d'élevage ou d'abattoir.

3. EPIDEMIOLOGIE DE *CAMPYLOBACTER* CHEZ LE PORC

3.1. HISTORIQUE : DECOUVERTE DE *CAMPYLOBACTER* CHEZ LE PORC

A partir des années 80, des études ont été conduites pour décrire la prévalence de *Campylobacter spp.* chez le porc en élevage et en abattoir (Skirrow *et al.*, 1982 ; Colin *et al.*, 1985). En 1982, Stich-Groh a isolé *Campylobacter spp.* chez 59 % des porcs à l'abattoir (un quart était contaminé par *C. jejuni*).

Les premiers auteurs se sont d'abord intéressés à *C. jejuni*, premier germe entéropathogène pour l'Homme. Néanmoins, il apparaît vite que *C. coli* est le plus fréquent chez le porc, même si d'autres espèces ont été isolées telles que : *C. hyointestinalis* (Gebhart *et al.*, 1985; Minet *et al.*, 1988; On *et al.*, 1995), *C. mucosalis* (Lin *et al.*, 1991), *C. hyoilei* (Alderton *et al.*, 1995) et *C. lari* (Moore et Madden, 1998 ; Young *et al.*, 2000). Cependant, Vandamme *et al.* ont démontré, en 1997, que les souches de *C. hyoilei* isolées par Alderton *et al.*, en 1995, ne peuvent pas être distinguées des souches de *C. coli* décrites par Véron et Chatelain (1973) sur la base de critères phénotypiques et génotypiques. Par conséquent, nous considérerons que *C. hyoilei* et *C. coli* sont deux synonymes pour la même espèce.

3.2. STATUT DES ELEVAGES PORCINS VIS-A-VIS DES *CAMPYLOBACTER*

3.2.1. DESCRIPTION DE LA CONTAMINATION DES PORCS PAR *CAMPYLOBACTER* EN ELEVAGE

Contrairement à la filière avicole, l'épidémiologie de l'infection par *Campylobacter spp.* est moins bien connue en ce qui concerne les élevages et les abattoirs de porcs.

Les études épidémiologiques concernant le statut des élevages porcins vis-à-vis des *Campylobacter* sont peu nombreuses et chacune d'entre elles concerne un faible nombre d'élevages. De plus, la diversité des matériels et des méthodes employés incite à relativiser les résultats obtenus.

On peut cependant dégager de grandes tendances concernant la prévalence du portage à différents stades de l'élevage et approcher les modalités de contamination des animaux.

3.2.1.1. Un portage sain

Dans les conditions normales d'élevage, il existe un portage sain de *Campylobacter* dans l'espèce porcine. La présence de *Campylobacter* dans le tube digestif ne semble pas à l'origine de troubles de santé et/ou d'altération du niveau de production chez les animaux porteurs.

Toutefois, les travaux de Boosinger et Powe (1988) sur des porcs gnotobiotiques et les travaux de Babakhani *et al.* (1993) sur des porcelets nouveaux-nés privés de colostrum soulignent que l'on peut induire expérimentalement à ces animaux des campylobactérioses digestives, similaires à celles décrites chez l'Homme, en leur administrant par voie orale des *C. jejuni*.

D'autres *Campylobacter* peuvent provoquer des gastro-entérites chez le porc dans des conditions classiques d'élevage : *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* et *C. mucosalis* peuvent être responsables d'adénomatoses porcine ou d'iléite proliférative quand ils sont associés. Dans ce cas, on peut détecter *C. mucosalis* dans la bouche des porcs malades, alors qu'il n'y est pas retrouvé habituellement chez des animaux en bonne santé (Ohya *et al.*, 1985). Plus récemment, Eriksen et son équipe, en Norvège, ont contesté le rôle de l'association de *C. mucosalis* et de *C. hyointestinalis* dans le déclenchement de l'adénomatoses intestinale porcine et ont montré l'importance de *C. jejuni* et de *C. coli* dans l'étiologie de la maladie (Eriksen *et al.*, 1990).

Certaines bactéries apparentées aux *Campylobacter*, les *Arcobacter*, semblent également avoir un véritable pouvoir pathogène chez le porc, et peuvent être à l'origine de septicémies et d'avortements dans cette espèce (On *et al.*, 2002).

3.2.1.2. Un portage fréquent et une excrétion hétérogène

Comme le montrent les chiffres publiés récemment (Tableaux 15 et 16) et comme s'accordent à le dire la plupart des auteurs le portage de *Campylobacter* chez le porc est très fréquent et concerne selon les pays entre 25 et 85% des élevages et de 70 à 100% des porcs dans les élevages contaminés (Magras *et al.*, 2004b). Ces données concernent le portage intestinal de *Campylobacter* par les porcs. Une étude de Payot *et al.*, en 2004, a montré qu'un porc charcutier sur deux était porteur de *Campylobacter* au niveau de l'estomac (estimation de la prévalence moyenne du portage gastrique dans 24 élevages avec 10 animaux par élevage).

Tableau 15 : Prévalence des *Campylobacter* thermotolérants chez le porc.

Source : EFSA, 2007

	2006		2005		2004		2003		2002	
	N	% Pos	N	% Pos	N	% Pos	N	% Pos	N	% Pos
Pigs (animal based data)										
Germany	559	19.7	332	24.7	375	24.8	430	22.6	266	32.7
Luxembourg	64	35.9	-	-	-	-	-	-	-	-
United Kingdom	-	-	-	-	-	-	528	69.3	-	-
Pigs (herd based data)										
Austria	-	-	532	48.7	741	57.5	262	53.8	276	54.4
Denmark	295	52.2	185	85.4	191	79.6	259	93.4	240	80.4
France	204	67.6	-	-	176	70.5	-	-	-	-
Hungary	505	8.1	-	-	-	-	-	-	-	-
Ireland	216	0.9	-	-	-	-	-	-	-	-
Italy	199	55.8	84	25.0	37	67.6	46	52.2	29	44.8
Slovakia	39	56.4	53	30.2	-	-	-	-	-	-
Spain ²	195	73.8	-	-	-	-	-	-	-	-
EU Total	2,276	32.7	1,186	45.2	1,520	54.0	1,525	57.0	811	54.6

1. Data are only presented for sample size ≥ 25

2. Slaughter batches, survey

Les données quantitatives sur le niveau de contamination par *Campylobacter* sont à considérer avec prudence compte tenu des difficultés techniques de culture de la bactérie et par conséquent de son dénombrement. Cependant, les quantités excrétées sont relativement élevées et vont de 10^2 à 10^7 Unités Formant Colonie par gramme de matières fécales (UFC/g MF) (Tableau 16).

Tableau 16 : Description de la contamination des porcs par *Campylobacter* en élevage

Nombre d'élevages dans l'étude	Animaux testés	Pourcentage d'animaux porteurs	Dénombrement moyenne en log ₁₀ UFC/g de matières fécales +/- écart type	Espèce identifiée	Référence
8 élevages	80 porcs charcutiers	98 à 85% selon l'âge	3,2 à 4,1	<i>C. coli</i>	Weijtens <i>et al.</i> , 1993
2 élevages	10 truies 60 porcelets	90 à 100% 48 à 92%	4,1 +/- 1, 4	<i>C. coli</i>	Weijtens <i>et al.</i> , 1997
1 élevage	7 truies 8 porcs charcutiers issus des truies (10 à 25 sem. d'âge)	75 à 87% 62% 48 à 100%	2,1 à 4,48	<i>C. coli</i>	Weijtens <i>et al.</i> , 1999
5 dont un élevage SPF	20 à 120 selon l'élevage	0% (élevage SPF) à 100%	<2,8 à 5,1	-	Weijtens <i>et al.</i> , 2000
1 élevage	50 cochettes 9 truies gestantes 73 porcelets (1jour) 20 porcelets en post-sevrage	76% 100% 57,8% 100%	5,08+/- 0,83 5,31+/- 1,04 4,84 +/- 1,60 7,25+/- 0,70	<i>C. jejuni</i> 70% <i>C. coli</i> <i>C. lari</i> (2.3% cochettes)	Young <i>et al.</i> , 2000
1 élevage	67 porcelets (de 1 à 20 j), 43 élevés en nurserie, 24 avec la truie	De 1 à 20 j : 34 à 11% 54 à 95%	3 à 7	<i>C. jejuni</i> <i>C. coli</i>	Harvey <i>et al.</i> , 2000
	45 Porcs charcutiers	88.9%			Saenz <i>et al.</i> , 2000
1 élevage	3 truies 17 porcelets	-	-	<i>C. coli</i>	Hume <i>et al.</i> , 2002
	348 porcelets 4 jours 1036 porcelets 25 jours 261 truies	37% 76% 79.3%	4 (de 1,7 à 6,7)	<i>C. coli</i>	Magras <i>et al.</i> , 2004
15 élevages	30 porcelets à la naissance 586 porcelets à 1 sem. 580 à 3 sem. et 565 à 4 semaines 558 porcs à 12 sem. 590 porcs à 24 sem.	0% 32.8% 41% 56.6% 60.4% 66.8%		<i>C. coli</i>	Alter <i>et al.</i> , 2005
1 élevage plein air 3 essais	47 porcelets prélevés 1 fois/semaine de 7 à 13 sem	100%	6.4 (de 3 à 7)	<i>C. coli</i> 71% (54 à 99.7%) <i>C. jejuni</i> 29% (0.3 à 46%)	Jensen <i>et al.</i> , 2006
17 élevages	Prévalence nombre de troupeaux positifs	52.9% 9 troupeaux +		<i>C. coli</i> Absence <i>C. jejuni</i>	Oporto <i>et al.</i> , 2007
3 élevages Prevalence intra-elevage	147 animaux Troupeau 1 – 49 animaux Troupeau 1 – 48 animaux Troupeau 1 – 50 animaux	57.8% 91.8% 64.6% 16%		<i>C. coli</i> Absence <i>C. jejuni</i>	Oporto <i>et al.</i> , 2007
80 élevages	(15 animaux par élevage) 800 porcs (440 « environnement »)	99.9% 1 négatif (5 négatifs)		<i>C. coli</i> (>99%)	Varela <i>et al.</i> , 2007
4 élevages naisseurs	68 truies 256 porcelets	33.8% 80.9%			Wehebrink <i>et al.</i> , 2008
12 élevages engraisseurs	362 porcs en croissance 354 porcs à 24 sem.	89.2% 64.7%			Wehebrink <i>et al.</i> , 2008
15 élevages	1310 porcs	87%		<i>C. coli</i> (>99%)	Wright <i>et al.</i> , 2008

Weijtens *et al.* (1993), dans une étude portant sur 8 élevages, dans lesquels 10 porcs sont prélevés à trois moments différents de la période d'engraissement, montrent que le pourcentage de porcs porteurs est élevé et tend à diminuer au cours de l'engraissement (on passe de 95% de prélèvements positifs à 85% en fin d'engraissement avec une quantité plus faible de *Campylobacter* dans les matières fécales).

Dans une autre étude réalisée en 1999, Weijtens *et al.* observent encore une variabilité du nombre de bactéries présentes et certains animaux présentaient ponctuellement des prélèvements négatifs. Cette cinétique d'excrétion est cependant variable selon les conditions d'élevage, ainsi Alter *et al.* (2005) n'observent pas de diminution de la prévalence ni du niveau d'excrétion.

Toutes ces observations suggèrent finalement deux possibilités pouvant expliquer la persistance des *Campylobacter* (Belloc *et al.*, 2004) :

⇒ une excrétion intermittente de *Campylobacter*, comme l'envisagent Von Altrock *et al.* (2006) et comme cela a pu être observé sur des souris (Lee *et al.*, 1986)

⇒ une succession de phases d'élimination et de recontamination des porcs à partir de leurs matières fécales et/ou de celles des autres porcs et/ou à partir d'autres sources de *Campylobacter* présentes dans l'environnement

3.2.1.3. Un portage en *Campylobacter coli*

D'une manière générale, dans la plupart des travaux conduits en Europe, *C. coli* est plus fréquemment isolé que les autres *Campylobacter* (Munroe *et al.*, 1983 ; Oosterom *et al.*, 1985 ; Weijtens *et al.*, 1993 ; Federighi *et al.*, 1996 ; Moore et Madden, 1998 ; Payot *et al.*, 2004 ; Schuppens *et al.*, 2005 ; Oporto *et al.*, 2007 ; Varela *et al.*, 2007 ; Whright *et al.*, 2008). *C. jejuni* peut être isolé plus ou moins fréquemment chez les porcs selon leur environnement, mais généralement en proportion moindre que *C. coli* (Madden *et al.*, 2000 ; Jensen *et al.*, 2006 : 29% des porcs de plein-air de l'étude sont porteurs de *C. jejuni* ; Keller *et al.*, 2007 ; Oporto *et al.*, 2007). Toutefois, *C. jejuni* est décrit par Young *et al.* (2000) et Harvey *et al.* (1999) comme prédominant dans deux élevages aux Etats-Unis. Les autres espèces ne sont isolées qu'épisodiquement.

Les prévalences des différentes espèces de *Campylobacter* peuvent différer en fonction des fermes, de leur environnement, de la population de rongeurs établie et de la provenance des porcelets. De plus, Young *et al.* (2000) soulignent, à nouveau, le faible pouvoir discriminant des méthodes subjectives telles que le test de l'hydrolyse de l'hippurate pour distinguer *C. jejuni* de *C. coli*.

3.2.2. EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE : TRANSMISSION DE *CAMPYLOBACTER* EN ELEVAGE

Les connaissances sur les modalités de contamination des porcs en élevage ne sont encore que partielles, peu d'études ont été conduites sur le sujet. Certaines voies de transmission ont pu être mises en évidence mais leurs impacts respectifs sont encore discutés.

La transmission verticale, par voie transplacentaire, n'a jamais été décrite. Par contre, en élevage naisseur-engraisseur, les porcelets semblent se contaminer dès les premières heures de vie (Young *et al.*, 2000) et le typage génétique des souches souligne une similitude entre les *Campylobacter* isolés chez les truies et leurs porcelets (Weijtens *et al.*, 1997 ; Magras *et al.*, 2004a ; Soutos et Madden, 2007). Les auteurs émettent donc l'hypothèse d'une contamination des porcelets à partir des matières fécales de la truie d'autant plus que le niveau d'excrétion de la truie augmente après la mise bas. Il semblerait qu'il existe une contamination «pseudo-verticale » par l'intermédiaire des matières fécales entre la mère et ses produits sans que les modalités (ingestion de matières fécales, aérosol...) ne soient exactement déterminées.

Cependant, Hume *et al.* (2002) ont observé une différence entre les souches isolées chez les truies et celles présentes chez les porcelets. Cette étude réalisée sur trois truies et 17 de leurs porcelets avec la technique de macrorestriction génomique souligne la grande variété des génotypes dans le tube digestif de porcs qui cohabitent au sein d'un même élevage. Elle appuie les résultats de travaux antérieurs au cours desquels le typage des souches avait mis en évidence une grande diversité génétique parmi les isolats (Weijtens *et al.*, 1997 ; Weijtens *et al.*, 1999). Soutos et Madden (2007) observent également qu'après 66 jours seulement 33% des souches isolées sur les porcelets sont communes avec leurs mères.

Cette grande diversité des génotypes isolés sur les porcs suggère l'existence de plusieurs sources de contamination environnementales mais, jusqu'à présent, aucune source telle que l'eau, l'aliment ou le logement n'a été clairement identifiée.

D'autres modalités de contamination par l'environnement telles que la transmission à partir de l'eau de boisson, d'animaux sauvages (rongeurs, oiseaux, insectes) ou par l'intermédiaire de l'éleveur (en lien avec d'autres productions dans l'élevage) sont donc potentiellement existantes, comme c'est le cas en élevage de volailles. Peu d'études ont pour l'instant été réalisées sur ce sujet. Seuls les travaux de Meerburg *et al.* (2006) et de Jensen *et al.* (2006) ont souligné qu'une contamination des porcs par *Campylobacter* à partir de la faune sauvage autour de l'élevage était possible bien que vraisemblablement peu fréquente.

L'introduction de porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) dans un élevage permet de diminuer le pourcentage d'adultes porteurs de *Campylobacter* par rapport à des élevages peuplés d'animaux conventionnels (Weijtens *et al.*, 2000). Les auteurs de cette publication suggèrent qu'il serait possible de diminuer significativement le taux de contamination par *Campylobacter* en élevage porcin en appliquant des mesures d'hygiène strictes associées à l'introduction de reproducteurs indemnes dans l'élevage. D'autre part, Harvey *et al.*, dans une étude réalisée en 2000, montrent qu'un sevrage précoce des porcelets diminue le niveau de contamination des animaux, résultats en accord avec l'hypothèse d'une contamination des porcelets via les matières fécales des truies.

3.3. PREVALENCE DE *CAMPYLOBACTER* A L'ABATTOIR

Les données chiffrées sur le statut des carcasses à l'abattoir sont limitées et les prévalences obtenues sont extrêmement variables selon les pays, les auteurs et le type d'étude. Les protocoles ne sont pas toujours comparables du fait des différences dans la méthode de prélèvement et d'analyse et du fait de l'hétérogénéité des pratiques d'abattage et du type d'échantillon (Tableau 17).

Tableau 17 : Description de la contamination des porcs par *Campylobacter* à l'abattoir

Nature des prélèvements	Nombre de prélèvements testés	Pourcentage de prélèvements positifs	Espèces identifiées	Référence
Contenu intestin	210	79%	<i>C. jejuni</i>	Oosterom et al., 1985
Carcasses	210	9%		
Carcasses réfrigérées	210	0%		
Matières fécales	58	53,4%	<i>C. jejuni</i>	Colin, 1985
Carcasses avant réfrigération	120	12,5%		Bracewell et al., 1985
Muscles du cou	-	19,6%		Finlay et al., 1986
Muscles du cou et Vésicule biliaire	463	16,9%		Lammerding et al., 1988
Matières fécales	200	100%	<i>C. coli</i> 97% <i>C. jejuni</i> 2%	Mafu et al., 1989
Carcasses	200	23,5%		
Carcasses	600	66,2%		Sorensen et Christensen, 1997
-avant ressuyage	600	13,8%		
Contenu Caecal (3 lots de 50 porcs issus de 4 élevages)	595	De 70 à 100%	<i>C. coli</i> 60% de 20 à 100% <i>C. jejuni</i> 31% de 0 à 76%	Harvey et al., 1999
Estomac(12 lots de 10)	120	54% (de 30 à 90%)	<i>C. coli</i> 100% 107 souches	Rossero et al., 1999
Contenu intestin	24	100%	<i>C. coli</i> 89% <i>C. jejuni</i> 3%	Nesbakken et al., 2003
Amygdales	24	66,7%		
Carcasses avant et après congélation	24	56,7%		
	24	1,7%		
Matières fécales Pool de 10	104	63,5%		Pezzotti et al., 2003
Carcasses	30	33,3%		Pearce et al., 2003
-après saignée	30	0,0%		
-après polissage	30	6,7%		
Carcasses après ressuyage (8sites)	300	9,7%		Mircovich et al., 2004
Contenu caecal	800	77,6%	<i>C. coli</i> 95,7% 2 <i>C. lari</i>	Guévremont et al., 2004
Estomac	240	50,4%		Payot et al., 2004
Matières fécales avant transport	330	79,1%		Alter et al., 2005
après transport	330	78,2%		
Matières fécales	250	100%		Magras et al., 2006
Gorge fin process tuerie	250	19,2%		
Bavette	250	9,6%		
Carcasses réfrigérées	122	0%		Wehebrink et al., 2008

De nombreuses études ont montré que plus de 70% des porcs charcutiers arrivant à l'abattoir sont porteurs de *Campylobacter* au niveau de leurs intestins (79% aux Pays-Bas, Oosterom *et al.*, 1985 ; 98% au Canada, Mafu *et al.*, 1989 ; de 70 à 100% aux USA, Harvey *et al.*, 1999). Plus récemment, une enquête réalisée par Nesbakken *et al.* (2003) en Norvège a mis en évidence un taux de portage intestinal de 100% chez les porcs abattus. De même Pezzotti *et al.* (2003), Guévremont *et al.* (2004), Alter *et al.* (2005) et Magras *et al.* (2006) ont mis en évidence un portage élevé des porcs charcutiers à l'arrivée à l'abattoir avec des prévalences respectivement de 63,5%, 77,6%, 78,2% et 100%. Une étude française a décrit un portage gastrique de 54% chez les porcs charcutiers (Rossero *et al.*, 1999). Ce portage stomacal est à considérer du fait des pratiques d'éviscération par section au niveau du cardia à l'abattoir puisqu'il peut en effet constituer une source de contamination plus difficilement maîtrisable.

L'importance et la fréquence du portage est associée à des quantités élevées de *Campylobacter* présents dans le tube digestif (*C. coli* est présent en plus grand nombre que *Salmonella* ou *Yersinia* (Borch *et al.*, 1996)), avec des niveaux de l'ordre de 10^4 à 10^5 bactéries par gramme de contenu digestif (Oosterom *et al.*, 1985 ; Young *et al.*, 2000 ; Magras *et al.*, 2006).

D'après ces différentes données, toute faute d'hygiène ou tout incident sur la chaîne aboutissant à la souillure des carcasses par les matières fécales peut entraîner la contamination de la viande de porc. Dans les études pré-citées, les pourcentages de contamination des carcasses varient de 9 à 56,7 % après éviscération et diminuent nettement après ressuyage et refroidissement (le taux maximal rapporté est de 3%). Les auteurs évoquent, pour expliquer cette diminution, la forte sensibilité des *Campylobacter* thermotolérants au froid et à la dessiccation (Borch *et al.*, 1996 ; Nesbakken *et al.*, 2003).

La mise en évidence de *Campylobacter* a pu être faite sur les abats (le foie en particulier) ainsi que dans les produits transformés tels que des saucisses. Cependant, sur les carcasses à l'abattoir, et contrairement à la majorité des produits carnés commercialisés, il est retrouvé une très forte majorité de *C. coli*. Beaucoup plus occasionnellement, *C. jejuni* et *C. lari* ont été isolés sur des porcs à l'abattoir (Moore et Madden, 1998). Comme en élevage, une importante variabilité génétique a été mise en évidence lors d'une étude irlandaise portant sur 28 souches par PCR-RFLP (Moore *et al.*, 2002).

3.4. LA VIANDE DE PORC COMME SOURCE POTENTIELLE D'INFECTIONS HUMAINES

3.4.1. IMPORTANCE DES CAMPYLOBACTERIOSES HUMAINES D'ORIGINE PORCINE

Les cas de campylobactérioses humaines d'origine porcine sont le fait de *Campylobacter* thermotolérants et essentiellement de *C. coli*, contractés le plus souvent suite à la consommation de produits d'origine porcine, ou éventuellement par l'intermédiaire de l'environnement dans lequel se trouvent les animaux (contamination de l'eau de boisson). Les porcs sont donc à l'origine d'une zoonose alimentaire à *Campylobacter* thermotolérants.

En France, le poulet est beaucoup plus fréquemment mis en cause mais il existe malgré tout des exemples de contamination à partir de produits d'origine porcine. Dans ces derniers cas, le défaut ou l'absence de cuisson (saucisses cuites au barbecue, porc mariné dans le vinaigre) jouent un rôle important. De même, la contamination croisée avec la viande de poulet, notamment chez le consommateur, pas toujours respectueux des règles d'hygiène lors de la préparation des aliments, est un phénomène dont l'importance a été soulignée par de nombreuses études dont celles de De Boer et Hahne (1990) et de Christensen *et al.* (2001). Plusieurs éléments permettent de penser que la viande de porc pourrait jouer un rôle épidémiologique important dans les campylobactérioses humaines :

- la viande de porc est la viande de boucherie la plus consommée en France, en Europe et dans le Monde. De plus, le succès croissant des charcuteries (produits pas ou peu cuits) et l'augmentation de la consommation de produits tels que le pâté sont des facteurs de risque vis à vis des campylobactérioses (Gillespie *et al.*, 2002).
- le portage intestinal et stomacal de bactérie est souvent à l'origine d'une contamination des carcasses à l'abattoir et *Campylobacter spp.* peut donc potentiellement contaminer la viande de porc, puis le consommateur.
- *C. coli* est très fréquent chez le porc et est impliqué dans 1 à 17% des cas de campylobactérioses humaines. En Europe de l'Est, la prévalence des campylobactérioses à *C. coli* est également très élevée (Kalenic *et al.*, 1985).
- Certaines études ont souligné la survie des *Campylobacter* sur les matrices carnées dont la couenne (Solow *et al.*, 2003)

Afin d'apprécier cette relation entre porcs et campylobactérioses humaines, Guévremont *et al.* (2004) ont comparé les profils génétiques obtenus par macrorestriction génomique de souches de *C. coli* isolées sur des porcs et dans des cas sporadiques de campylobactérioses humaines. Ils en sont arrivés à la conclusion qu'il n'y avait pas de relation épidémiologique entre les isolats des porcs et ceux des cas humains, et que le risque de contamination de l'Homme à partir du porc est faible.

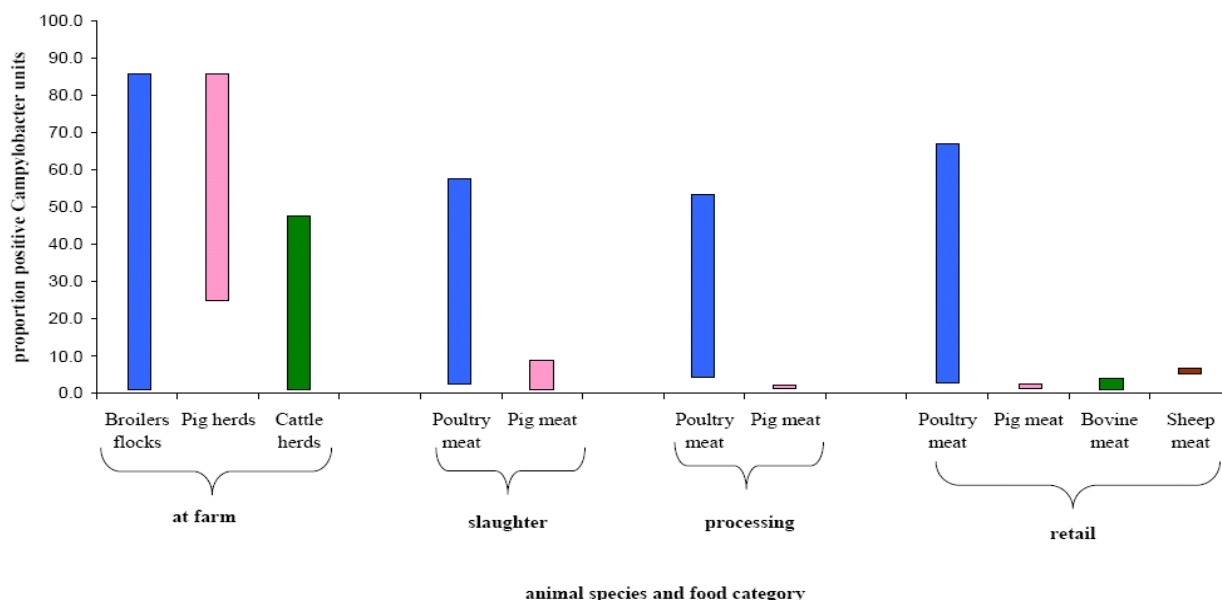
Cependant, des cas de campylobactérioses humaines d'origine porcine ont été décrits dans la littérature, ce qui montre que le risque, bien que faible, existe : anadémie à partir de porc mariné dans le vinaigre (Oosterom *et al.*, 1980 ; Yanagisawa *et al.*, 1980) ; campylobactériose à partir de saucisses de porc (Kapperud *et al.*, 1992) ; consommation de pâté, facteur de risque vis à vis des campylobactérioses (Gillespie *et al.*, 2002). La viande de porc et les produits d'origine porcine ont ainsi été mis en évidence comme responsables en 2006 dans l'Union Européenne de 8 foyers de campylobactérioses avec au total 107 cas humains déclarés dont 4 admissions à l'hôpital sur les 400 foyers déclarés (178 d'origine inconnue) (soit en proportion 3,6% des foyers et 12,4% des cas humains déclarés) (EFSA, 2007)

Globalement, la faible contamination des produits porcins à la boucherie et dans les supermarchés et les habitudes culinaires consistant à manger du porc bien cuit limitent certainement fortement le risque, sans toutefois l'annuler puisqu'il existe des cas d'infections à *Campylobacter* attribués à la viande de porc (Miller et Mandrell, 2005). L'évolution des habitudes de consommation avec une augmentation de viandes grillées, en particulier au barbecue, le succès croissant des charcuteries qui sont des produits pas ou peu cuits (Durand, 1999) et le non-respect d'un certain nombre de règles d'hygiène (risque de contaminations croisées) pourraient accentuer le risque de campylobactérioses à partir de viande de porc (De Boer et Hahne, 1990 ; Kapperud *et al.*, 1992 ; Christensen *et al.*, 2001).

3.4.2. CONTAMINATION DE LA VIANDE DE PORC PAR *CAMPYLOBACTER SPP.*

De nombreuses études se sont intéressées à la présence de *Campylobacter* dans les produits d'origine porcine, de l'abattage jusqu'au consommateur. Les porcs arrivant à l'abattoir sont généralement contaminés pour une proportion importante d'entre eux (jusqu'à

100% dans certaines études : Nesbakken *et al.*, 2003), mais cette contamination diminue au cours du processus d'abattage jusqu'au produit prêt à être consommé, pour finalement atteindre des taux assez faible, de l'ordre de 0 à 0.8% (Figure 13).



Légende : Espèces animales et catégories des différents produits alimentaires

Broilers flocks ⇒ Elevage de poulets
 Pig herds ⇒ Troupeaux de porcs
 Cattle herds ⇒ Troupeaux de bovins

Poultry meat ⇒ Viande de volaille
 Pig meat ⇒ Viande de porc
 Bovine meat ⇒ Viande de bœuf
 Sheep meat ⇒ Viande de mouton

at farm ⇒ en élevage
 slaughter ⇒ à l'abattoir

processing ⇒ découpe des carcasses
 retail ⇒ lors de la vente au détail

Figure 13 : Evolution des proportions d'échantillons de viande fraîche positifs à *Campylobacter* thermotolérant tout au long du procédé d'abattage, pour différents types d'animaux. Données rapportées par les états membres de l'Union Européenne en 2005. Source : EFSA, 2006

Les différentes étapes du processus d'abattage limitent la contamination de la viande à partir du contenu intestinal et/ou entraînent la mort d'une part importante des *Campylobacter* (Albert *et al.*, 2005 ; EFSA, 2006 et 2007), ce qui explique que le risque de campylobactérioses humaines à partir de viande de porc soit relativement faible. La contamination des carcasses est néanmoins possible au cours de l'abattage notamment à partir du tube digestif ou par contamination croisée par l'intermédiaire du matériel comme le

montrent certaines études (Malakauskas *et al.*, 2006). Les *Campylobacter* isolés sur les carcasses sont en grande majorité des *C. coli* et des *C. jejuni*, des *C. lari* ont pu être retrouvés mais plus occasionnellement (Moore et Madden, 1998). L'incidence des *Campylobacter* thermotolérants dans les produits porcins calculée à partir des observations de différents auteurs (Colin *et al.*, 1985 ; Lammerding *et al.*, 1988 ; Adesiyun *et al.*, 1992) souligne une diminution importante de la contamination entre la carcasse (2 à 32% de taux positifs avec un échantillon moyen de 70 prélèvements) et les produits transformés tels que la viande hachée ou la chair à saucisse (0,1 à 2,5% de taux positifs pour 104 à 1442 prélèvements). Néanmoins, pour le foie de porc, l'incidence est en moyenne plus élevée et varie de 6 et 43% pour 100 à 400 échantillons.

En Europe, les données concernant l'occurrence de *Campylobacter* dans la viande fraîche de porc échantillonnée lors de la vente au détail est reportée dans le Tableau 18. La proportion d'échantillons positifs est faible (0-1,1%) mais existe. Des pays comme la Hongrie (N=168), la Slovénie (N=159) et l'Italie (N=172) rapportent respectivement un taux de 4,8%, 0,6% et 0,6% d'échantillons positifs.

Tableau 18 : Données concernant le nombre d'échantillons positifs pour *Campylobacter* dans la viande fraîche de porc lors de la vente au détail. Source : EFSA, 2007

	2006		2005		2004		2003		2002	
	N	% Pos	N	% Pos	N	% Pos	N	% Pos	N	% Pos
Austria	93	1.1	89	1.1	-	-	-	-	-	-
Germany	290	0.7	391	0.5	475	1.9	188	2.7	254	1.2
Netherlands	-	-	389	0	287	1.1	227	0	97	2.1
Spain	40	0	107	0	-	-	-	-	-	-
EU Total	423	0.7	976	0.3	762	1.6	415	1.2	351	1.4

1. Data are only presented for sample size ≥ 25 ; Only data specified as fresh are included. Data on meat products, mechanically separated meat, minced meat, and meat preparations are not included.

N : nombre d'échantillons, % Pos : pourcentage d'échantillons positifs pour *Campylobacter*

D'autre part, il faut rester prudent avec les données observées car les méthodes employées pour déterminer la contamination des denrées d'origine porcine ne sont que peu sensibles et sous-estiment vraisemblablement la proportion de viande contaminée par *Campylobacter* (Fosse *et al.*, 2006).

3.5. CONTEXTE REGLEMENTAIRE

La réglementation européenne en matière de lutte contre les zoonoses d'origine alimentaire s'appuie principalement sur trois textes :

- le règlement européen 2160/2003/CE qui régit la lutte contre *Salmonella* dans les filières avicole et porcine,
- le règlement 2073/2005/CE qui établit les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires d'origine animale,
- la directive 2003/99/CE qui prévoit la surveillance des principaux agents responsables de zoonoses d'origine alimentaire.

En ce qui concerne *Campylobacter*, aucun texte réglementaire européen ne prévoit pour l'instant la mise en place de lutttes spécifiques contre cette bactérie ou de critères microbiologiques concernant la sécurité et le process tout au long de la filière porcine et pour les denrées alimentaires. La directive 2003/99/CE du Parlement Européen et du Conseil du 17 novembre 2003 prévoit cependant la surveillance de *Campylobacter* dans les filières animales dans l'ensemble des états membres. Ces derniers devront ainsi fournir des informations sur le statut des animaux notamment en ce qui concerne *Salmonella* et *Campylobacter*.

La Commission Européenne a chargé l'Autorité Européenne de Sécurité des aliments (EFSA) de préparer une proposition de spécifications techniques pour un programme de surveillance coordonné de *Salmonella* et de *Campylobacter* dans la viande de poulet de chair au sein de l'Union Européenne (UE), adopté le 16 octobre 2006. Le rapport de ce groupe de travail a été mis à jour récemment et les informations viendront compléter les résultats de l'enquête initiale sur la viande de poulet dans les abattoirs réalisée en 2008 dans les Etats membres de l'UE. Concernant la filière porcine, l'organisation de cette surveillance est actuellement en cours de mise en place dans l'Union Européenne.

Certains pays ont anticipé l'application de la directive 2003/99/CE et ont déjà mis en place des programmes de surveillance de leur production. Le Danemark, la Finlande, la Norvège, les Pays-Bas, l'Italie, l'Autriche et la Suède ont ajouté à la surveillance des programmes de maîtrise des contaminations par *Campylobacter*, qui sont pour la plupart déjà effectifs mais principalement dans la filière avicole. Outre la surveillance de la production,

des programmes de maîtrise volontaires des contaminations des troupeaux par *Campylobacter* existent au Danemark et en Suède alors que ces programmes de maîtrise sont obligatoires en Norvège (2001) et en Finlande (2004). Le contenu de ces programmes varie peu d'un pays à l'autre et est essentiellement fondé sur l'application de mesures strictes de biosécurité comprenant notamment un traitement de l'eau à base de chlore et une application rigoureuse des barrières sanitaires à l'entrée des élevages. A l'abattoir, les mesures consistent en l'abattage des lots positifs en fin de journée, assorti d'un traitement thermique ou d'une congélation de surface.

Les pays ayant mis en place ces mesures ont d'ores et déjà observé une baisse de la prévalence dans les lots de volailles, l'extension de ces mesures à d'autres pays et à la filière porcine devrait avoir les mêmes effets. D'autres plans de surveillance ont été mis en place dans l'ensemble des Etats Membres notamment en ce qui concerne l'antibiorésistance des souches de *Campylobacter* isolées dans les filières animales. Les derniers rapports de l'EFSA soulignent en effet que la résistance de la bactérie tant chez l'Homme que chez l'animal aux antibiotiques, et notamment à la ciprofloxacine, médicament antimicrobien couramment utilisé, atteint des niveaux élevés et devient inquiétante.

La détermination du statut de contamination de la filière porcine vis-à-vis de *Campylobacter* est nécessaire pour la mise en place de plans de contrôle, d'épidémiosurveillance ou d'autres options de gestion des risques. Il sera nécessaire d'harmoniser les plans de surveillance pour pouvoir comparer les prévalences respectives des différents pays européens concernant à la fois la contamination des animaux vivants et de la contamination de la viande. De plus, cette nécessité de coordination et d'harmonisation est également à souligner en ce qui concerne les déclarations des campylobactérioses humaines.

Des mesures de luttés spécifiques à la filière porcine et aux *Campylobacter* thermotolérants ne sont pour le moment pas envisageables car les connaissances sur l'épidémiologie de ces bactéries en élevage porcin sont encore insuffisantes.

4. PARTICULARITES DE L'ELEVAGE PORCIN EN FRANCE

4.1. ORGANISATION DE LA FILIERE PORCINE

Première viande produite et première viande consommée, quantitativement, dans le Monde, en Europe et en France, la viande porcine correspond en France et dans l'Union européenne à une filière particulièrement dynamique. La filière de viande porcine et de produits porcins comprend un grand nombre d'opérateurs dont les activités sont diverses. La filière consiste en une succession d'étapes de l'alimentation des animaux jusqu'au consommateur final (Figure 14).

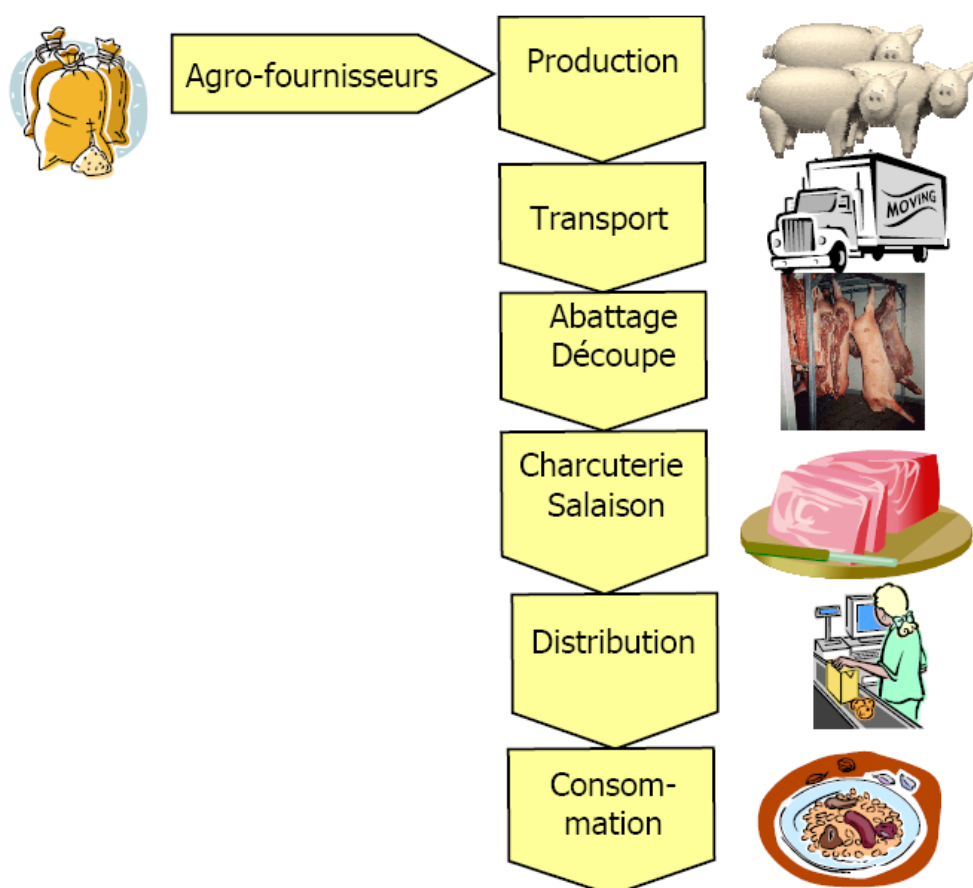


Figure 14 : Schéma simplifié des étapes successives de la filière de viande porcine et de produits porcins. Source : Lurette, 2007

Les *Campylobacter* ne sont pas capables de se multiplier dans les animaux une fois morts, *a fortiori* dans l'environnement et dans les aliments dans des conditions de stockage normales (Park, 2002). Présentés habituellement comme peu résistants dans l'environnement, différentes études ont cependant souligné leur capacité à survivre notamment sur les carcasses, le matériel, les surfaces, l'aliment et l'eau (De Boer et Hahne, 1990 ; Christensen *et al.*, 2001 ; Wilson, 2003 ; Kusumaningrum *et al.*, 2004 ; Cools *et al.*, 2005).

Campylobacter est présent dans le tractus digestif des animaux infectés et est excrété dans les matières fécales. Une contamination peut ainsi survenir au niveau de chacune des étapes de la filière (infection des animaux, contamination des produits porcins ou du matériel) et on peut alors observer la présence de *Campylobacter* dans les produits de consommation.

Cette contamination des denrées peut survenir à différents niveaux de la chaîne :

- chez le consommateur : au moment de la préparation (sur la planche de découpe, par exemple, entre des aliments contaminés et des aliments indemnes) (De Boer et Hahne, 1990 ; Christensen *et al.*, 2001), lors de la conservation (Mazick *et al.*, 2006) ou lors de contaminations croisées manuportées fréquentes notamment lors de barbecue du fait de la manipulation des aliments crus contaminés et en raison d'une cuisson insuffisante de ces aliments (Kapperud *et al.*, 1992).
- lors de la distribution : non-respect des pratiques d'hygiène et contaminations croisées.
- lors de la charcuterie-salaison : les produits sont peu cuits (Durand, 1999) et un mauvais nettoyage du matériel ou des surfaces peut induire la contamination des produits (Kusumaningrum *et al.*, 2004).
- lors des processus d'abattage et de découpe : un accident d'éviscération ou la section du cardia durant le processus d'abattage peuvent entraîner une contamination des plans de travail, du matériel et des carcasses. Cependant, les taux de contamination des carcasses après les étapes de ressuyage et de réfrigération sont relativement faibles.

- sur le quai d'attente ou durant l'étape de transport : les porcs peuvent s'infecter du fait de la présence d'animaux excréteurs. Le stress lié au transport et à la mise à jeûn des animaux avant le départ amplifie probablement l'excrétion des porcs infectés et favorise la contamination des autres animaux.
- Durant l'élevage des porcs charcutiers dans l'exploitation : les animaux peuvent s'infecter en ingérant des bactéries présentes dans les matières fécales de leurs congénères, de leur mère ou présentes dans la salle d'élevage du fait d'une contamination par les animaux eux-mêmes, par les rongeurs, par le personnel de l'exploitation véhiculant *Campylobacter*, par l'eau ou par l'aliment contaminé.

Les porcs infectés à la sortie de l'exploitation jouent un rôle en tant que source de contamination éventuelle des carcasses à l'abattoir. La diminution des risques dans cette filière est corrélée à la détermination du statut de contamination de la filière porcine. La mise en évidence d'un portage asymptomatique chez le porc et d'une contamination précoce dès le début de l'élevage doit dans un premier temps amener à raisonner sur les options de gestion du risque au stade de la production primaire. Il est donc nécessaire d'approfondir les connaissances en terme de diffusion et de persistance du danger dans l'élevage et d'essayer de comprendre la dynamique d'infection de *Campylobacter*.

On observe une grande diversité des souches de *Campylobacter* isolées chez le porc, quelle est la part respective de la variabilité génomique élevée intrinsèque et/ou de la contamination à partir de sources multiples ? Des données épidémiologiques et des données de recherche doivent être produites pour définir de nouveaux indicateurs de suspicion de la présence du danger au stade de l'abattoir et pour déterminer le statut de dangerosité des denrées.

Il est possible d'intervenir aux différents niveaux de la filière :

- ⇒ au niveau de la production primaire pour comprendre les mécanismes de contamination et de transmission de la bactérie

- ⇒ lors de l'abattage et du processus de transformation en veillant à maintenir et/ou améliorer les bonnes pratiques et les mesures d'hygiène
- ⇒ durant les étapes de préparation de l'aliment : il est nécessaire de sensibiliser les industriels et le consommateur quant à l'application de mesures d'hygiène efficaces

La réglementation fixera à terme des objectifs au niveau de la production primaire. Il est donc nécessaire de s'y intéresser et en particulier il sera demandé aux Etats Membres de l'Union Européenne de fournir des informations concernant le statut de contamination des animaux dans les élevages français, notamment vis à vis de *Campylobacter* (Directive 2003/99/CE). L'élaboration du calendrier d'application de la directive est en cours.

4.2. ORGANISATION DE LA PRODUCTION PRIMAIRE

4.2.1. STRUCTURE PYRAMIDALE DE LA FILIERE DE PRODUCTION DES PORCS CHARCUTIERS

L'activité de production porcine s'est progressivement concentrée sur un nombre d'opérateurs assez limités, de plus en plus regroupés géographiquement. Actuellement, on dénombre environ 23 000 élevages de porcs en France et 65 % de ces élevages sont regroupés dans deux régions, Bretagne et Pays de la Loire. Ces opérateurs associés à la production de porcs charcutiers sont groupés en structures économiques au sein desquelles des troupeaux sont mis en relation par l'achat et la vente d'animaux. Plusieurs structures de production peuvent être en relation par le biais de flux d'animaux correspondant à des porcs à différents stades de leur croissance ou à des animaux reproducteurs.

En France, l'organisation pyramidale des troupeaux correspond à une hiérarchie des élevages selon leur niveau génétique (Figure 15). La diffusion du progrès génétique se réalise donc par le biais de flux d'animaux reproducteurs unidirectionnels (du haut vers le bas de la pyramide) entre les troupeaux organisés en trois étages selon une structure pyramidale : l'étage de sélection, l'étage de multiplication puis l'étage de production.

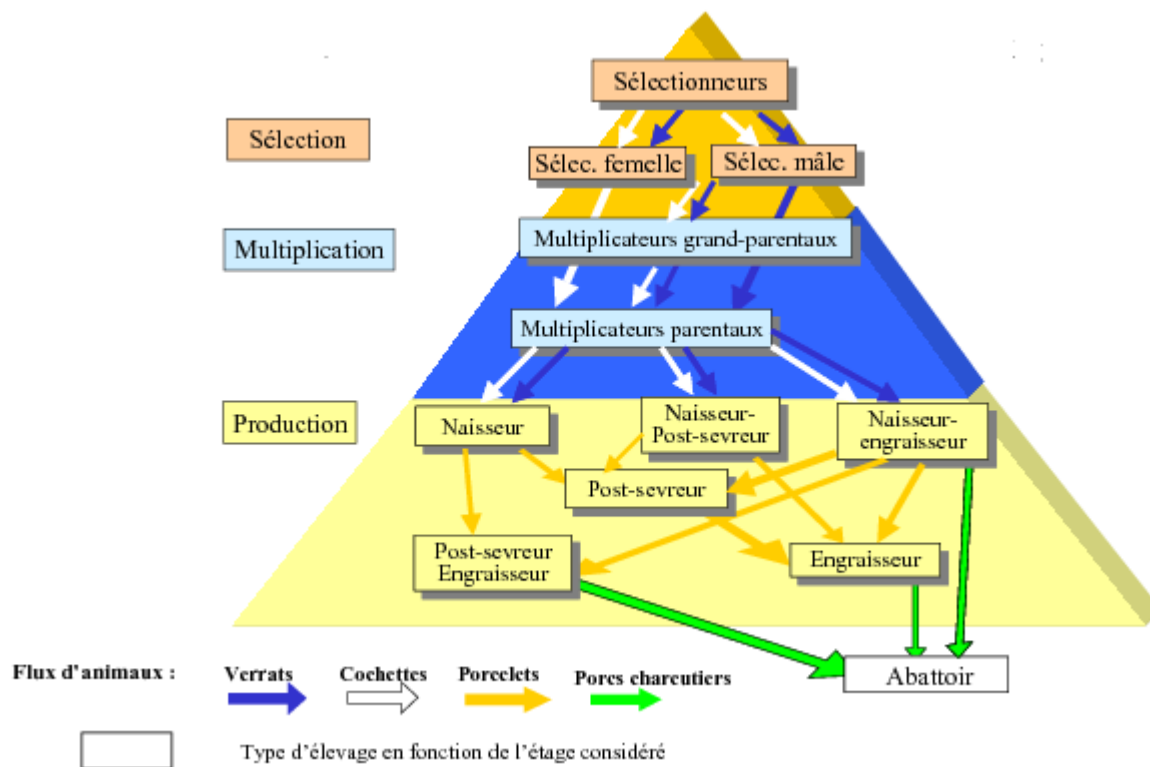


Figure 15 : Structure pyramidale des élevages porcins et schéma des flux d'animaux entre troupeaux aux élevages de sélection, de multiplication et de production.
Source : Lurette, 2007

Au sommet de la pyramide se trouvent donc les élevages de sélection, peu nombreux, représentant environ 1,5% de l'effectif de truies en production. L'étage de sélection approvisionne les autres niveaux de la pyramide et les centres d'insémination artificielle en reproducteurs sélectionnés de race pure. La sélection a pour but de modifier peu à peu le patrimoine génétique des animaux d'une population afin d'améliorer le niveau des performances.

Au niveau intermédiaire, il s'agit de l'étage de multiplication où les troupeaux sont entièrement renouvelés par les élevages de sélection. Ces multiplicateurs croisent les races afin d'obtenir des troupeaux grands-parentaux et parentaux et d'approvisionner en animaux reproducteurs (cochettes et verrats croisés) les troupeaux de production.

A la base de cette structure pyramidale se trouvent les élevages de production qui se fournissent en truies parentales provenant de l'étage de multiplication selon un programme de livraison systématique et en verrats terminaux utilisés en saillie naturelle ou en prélèvement à la ferme. Ces élevages ont pour but de fournir des porcelets sevrés (vente de porcelets de 8kg ou de 25kg) ou de livrer des porcs charcutiers à l'abattoir.

4.2.2. LES DIFFERENTS TYPES D'ELEVAGE

Plusieurs types d'élevages sont distingués au sein des élevages producteurs selon qu'ils réalisent l'ensemble ou une partie des étapes de la production des porcs charcutiers destinés à l'abattoir :

- des élevages naisseurs-engraisseurs : c'est l'orientation dominante des élevages français (73,1 % du cheptel porcin). Ces troupeaux s'approvisionnent en animaux reproducteurs, réalisent la phase de reproduction des truies et produisent des porcs charcutiers destinés à l'abattoir. Ces unités de production réalisent le naissage, le sevrage, le post-sevrage et l'engraissement des animaux jusqu'au départ pour l'abattoir.
- Des élevages naisseurs avec vente au sevrage ou en fin de post-sevrage (1,9 % et 2,1% respectivement) : ces élevages réalisent uniquement la phase de naissage pour vendre les porcelets au sevrage (vers 8kg) ou réalisent le naissage et le début de la phase de croissance après le sevrage (appelée phase de post-sevrage) pour vendre les porcelets vers 25kg. Ces derniers élevages sont qualifiés de « naisseurs traditionnels ».
- Des élevages post-sevreurs (0,4 %) et post-sevreurs-engraisseurs (8,7 %) : les troupeaux post-sevreurs-engraisseurs, complément des élevages naisseurs, achètent des porcelets sevrés de 8kg et réalisent le post-sevrage puis l'engraissement des animaux jusqu'à leur départ à l'abattoir. L'activité spécialisée de post-sevrage est également possible, bien que de plus en plus rare ; les post-sevreurs s'approvisionnent en porcelets sevrés de 8kg et réalisent uniquement la période de post-sevrage.

- Des élevages engraisseurs (13,8 %) : les éleveurs achètent des porcelets sevrés de 25kg et réalisent leur engraissement jusqu'à un poids moyen de 110 kg, poids auquel les porcs charcutiers sont envoyés à l'abattoir.

4.3. CONDUITE D'ELEVAGE EN PRODUCTION PORCINE

Etant donné que la plupart des exploitations françaises de l'élevage de production sont des troupeaux naisseurs-engraisseurs, nous nous intéresserons donc par la suite uniquement à ce type d'élevage. La taille moyenne de ces élevages est environ de 183 truies et est similaire aux élevages allemands (163 truies en Westphalie), inférieure aux élevages des Pays-Bas (300 truies) ou du Danemark (331 truies) et relativement faible comparativement aux élevages espagnols (657 truies) ou américains (1319 truies) (données 2007 du site de l'ITP).

La conduite du naissage comporte la conduite de la reproduction, l'élevage du porcelet de la naissance au sevrage et le renouvellement du troupeau des reproducteurs. La truie peut-être fécondée toute l'année et la gestation dure 114 jours. Selon le stade physiologique, les truies reproductrices sont réparties le plus souvent dans trois ateliers : la verraterie-attente saillie, le local des truies gestantes et les maternités. Les modes de logement varient en fonction du stade physiologique. En verraterie-attente saillie, les truies sont généralement en cases individuelles. Au cours de la gestation, elles sont logées en cases individuelles ou collectives, mais dans tous les cas toutes les bandes de truies simultanément gestantes sont regroupées au sein d'une même salle. Pour la mise bas et l'allaitement, elles sont logées dans des cases individuelles avec leur portée, ces cases étant regroupées dans des salles de maternité. L'élevage des porcelets sevrés puis des porcs charcutiers jusqu'au poids d'abattage (entre 110 et 115 kg de poids vif), vers 25 semaines d'âge, est organisé le plus souvent en deux étapes : post-sevrage et engraissement (Figure 16). Il se réalise dans des locaux spécifiques où les porcelets sont logés en cases collectives, elles mêmes regroupées en salles (une salle par bande le plus souvent).

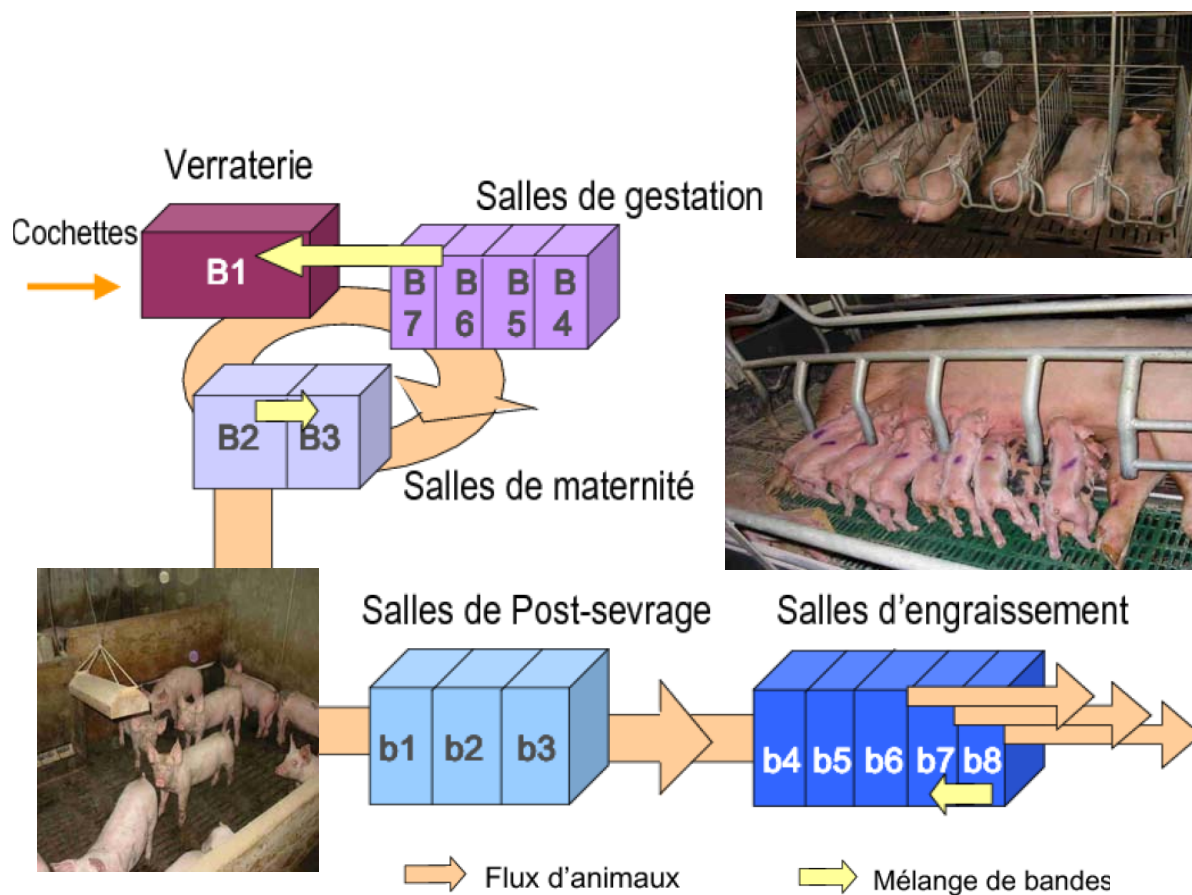


Figure 16 : Schéma des flux d'animaux planifiés ou non au sein d'un troupeau naisseur-engraisseur avec une conduite en bandes à 3 semaines

4.3.1. PRINCIPES DE LA CONDUITE EN BANDES

Au sein d'un troupeau naisseur-engraisseur, la conduite en bandes est le système le plus répandu en France. La conduite en bandes en élevage porcin a été mise en place à partir de 1968 à l'initiative de l'Etablissement Départemental de l'Élevage des Côtes d'Armor.

Le cheptel de truies est divisé en lots de taille égale dont la conduite est synchronisée. Les lots, appelés bandes de truies, regroupent des animaux au même stade physiologique. Par conséquent, les truies d'une même bande sont saillies naturellement ou inséminées artificiellement de façon simultanée ce qui permet de regrouper les mises-bas. Les portées des

truiés issues d'une même bande composent alors une bande de porcelets conduits ensemble du sevrage jusqu'au départ des porcs charcutiers pour l'abattoir.

Tout au long de la croissance des animaux, les bandes de porcelets puis les bandes de porcs à l'engrais ne sont théoriquement pas mélangées entre elles. Ainsi, au cours de sa croissance, une bande de porcs occupe successivement plusieurs salles d'élevage et chaque salle n'est occupée que par une seule bande. L'intérêt de cette conduite est une occupation en « tout-plein/tout-vider » des locaux d'élevage puisque les animaux d'une même bande entrent et sortent d'une salle au même moment. Entre deux bandes, les locaux font alors l'objet d'un protocole de nettoyage / désinfection suivi d'un vide sanitaire de plusieurs jours.

4.3.2. OBJECTIFS DE LA CONDUITE EN BANDES

Les objectifs théoriques de la conduite en bandes dans un élevage porcin sont multiples et peuvent être répartis en trois catégories.

4.3.2.1. Objectifs organisationnels

Plusieurs études s'accordent pour dire que la conduite en bandes permet une meilleure organisation et une rentabilisation du travail de l'éleveur (meilleure utilisation des compétences personnelles, réalisation moins fréquente mais plus efficace des tâches) ainsi qu'une anticipation des périodes à forte activité par rapport à un type de conduite en flux continu (Friendship et Kains, 1998 ; Moore et Cargill, 2005 ; Bown, 2006). De plus, les études de Moore et Cargill (2005) et de Friendship et Kains (1998) précisent que le principe de la conduite en bandes permet une meilleure utilisation des locaux et du matériel d'élevage.

4.3.2.2. Objectifs économiques

Les animaux de même stade physiologique (truiés) ou de même âge (les porcelets et les porcs charcutiers) sont conduits ensemble. Les approvisionnements de l'élevage en aliment adapté à chaque catégorie d'animaux ou en semence (pour les élevages pratiquant l'insémination artificielle) se font donc en grande quantité et de façon groupée, ce qui permet de bénéficier de moindres coûts d'acheminement (Moore et Cargill, 2005). Les porcs

charcutiers commercialisables sont livrés régulièrement à l'abattoir par lots homogènes et de taille importante permettant ainsi une diminution des frais de transport. Il est également plus facile de négocier et d'obtenir des prix intéressants en ce qui concerne la commercialisation de la viande (Friendship et Kains, 1998 ; Moore et Cargill, 2005 ; Bown, 2006).

4.3.2.3. Objectifs sanitaires et zootechniques

✓ Intérêts de la conduite en « tout-plein/tout-vide »

Un des principaux objectifs de la conduite en bandes est la réalisation du « tout-plein/tout-vide » dans les différentes salles de l'élevage, notamment en maternité, en post-sevrage et en engraissement (Caugant et Quéméré, 1999). Ce système de conduite des salles ouvre la possibilité de mettre en place un nettoyage, une désinfection et un vide sanitaire strict qui permettent (i) d'améliorer la santé des animaux, (ii) d'augmenter le gain moyen quotidien (GMQ) et l'indice de consommation, et (iii) de baisser le taux de mortalité et les coûts de traitement (Bown, 2006).

✓ Insémination artificielle et Mise-bas

Les truies d'une même bande sont sevrées le même jour, elles viennent donc en chaleur au même moment et sont inséminées à quelques jours d'intervalle. Cette organisation est difficile à mettre en œuvre avec des saillies naturelles car la demande simultanée en verrats est trop importante. L'insémination artificielle (IA) est donc le plus souvent pratiquée (Bown, 2006), elle permet d'améliorer la diffusion du progrès génétique et de garantir la santé du troupeau (Armstrong, 2002 ; Moore et Cargill, 2005). Un nombre important de truies met bas à seulement quelques jours d'intervalle, les adoptions de porcelets au sein de la bande sont alors plus faciles (Armstrong, 2002 ; Moore et Cargill, 2005 ; Bown, 2006) et contribuent à diminuer la mortalité des porcelets en période de pré-sevrage (Friendship et Kains, 1998) notamment en équilibrant les tailles de portée.

✓ Ambiance des bâtiments et Alimentation

Dans un élevage conduit en bandes, le nombre de salles nécessaires au logement des animaux est réduit et la taille de celles-ci augmente puisqu'un plus grand nombre d'animaux

ayant les mêmes besoins arrive en même temps. La gestion des principaux paramètres d'ambiance, à savoir la température et la ventilation, est plus facile et permet d'adapter précisément l'ambiance des bâtiments aux besoins des animaux (Friendship et Kains, 1998 ; Moore et Cargill, 2005). De même, l'alimentation peut être adaptée à chaque classe d'âge et il est plus aisé de réaliser des transitions entre les différents types d'aliments (Moore et Cargill, 2005 ; Bown, 2006).

4.3.3. MISE EN OEUVRE DE LA CONDUITE EN BANDES

La conduite avec un intervalle entre bandes de 21 jours est la plus fréquemment rencontrée en France (86% des élevages naisseurs-engraisseurs en 2000 selon les données de l'Institut Technique du Porc). Cette conduite en bandes « 3 semaines » reste la plus classique et la plus justifiée dans les élevages de moins de 200 truies (Le Bas, 2001). De façon plus générale, elle est adaptée à des élevages de 60 à 300 truies (ITP, 2000).

Le cycle d'une bande correspond au cycle de reproduction de la truie, composé de trois phases : la gestation de 114 jours en moyenne, la lactation de 21 ou 28 jours en fonction du choix de l'âge des porcelets pour le sevrage provoqué (25,1 jours en moyenne selon le résultat Gestion Technique des Troupeaux de Truie 2004 de l'ITP) et l'intervalle sevrage-saillie ou sevrage-oestrus (ISO) de 5,1 jours en moyenne (Résultat GTTT 2004 de l'ITP). En moyenne, le cycle d'une bande est donc de 144,2 jours soit 20 à 21 semaines (Figure 17).

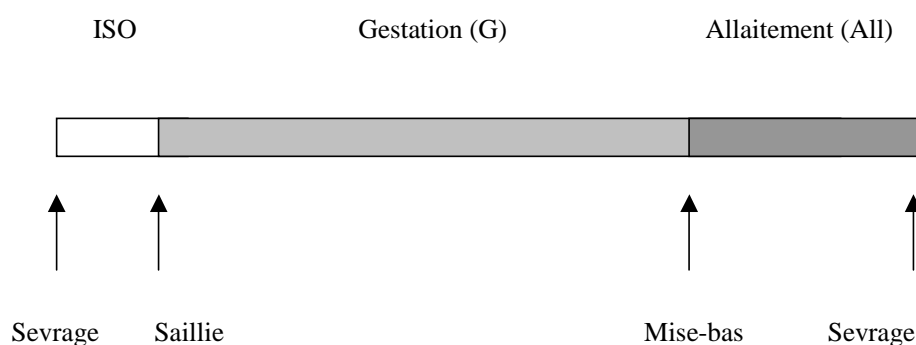


Figure 17 : Cycle de reproduction de la truie (ISO : intervalle sevrage-oestrus)

Le nombre de bandes N s'obtient en divisant la durée du cycle d'une bande par l'intervalle entre bandes souhaité :

$$N = (ISO + G + All) / \text{Intervalle entre bandes}$$

L'effectif de truies par bande est alors égal à l'effectif global du troupeau de truies productives divisé par le nombre de bandes N (Le Borgne et Jegou, 1997).

L'âge au sevrage le plus adapté à « la conduite 3 semaines » est de 28 jours (Le Borgne et Jegou, 2000) : le cycle de la truie est alors de 147 jours et l'effectif total des truies productives de l'élevage est réparti en 7 bandes. Cette conduite est adaptée au cycle oestral de la truie puisqu'il est facile, en cas d'échec à l'insémination, d'intégrer la truie à la bande suivante.

✓ Flux d'animaux au sein du troupeau et gestion des salles

Au sevrage, les porcelets sont transférés en salle de post-sevrage pour 8 semaines, puis en salle d'engraissement jusqu'à leur départ pour l'abattoir vers 25 semaines d'âge (Figure 16). Le nombre de salles nécessaires dans chaque stade est calculée à partir de la formule

$$S_x = (D+V) / \text{Intervalle entre bandes}$$

Avec S_x : Nombre de salle pour le stade x
D : Durée dans ce stade
V : Durée du vide sanitaire dans la salle.

Par exemple, pour calculer le nombre de salles nécessaires en maternité où la durée d'occupation est de 35 jours (7 jours d'adaptation des truies + 28 jours jusqu'au sevrage des porcelets) et le vide sanitaire de 7 jours. L'intervalle entre bandes est de 3 semaines soit 21 jours ainsi : $S_{\text{Maternité}} = (35 + 7) / 21 = 2$. Deux salles sont nécessaires en maternité.

✓ Planification hebdomadaire du travail de l'éleveur

Le travail de l'éleveur est réparti entre les différentes bandes selon le stade physiologique des animaux (saillie, mise-bas et sevrage). Les séquences sont répétées de façon régulière avec une tâche différente à réaliser par l'éleveur chaque semaine (Figure 18).

Se mai ne	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
B1	IA																MB				Se
	Verraterie			Salle de Gestation												Salle de maternité					
B2		Se	IA																		MB
	Mat		Verraterie			Salle de gestation												Mat			
B3	MB				Se	IA															
	Salle de maternité			Verraterie			Salle de Gestation														
B4				MB				Se	IA												
	Gest			Salle de Maternité			Verraterie			Salle de gestation											
B5							MB				Se	IA									
	Salle de gestation						Salle de maternité			Verraterie			Gest								
B6										MB				Se	IA						
	Salle de gestation									Salle de maternité			Verraterie			Gest					
B7														MB				Se	IA		
	Salle de gestation												Salle de maternité			Verraterie					

SEV : Sevrage, IA : Insémination Artificielle, MB : Mise-Bas et Bx : Bande numéro x.

Figure 18 : Schéma de la planification hebdomadaire des évènements principaux de conduite de reproduction des truies dans le cas d'une conduite en bandes avec un intervalle de trois semaines entre bandes.

Source : Lurette, 2007

Il existe d'autres possibilités de conduite qui peuvent être dictées par des choix sanitaires, par une volonté d'organisation différente ou par la taille du troupeau de truies. Dans le cas d'un élevage existant, le choix d'une conduite optimale est fonction des bâtiments présents, de la disponibilité en main d'œuvre, des objectifs de productivité et des objectifs de gestion sanitaire (Le Bas, 2001). On distingue ainsi les conduites à petit nombre de bandes

pour les petits élevages (conduite en 4 bandes avec un intervalle entre bandes de 5 semaines ou conduite en 5 bandes avec un intervalle entre bandes de 4 semaines) et la conduite avec un intervalle entre bandes de 7 jours, plus couramment appelée « conduite à la semaine », qui s'adapte à des élevages de plus de 300 truies (ITP, 2000). Chaque semaine, l'ensemble des tâches est à effectuer pour 3 bandes différentes (mise-bas, sevrage et insémination ou saillie), ce qui nécessite la présence d'un personnel spécialisé à chaque stade

4.3.4. STRUCTURES DE CONTACT ENTRE ANIMAUX AU SEIN DE L'ELEVAGE

Cette conduite en bandes induit une structure de contact particulière essentielle à considérer pour étudier la transmission d'un pathogène au sein d'un élevage porcin. Au sein de cette structure de contact, on peut mettre en évidence l'absence ou la présence de contacts entre certains animaux et les caractériser selon leur type (direct ou indirect par l'environnement), leur intensité et leur fréquence. En élevage porcin, la conduite en bande stricte est généralement recommandée et permet, en théorie, une occupation des salles en « tout-plein/tout-vide » par les porcs en croissance : normalement, les animaux issus de bandes différentes n'entrent donc pas en contact direct.

Cependant, plusieurs enquêtes menées ces dernières années tendent à montrer que la conduite en bandes stricte, jusqu'au départ des porcs charcutiers à l'abattoir, n'est pas toujours respectée.

Le Borgne et Jegou (2000) déclarent que les règles fondamentales de la conduite en bandes (absence de mélange d'animaux entre bandes, limitation des mélanges successifs d'animaux dans une même bande, respect des densités d'animaux (moins de 100 kg/m²) et hygiène stricte (pédiluves, marche en avant, lavages, désinfections, vides sanitaires)) ne sont pas systématiquement respectées entraînant ainsi des dérives. Pour ces auteurs, la recherche de la rentabilisation maximale des bâtiments a été le prétexte à leur sur-utilisation et aux mélanges de bandes pour atteindre un chargement maximal par case. Les principales causes avancées sont : l'augmentation de la taille des ateliers, l'amélioration de la prolificité des truies, l'amélioration des performances de croissance des porcelets et le poids des contraintes environnementales (ralentissement de la modification du parc de bâtiments d'où une absence de cohérence de la chaîne des bâtiments).

De plus, dans un troupeau porcin, des variations d'effectif surviennent dans les bandes de truies du fait de la fécondation, des avortements et de la mortalité. Des variations d'effectif sont de plus observées dans les bandes de porcelets et sont liées à la taille des portées et à la mortalité des animaux. Enfin, des variations concernant la durée de séjour des animaux dans les salles sont aussi fréquemment rencontrées, notamment pour la durée de séjour des porcs en engraissement qui varie selon leur vitesse de croissance.

Une enquête en exploitations a été réalisée en 2006 par Hébert pour 47 troupeaux naisseurs-engraisseurs (Hébert, 2006). Afin de remplir les salles de maternité, les éleveurs inséminent un nombre de truies qui tient compte des éventuels échecs lors de l'insémination ou de la gestation. Cependant, la variabilité du nombre de truies en échec de reproduction entraîne soit des places vides, soit des truies excédentaires qu'il faut loger ou réformer pleines. La réforme stricte de ces truies excédentaires est très rarement pratiquée en élevage (5 troupeaux sur 47) (Hébert, 2006).

Pour maximiser le produit de la commercialisation des porcs charcutiers, les éleveurs doivent livrer à l'abattoir des lots de porcs charcutiers de poids homogène, ce qui nécessite quelques fois des adaptations de conduite. Ces adaptations visent à réduire le nombre d'animaux livrés en dessous du poids réglementaire (considérés hors-gamme) et peuvent ainsi induire des contacts directs entre porcs charcutiers issus de bandes différentes par le biais d'un mélange de bandes. Elles peuvent aussi augmenter l'intensité des contacts indirects du fait de la suppression des vides sanitaires qui permettent la décontamination des salles entre bandes. L'étude de Hébert (2006) a souligné la fréquence des mélanges de bandes en engraissement, ces derniers pouvant intervenir en début ou en fin de séjour dans les salles.

Les adaptations à la conduite en bandes sont donc à considérer puisqu'elles influent sur les interactions entre animaux, autrement dit sur la structure de contact et par conséquent sur la propagation d'agents pathogènes au sein du troupeau.

5. CONCLUSION ET OBJECTIFS DE LA THESE

Les bactéries appartenant au genre *Campylobacter* sont actuellement considérées comme la première cause de maladies infectieuses d'origine alimentaire chez l'Homme dans les pays développés (Friedman *et al.*, 2000 (USA) ; AFSSA, 2004 (France) ; Vaillant *et al.*, 2004 (France)).

Les animaux d'élevage, et en premier lieu les volailles, constituent des réservoirs de ces bactéries dont ils sont fréquemment porteurs sains. Le cadre réglementaire européen 2160/2003 relatif au contrôle des agents zoonotiques dans la chaîne alimentaire prend en compte ces dangers en imposant la surveillance des denrées d'origine animale. Concernant la filière porcine, différentes études soulignent une forte contamination des animaux par les *Campylobacter* thermotolérants en élevage et à l'abattoir, en particulier par *C. coli* (Oosterom *et al.*, 1985 ; Weijtens *et al.*, 1993 ; Moore et Madden, 1998 ; Saenz *et al.*, 2000 ; Alter *et al.*, 2005, EFSA, 2006 ; EFSA, 2007).

Cependant les études épidémiologiques portant sur *Campylobacter* en élevage porcin rapportées dans la littérature sont peu nombreuses et chacune d'entre elles concerne un faible nombre d'élevages. Elles visent à renseigner la prévalence du portage à différents stades de l'élevage et dans certains cas à déterminer les modalités de contamination des animaux. Néanmoins, il convient de considérer avec prudence les données quantitatives sur le niveau de contamination par *Campylobacter* en raison des difficultés techniques de culture *in vitro* de la bactérie et par conséquent de son dénombrement. Des informations complémentaires sont donc indispensables afin d'évaluer les modalités de transmission des *Campylobacter* et d'établir un statut de dangerosité pour la filière porcine.

L'objectif de la thèse est donc de produire des méthodes et des connaissances permettant d'étudier le portage de *Campylobacter* en élevage porcin. Elle aura notamment pour but de préciser quels sont les mécanismes de transmission expliquant la dynamique d'infection en élevage porcin.

Une meilleure connaissance de la cinétique d'excrétion de *Campylobacter* dans les matières fécales des porcs (durée et intermittence de l'excrétion, variation dans le temps de la quantité de *Campylobacter* présents dans les matières fécales, description de la variabilité des souches excrétées simultanément et à différents moments) serait un point essentiel pour comprendre les modalités de transmission et de dissémination de cette bactérie. La possibilité d'utiliser des techniques de mise en évidence directe rapides et fiables telles que la PCR quantitative en temps réel constitue un préalable pour l'étude du portage de *Campylobacter* chez le porc.

D'où un premier objectif de description de la cinétique d'excrétion de *Campylobacter* chez le porc afin d'évaluer la durée d'excrétion, l'existence éventuelle d'une intermittence, la variabilité de la quantité excrétée et les espèces excrétées.

Afin de formuler des hypothèses sur les modalités de transmission de *Campylobacter* en élevage, il est nécessaire de décrire les souches au niveau moléculaire pour les «tracer» et établir un lien épidémiologique.

D'où un second objectif concernant la description de la variabilité génétique des souches de *Campylobacter* chez le porc (approche *in vitro* puis approche par infection expérimentale) afin d'analyser et de renseigner les différentes composantes de l'hétérogénéité des profils observés en élevage porcin.

Une première étape est la mise au point et la validation de méthodes de quantification et de discrimination rapide des espèces majeures de *Campylobacter* à l'aide d'une méthode de biologie moléculaire, en l'occurrence la technique de PCR quantitative en temps réel. Il serait intéressant que cette méthode PCR multiplex quantitative en temps réel puisse mettre en évidence la présence de *Campylobacter spp.* et différencier *C. coli* et *C. jejuni* directement à partir de prélèvements polycontaminés tels que des matières fécales ou des prélèvements environnementaux. De plus, outre sa capacité à quantifier directement *Campylobacter*, la présence d'un témoin interne bactérien d'extraction et d'amplification permettrait de contrôler la qualité de l'extraction et la présence éventuelle d'inhibiteurs de la PCR dans l'échantillon.

Il conviendra aussi d'évaluer la valeur informative de la méthode de typage moléculaire choisie pour décrire la variabilité génétique des souches de *Campylobacter* chez le porc *in vitro* par analyse génomique après plusieurs repiquages d'une même souche.

Une deuxième étape sera alors d'utiliser les techniques de PCR quantitative en temps réel pour décrire les modalités de la cinétique d'excrétion de *Campylobacter* dans les matières fécales des porcs dans le cadre d'une approche par infection expérimentale. En parallèle, cette infection expérimentale permettra également de valider et de calibrer la méthode de typage moléculaire choisie pour décrire la variabilité génétique des souches de *Campylobacter* chez le porc *in vivo* dans des conditions contrôlées.

Les plans d'infection expérimentale envisagés comporteront en particulier les dispositifs suivants :

- ◆ Infection par une souche de *C. coli* : étude de la durée d'excrétion, quantification, description de la variabilité des souches isolées au cours du temps. Cette expérimentation sera répétée sur plusieurs animaux (éventuel effet animal) et avec plusieurs souches (éventuel effet souche).
- ◆ Infection par une souche de *C. jejuni*
- ◆ Infection par plusieurs souches distinctes de *C. coli* et de *C. jejuni* : étude du rôle des co-infections dans la variabilité des souches isolées au cours du temps.

Une troisième étape concernera la mise en place d'une enquête épidémiologique en élevage au cours de laquelle un suivi de la cinétique d'excrétion de *Campylobacter* dans les matières fécales de porcs infectés naturellement sera réalisé de la maternité à la fin de l'engraissement. En parallèle, le typage moléculaire permettra de décrire la variabilité des souches de *Campylobacter* isolées en élevage de porcs.

A terme, les données obtenues seront alors utilisées pour élaborer des hypothèses sur la dynamique d'infection de *Campylobacter* en élevage porcin et la transmission de l'agent pathogène au sein de l'élevage. Différentes hypothèses de transmission pourront être envisagées.

CHAPITRE II :

MISE AU POINT ET VALIDATION

DE METHODES PCR

1. CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE

La possibilité de cultiver *in vitro* *Campylobacter* a permis de définir les principales caractéristiques morphologiques, culturales et biochimiques des espèces susceptibles d'être à l'origine de troubles de santé chez l'Homme (Annexe 1). Cependant, leur culture reste longue et difficile du fait de conditions particulièrement exigeantes et leur caractérisation biochimique, menée en association avec l'évaluation de la sensibilité à deux antibiotiques, présente elle aussi des difficultés d'interprétation (Nachamkin et Blaser, 2000 ; Allos, 2001 ; Meinersmann *et al.*, 2002). Ces tests (tels que la recherche de l'activité oxydase, catalase, le test d'hydrolyse de l'hippurate et l'évaluation de la sensibilité à l'acide nalidixique et à la céphalotine) sont préconisés par la norme NF ISO 10272 (méthode de référence pour la recherche des *Campylobacter* thermotolérants dans les aliments).

Pour l'instant, dans les laboratoires de microbiologie clinique, l'identification de *C. jejuni* et de *C. coli* à partir de matières fécales ou d'isolats cliniques en utilisant les méthodes conventionnelles de culture peut prendre jusqu'à cinq jours. De plus, *C. jejuni* et *C. coli* sont souvent différenciés uniquement par un test phénotypique d'interprétation délicate évaluant leur capacité à hydrolyser l'hippurate (Linton *et al.*, 1997 ; Englen *et al.*, 2003). Ce test est habituellement positif pour *C. jejuni*, néanmoins, dans les conditions de laboratoire usuelles environ 10% des isolats cliniques de *C. jejuni* présentent un résultat négatif. D'autres caractères phénotypiques peuvent être pris en compte mais ils ne permettent pas toujours une discrimination absolue entre les espèces de *Campylobacter*, notamment entre *C. jejuni* et *C. coli*. Par conséquent, les méthodes de biologie moléculaire représentent une alternative à l'identification de *Campylobacter* par les méthodes phénotypiques basiques.

La PCR et ses déclinaisons ont permis depuis quelques années la détection d'agents microbiens parfois difficilement mis en évidence par les méthodes classiques de diagnostic. Ses applications sont multiples et son utilisation, notamment dans les études épidémiologiques, ne cesse de se généraliser. Différentes techniques ont ainsi été mises au point pour l'identification de *Campylobacter spp.* ou la différenciation de souches de *Campylobacter* préalablement isolées par culture (Denis *et al.*, 1999 ; Englen *et al.*, 2002 ; Volokhov *et al.*, 2002 ; Klena *et al.*, 2004 ; Nayak *et al.*, 2005).

Dans des matrices complexes telles que les produits carnés ou les matières fécales, la présence d'inhibiteurs rend plus difficile l'utilisation des techniques moléculaires pour la détection et l'identification directe des *Campylobacter* (Wilson *et al.*, 2000 ; Denis *et al.*, 2001). Pourtant, un certain nombre d'essais utilisant des PCR conventionnelles ont été décrits pour l'identification et la caractérisation des *Campylobacter* à partir de différents types d'échantillons, incluant les matières fécales (Linton *et al.*, 1997 ; Houg *et al.*, 2001 ; Keramas *et al.*, 2004 ; Persson et Olsen, 2005), les denrées alimentaires (Sails *et al.*, 2003a ; Mateo *et al.*, 2005) et les bactéries en culture (Wang *et al.*, 2002). Pour revue, On et Jordan (2003) et Debruyne *et al.* (2008) ont évalué les performances de plusieurs techniques PCR ciblées sur des gènes variés permettant d'identifier *C. jejuni* et *C. coli* à partir de cultures pures ou à partir de prélèvements cliniques tels que des matières fécales. Ces auteurs dressent un bilan permettant à des chercheurs ou à des laboratoires de choisir la technique la plus appropriée en fonction de leurs objectifs et de leurs besoins spécifiques.

Le développement récent de la PCR temps réel a réduit le risque de résultats faussement positifs causés par une contamination croisée. En effet, cette méthode se réalise dans un tube fermé ce qui évite la manipulation des produits de PCR après leur amplification. La mesure de la fluorescence émise par la sonde oligonucléotidique marquée avec des fluorophores permet de suivre en temps réel l'accumulation de produit pendant la réaction d'amplification (Nogva *et al.*, 2000 ; Wittwer *et al.*, 2001).

Outre sa rapidité, cette technique de PCR en temps réel permet une quantification précise (les données sont enregistrées pendant la phase exponentielle) grâce à des gammes de quantités connues d'ADN et autorise la recherche de plusieurs cibles dans la même analyse (test multiplex).

Enfin, l'existence de formes viables mais non cultivables (viable but not culturable : VBNC) chez *Campylobacter* (Tholozan *et al.*, 1999) oriente préférentiellement vers l'utilisation des méthodes moléculaires, capables de les détecter. Ces formes VBNC représentent en effet un problème de santé publique potentiel puisque ces *Campylobacter* échappent à l'investigation microbiologique traditionnelle dans l'eau et les aliments alors qu'ils peuvent redevenir pathogènes et infecter le consommateur (Cappelier *et al.*, 1999a et 1999b).

Cette technique a été initialement développée pour la caractérisation des souches de *C. jejuni* (Wilson *et al.*, 2000) et de *C. coli* (Wittwer *et al.*, 2001) résistantes à certains antibiotiques ainsi que pour l'identification des *Campylobacter* à partir de matières fécales (Logan *et al.*, 2001) et d'aliments (Sails *et al.*, 2003a). Des travaux ont montré son utilité pour l'identification des souches bactériennes de *C. coli* et de *C. jejuni* après culture (Nogva *et al.*, 2000 ; Best *et al.*, 2003 ; Abu-Halaweh *et al.*, 2004) et à partir de matières fécales humaines (Lagier *et al.*, 2004) ou animales (Rudi *et al.*, 2004 ; Jensen *et al.*, 2005).

Les résultats de Lagier *et al.* (2004), de Jensen *et al.* (2005) sur les matières fécales ou de Sails *et al.* (2003a) dans les aliments mettent en évidence la sensibilité de cette méthode pour la détection de *Campylobacter* avec des seuils de détection de l'ordre de 10 copies de génome sur cultures bactériennes et au minimum de 200 copies de génome à partir de prélèvements cliniques. De plus, Lund *et al.*, en 2004, ont développé un test de PCR temps réel permettant de détecter directement le genre *Campylobacter* dans des matières fécales de poulets (le gène cible utilisé était l'*ARNr 16S*). Un contrôle interne bactérien (*Yersinia ruckeri*, *ARNr 16s*) est ajouté avant l'extraction d'ADN afin de contrôler la qualité de l'extraction de l'ADN et la présence d'inhibiteurs de la PCR dans l'échantillon.

Les substrats complexes tels que les matières fécales, les aliments ou les prélèvements environnementaux peuvent en effet contenir d'autres micro-organismes ainsi que des inhibiteurs de la PCR (tels que des polysaccharides complexes, des composés polyphénoliques...) (Koonjul *et al.*, 1999). Plusieurs études soulignent donc la nécessité d'ajouter un contrôle interne d'extraction et d'amplification avant l'extraction d'ADN dans chaque échantillon pour s'assurer de la qualité de cette extraction et de l'absence d'inhibition de l'amplification par PCR (Monteiro *et al.*, 1997 ; Rijpens *et al.*, 1999 ; Perelle *et al.*, 2004 ; Lund *et al.*, 2006).

Récemment, plusieurs études ont mis au point des PCR en temps réel quantitatives qui permettent de quantifier *Campylobacter spp.* ou *C. jejuni* dans le contenu faecal et caecal des poulets (Rudi *et al.*, 2004), dans le lait ou l'eau environnementale (Yang *et al.*, 2003) ou sur peau de poulet (Wolffs *et al.*, 2007). Jensen *et al.* (2005) ont travaillé sur des matières fécales de porc mais la technique mise au point ne permet pas de quantifier *Campylobacter* et la détection de *C. jejuni* est réalisée après une étape d'enrichissement.

L'objectif de notre étude est de développer des méthodes PCR quantitatives en temps réel, simplex ou multiplex, capables :

- de détecter et de quantifier les bactéries du genre *Campylobacter*,
- de différencier et de quantifier *C. jejuni* de *C. coli* avec un haut degré de sensibilité et de spécificité mais également de pouvoir mettre en évidence une autre espèce du genre *Campylobacter*,
- dans des prélèvements polycontaminés à savoir les matières fécales de porcs, les aliments et les prélèvements environnementaux

Ces techniques nous permettront de répondre à nos questions concernant la cinétique d'excrétion de *Campylobacter* en élevage porcin en décrivant les quantités et les espèces excrétées par les porcs. Néanmoins, la présence d'un témoin interne d'extraction et d'amplification, est essentielle car elle permettra de contrôler la qualité de l'extraction de l'ADN et la présence éventuelle d'inhibiteurs de la PCR dans l'échantillon.

La mise au point d'un ou plusieurs tests PCR temps réel, multiplex ou non, présente l'avantage d'offrir un aspect quantitatif et de réduire les risques de contaminations croisées. Ces méthodes seront alors validées sur des échantillons de matières fécales prélevés sur des porcs Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiques (EOPS) inoculés expérimentalement avec différentes souches connues de *Campylobacter* puis sur des animaux naturellement infectés provenant d'élevages conventionnels différents et à différents stades de croissance.

2. LA PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL

La PCR quantitative en temps réel est fondée sur la mesure d'émission de fluorescence proportionnelle à la quantité de gènes amplifiés. Plusieurs techniques existent : elles utilisent soit des molécules se liant non spécifiquement à l'ADN comme le SyBR Green®, soit des sondes moléculaires fluorescentes spécifiques de la cible amplifiée comme par exemple les sondes d'hydrolyse type TaqMan® (Annexe 2).

La molécule SyBR Green® est un agent intercalant émettant de la fluorescence quand il est lié à l'ADN. La spécificité de cette méthode est relativement faible contrairement à l'utilisation de sondes spécifiques qui s'hybrident comme les amorces sur les ADN cibles recherchés permettant d'augmenter la sensibilité et la spécificité de la PCR.

2.1. PRINCIPE DE LA TECHNOLOGIE TAQMAN

La fluorescence est obtenue par l'utilisation d'une sonde marquée et le but est de faire apparaître la fluorescence de manière proportionnelle à la quantité d'ADN cible présent.

Deux marqueurs sont nécessaires : un marqueur R (Reporter) émetteur de fluorescence et un marqueur Q (Quencher) qui absorbe cette fluorescence lorsque R et Q sont proches. Les sondes de type TaqMan, parmi les plus utilisées, s'hybrident comme les amorces, sur les ADN cibles (Figure 1).

Au cours de la réaction de polymérisation, la Taq Polymérase, du fait de son activité 5' exonucléasique, décompose la sonde et libère le fluorophore en solution. Q et R étant séparés, la fluorescence de R n'est plus absorbée. La mesure de la fluorescence est donc proportionnelle au nombre d'ADN produits par la PCR, lui-même proportionnel au nombre d'ADN cibles présents au départ.

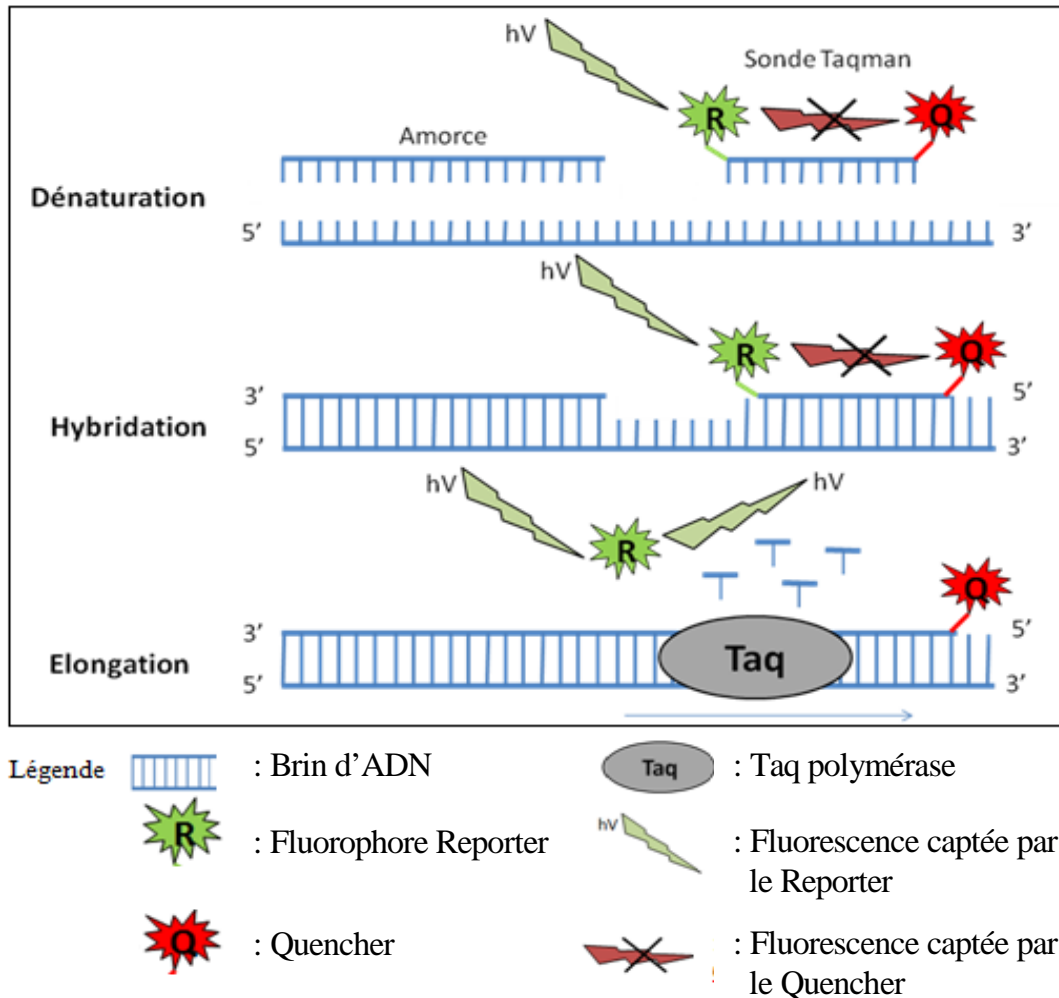


Figure 1. Principe de la technologie Taqman : Utilisation de sondes d'hydrolyse type Taqman®

La présence de la séquence cible dans l'échantillon (ADN bactérien par exemple) se traduit donc par l'apparition d'une fluorescence spécifique, qui suit une courbe caractéristique : on observe une phase exponentielle suivie d'une phase plateau (lorsqu'un élément nécessaire à la PCR devient limitant) (Figure 2).

La détection des amplicons, simultanée de l'amplification, est prise en compte pendant la phase exponentielle. La « baseline » ou « ligne de base » correspond au bruit de fond dans les premiers cycles (en général on la définit entre 3 et 15 cycles).

Cette fluorescence moyenne détectée dans les premiers cycles ne correspond pas à une augmentation de la fluorescence due à l'amplification des produits, elle est donc soustraite à la valeur obtenue pour les produits d'amplification.

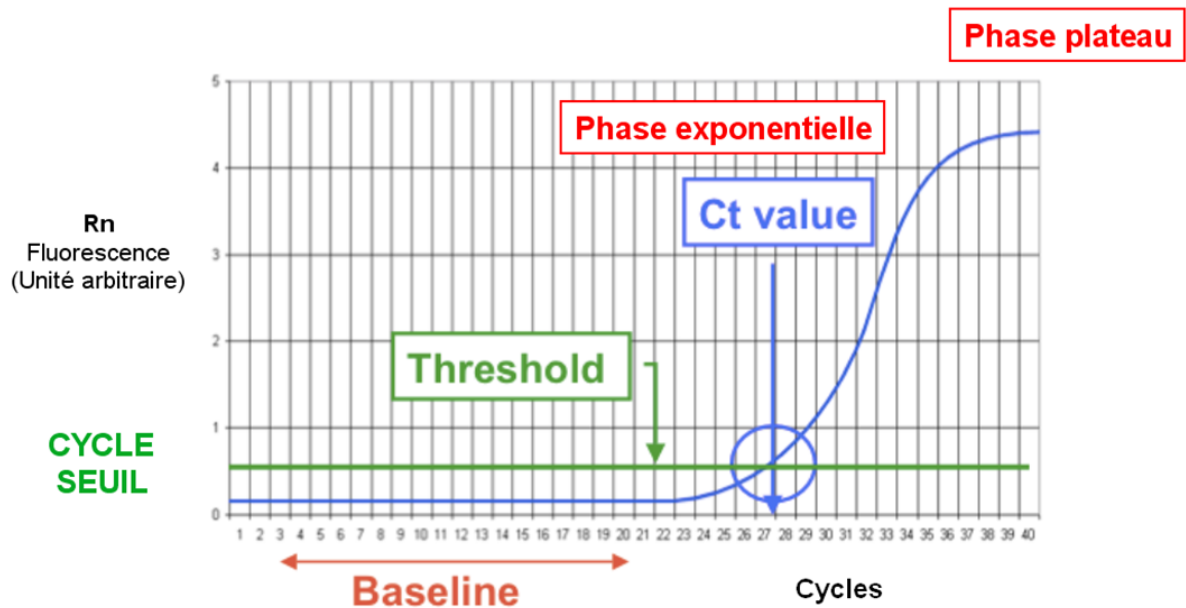


Figure 2 : Courbe de fluorescence – Définition des termes usuels

La mesure directe de l'émission de fluorescence supprime l'étape d'analyse post-PCR, en l'occurrence l'électrophorèse. La quantification exploite un nouveau paramètre : le cycle seuil ou Ct (Threshold Cycle) qui correspond au moment où le signal devient supérieur au bruit de fond (point d'intersection de la ligne de base (« baseline »), définie par l'utilisateur, avec la courbe de fluorescence) (Figure 2).

2.2. PRINCIPE DE LA QUANTIFICATION ABSOLUE

Pour chaque couple d'amorces, des dilutions sériées d'une préparation d'ADN cible de concentration connue sont réalisées afin de construire une gamme d'ADN standard (Figure 3).

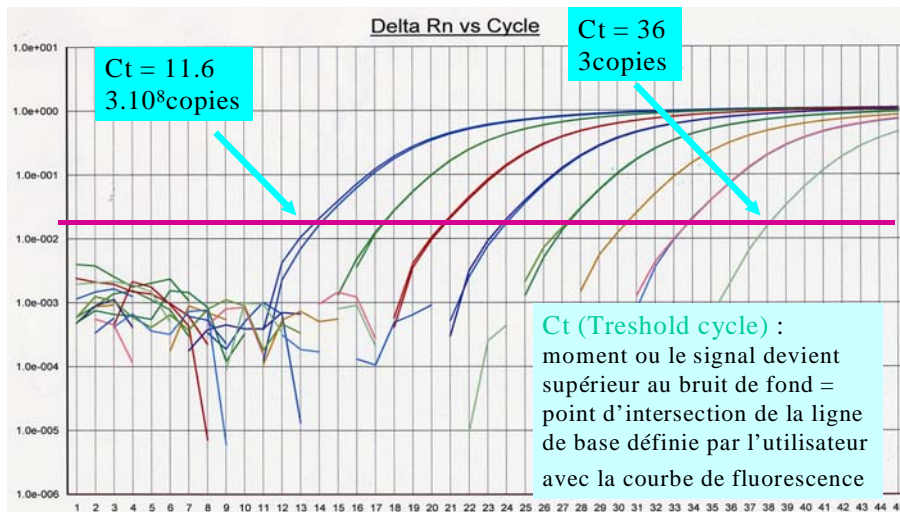


Figure 3 : Courbe d'amplification : variations de la fluorescence en fonction du nombre de cycles d'amplification pour la gamme étalon d'ADN chromosomique de la souche *C. coli CIP 7080*

La quantification de la séquence cible dans un échantillon se fait en effet à l'aide d'une courbe standard définie comme la droite représentant les Ct en fonction du logarithme de la quantité d'ADN (Figure 4). En déterminant une valeur de cycle seuil (Ct), cycle PCR à partir duquel une augmentation statistiquement significative du signal fluorescent est détectée, pour chaque échantillon d'une gamme complète de dilutions sériées de suspensions bactériennes, on obtient une relation entre le nombre de cycles et la concentration de l'échantillon.

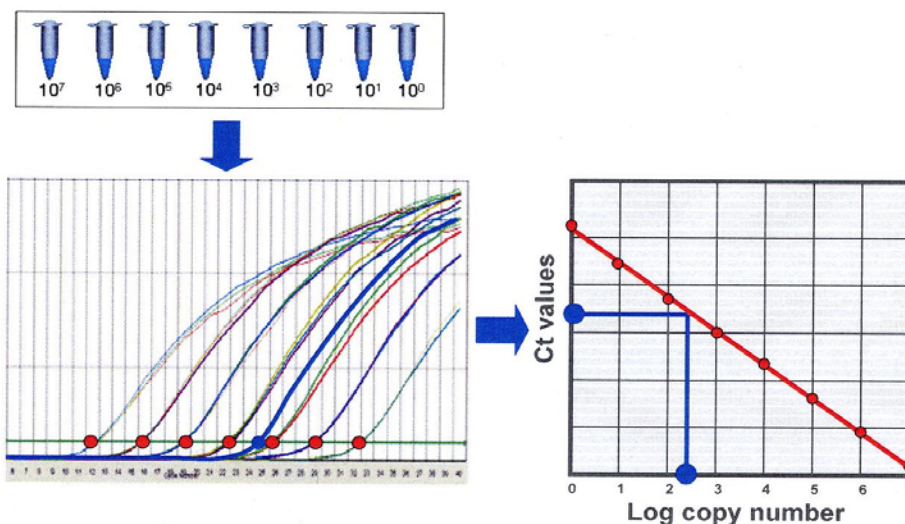
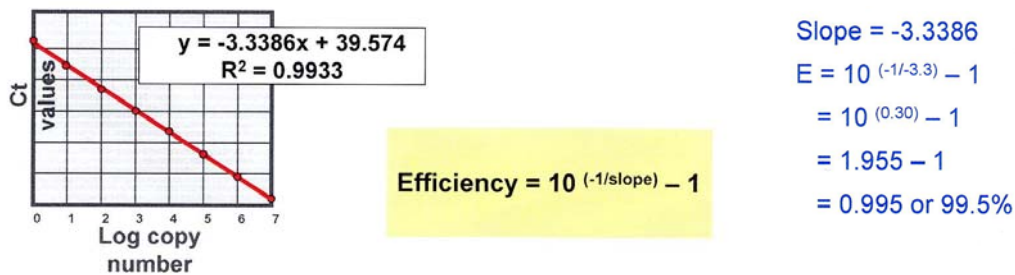


Figure 4 : Réalisation d'une gamme standard à partir de dilutions sériées d'ADN
Courbe d'amplification et droite standard associée
Source : Applied Biosystems, 2007

La connaissance de cette relation permet alors par l'observation de la courbe de fluorescence effectuée sur un prélèvement x de déduire la concentration en bactéries recherchées dans ce prélèvement (Figure 4).

La linéarité de l'essai est indiquée par l'analyse du coefficient de corrélation de la courbe standard ainsi obtenue (Figure 5). Un essai est dit linéaire quand le coefficient de corrélation est supérieur ou égal à 0.95.



➤ Si pente = -3,32
Efficacité de 100%

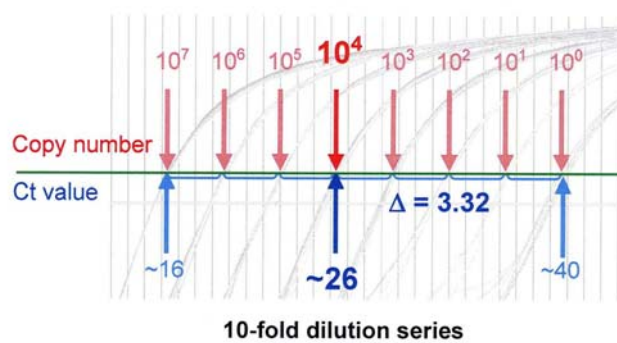


Figure 5 : Evaluation de l'efficacité de la PCR quantitative en temps réel : réalisation d'une gamme d'ADN sériée et calcul de la pente de la droite standard. Source : Applied Biosystems, 2007.

De plus, la pente de cette droite permet le calcul de l'efficacité E du couple d'amorces dans les conditions expérimentales appliquées selon la formule suivante :

$$E = 10^{(-1/\text{pente})} - 1$$

Le calcul de l'efficacité de la PCR et du coefficient de corrélation sont nécessaires pour évaluer la capacité de la PCR à détecter et amplifier la séquence cible choisie. L'objectif est d'avoir une efficacité la plus proche possible de 100%, ce qui correspond au doublement

du nombre de séquences amplifiées à chaque cycle. Néanmoins, la plupart des réactions d'amplification ont une efficacité légèrement inférieure dûe aux limitations expérimentales. Enfin, cette efficacité est importante à considérer lors de la mise au point de tests multiplex puisque les PCR de chaque cible doivent avoir des efficacités similaires.

L'utilisation de la PCR quantitative en temps réel permet donc la détection et la quantification de microorganismes tels que des virus, des bactéries, des champignons ou des parasites dans différents prélèvements.

2.3. CHOIX ET ETAPES POUR LA MISE AU POINT DES METHODES PCR

Une première étape consistait à choisir une méthode d'extraction simple, rapide et efficace permettant d'obtenir un ADN de qualité et en quantité suffisante. Cette méthode devait également être applicable à une matrice complexe, en l'occurrence les matières fécales de porcs ou les prélèvements environnementaux, matrices pour lesquelles la présence éventuelle d'ADN d'autres bactéries ou d'inhibiteurs entraînent des difficultés d'utilisation des techniques moléculaires pour la détection et l'identification directe des *Campylobacter* (Wilson *et al.*, 2000 ; Denis *et al.*, 2001).

Les publications récentes sur la mise en évidence des *Campylobacter* dans les matières fécales en utilisant une méthode de biologie moléculaire ont orienté notre choix vers les kits commerciaux d'extraction. Mc Orist *et al.*, en 2002, ont testé l'efficacité de cinq kits commercialisés chez différents fournisseurs et utilisés pour l'extraction d'ADN à partir de matières fécales. Le Nucleospin® Tissue mini-kit (Macherey Nagel) semblait le plus performant pour l'extraction à partir de souches pures alors que le Qiaamp® DNA stool mini-kit (Qiagen) s'est avéré être le plus efficace pour l'extraction d'ADN à partir de matières fécales. De plus, ce kit a été utilisé avec succès par Inglis et Kalischuk (2003) pour quantifier *Campylobacter spp.* par nested PCR dans des matières fécales de bovins et par Lagier et son équipe, en 2004, pour mettre au point une méthode de PCR en temps réel capable de détecter et de discriminer au sein d'une même réaction *C. jejuni* et *C. coli* dans des prélèvements cliniques.

Nous avons comparé le kit commercialisé par Macherey Nagel au Qiaamp® DNA blood mini-kit commercialisé par Qiagen pour l'extraction d'ADN à partir de colonies

bactériennes. Hormis les "comprimés inhibiteurs" (mélange de polysaccharides fixant les inhibiteurs), le Qiaamp® DNA stool mini-kit présente les mêmes constituants et les mêmes protocoles d'extraction que le Qiaamp® DNA blood mini-kit. Une comparaison a été réalisée avec ces deux kits seuls puis avec chacun des protocoles de ces deux kits associé à une pré-étape d'ébullition, étape permettant une élimination partielle des inhibiteurs de la PCR (Schunck *et al.*, 1995). Compte tenu de l'absence de différences significatives entre les deux kits pour la réalisation des extractions d'ADN chromosomique et pour l'extraction d'ADN à partir de matières fécales, seul le critère du coût de revient nous a conduit à privilégier l'utilisation du kit commercialisé par Macherey Nagel. Par ailleurs, des études comparatives ont permis de souligner l'intérêt d'un protocole modifié avec une pré-étape d'ébullition. Cette étape permet d'augmenter le volume de l'échantillon (250 mg de matières fécales selon le protocole d'instruction du kit d'extraction d'ADN *versus* 5 g de matières fécales avec la pré-étape d'ébullition) et par conséquent de favoriser l'homogénéisation de la matière de départ. De plus, les matières fécales de porcs ont une composition et une consistance variables en fonction de l'âge des animaux, du régime alimentaire et/ou d'éventuels problèmes de santé. Cette pré-étape d'ébullition permet alors de diminuer les conséquences de cette hétérogénéité puisque l'extraction d'ADN se fait à partir d'un surnageant, plus homogène. Outre sa contribution à l'élimination des inhibiteurs (Schunck *et al.*, 1995), cette pré-étape d'ébullition augmente ainsi le rendement, la qualité et la reproductibilité de l'extraction d'ADN notamment à partir de matières fécales.

Après une étape de recherche et de confrontation des données bibliographiques associée à l'utilisation du logiciel informatique BLAST, nous avons établi un choix en ce qui concerne les gènes cibles potentiels.

Afin de discriminer *C. jejuni* et *C. coli*, il est nécessaire de choisir des gènes spécifiques de chaque espèce bactérienne et si possible présents en une seule copie dans le génome. Le gène *hipO* (benzoylglycine amidohydrolase) constituait, d'après la littérature, un bon marqueur d'identification pour *C. jejuni* lors d'une détection par PCR (Englen *et al.*, 2003). En effet, ce gène, responsable de l'activité hippuricase utilisée habituellement dans la caractérisation phénotypique de *C. jejuni* par rapport aux autres *Campylobacter*, est présent uniquement chez *C. jejuni* et en une seule copie dans le génome (Nachamkin et Blaser, 2000 ; Allos, 2001 ; Englen *et al.*, 2003). De même, le gène *glyA*, codant pour la sérine hydroxyméthyltransférase chez tous les *Campylobacter*, présente une région unique de

nucléotides identifiées dans le cadre de lecture codante pour le gène *glyA* de *C. coli*. Toutes les séquences homologues connues de *glyA* ont été recherchées sur le site internet du National Center for Biotechnology Information (NCBI) en utilisant l'algorithme BLAST. Elles ont ensuite été alignées avec le logiciel PILEUP command of the UNIX-based GCG Wisconsin Software Package version 10 (Genetics Computer Group, Madison, WI, USA) afin de trouver cette région spécifique à *C. coli* (Lagier *et al.*, 2004).

A l'inverse, pour la détection du genre *Campylobacter*, il était important de choisir un gène conservé au sein de toutes les espèces de *Campylobacter*. Les résultats de Lund et son équipe (2004) ont été utilisés et les séquences des amorces et des sondes ont été choisies avec le logiciel CLUSTALW Multiple Alignment en considérant les séquences du gène *ARNr 16S* (région non variable, hautement conservée) de *Campylobacter spp.*, permettant de détecter *Campylobacter spp.* et d'établir un contrôle interne bactérien. Ces amorces PCR *Campylobacter* ont été dessinées pour repérer non seulement les quatre espèces thermotolérantes majeures (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* et *C. upsaliensis*) mais aussi d'autres espèces de *Campylobacter* telles que *C. hyointestinalis* ou *C. fetus* alors que les amorces PCR dessinées pour le contrôle interne en sont exclusivement spécifiques.

Les travaux concernant la mise au point de méthodes PCR pour la détection et la quantification de Campylobacter spp, C. coli et C. jejuni font l'objet d'un dossier de valorisation industrielle, actuellement en cours d'instruction.

De ce fait, certaines informations concernant la description de ces tests ont été supprimées des manuscrits présentés ci-après afin de préserver le secret industriel.

**3. ARTICLE 1 : PCR EN TEMPS REEL
QUANTIFICATION DE *CAMPYLOBACTER SPP.* AVEC UN TEMOIN
INTERNE D'EXTRACTION ET D'AMPLIFICATION**

**Real-time PCR assay to quantify *Campylobacter spp.* in pig faeces with the use of an
internal control of extraction and amplification**

Mily Leblanc Maridor^{a,*}, Amélie Garénaux^c, François Beaudeau^a, Michel Federighi^c, Henri
Seegers^a, Martine Denis^b, Catherine Belloc^a

^aINRA, Veterinary School, Research group on Bio-aggression, Epidemiology and Risk Analysis in Animal
Health, UMR 1300, BP 40706, 44307 Nantes Cedex 03, France

^bAFSSA, French Agency for Food Safety, Pig and Poultry Veterinary Research laboratory, Hygiene and Quality
of poultry and Swine Products Research Unit, BP53, 22440 Ploufragan, France

^cINRA, Veterinary School, Unit of Food Safety, UMR 1014 SECALIM ENVN/ENITIAA, BP 40706, 44307
Nantes Cedex 03, France

Manuscrit en preparation

En vue d'une valorisation et/ou d'une soumission à Molecular Cellular and Probes

1. Introduction

Campylobacter is considered as one of the main causes of bacterial gastroenteritis in humans in all industrialized countries [1-4]. The high incidence of clinical disease associated with this organism, its low infective dose in humans [5], its potentially serious complications like the Guillain Barré syndrome [6] and the recent increasing number of antimicrobial-resistant *Campylobacter* strains [7] confirms its importance as a significant public health hazard [8]. The main *Campylobacter* species involved in campylobacteriosis is *C. jejuni* as it is responsible for 80 to 85% of all enteric *Campylobacter* infections. *C. coli* and *C. fetus* are less frequently implicated (10 to 15% and 5 to 10% respectively) and other *Campylobacter* species such as *C. lari* [9] and *C. upsaliensis* [10] are more seldomly found.

Campylobacter commonly lives in the intestinal tract of a wide range of birds and mammals, including food production animals and pets, without causing clinical signs. Risk analysis shows consumption of food products of animal origin to be frequently associated with reported cases of illness [11-14]. The dominance of *C. jejuni* is found in most healthy carrier animals, for example broiler chickens, cattle, wild-living birds and mammals [15-21]. In contrast, most studies on conventional pigs show a dominance of *C. coli* [22] often with colonization of several *Campylobacter* types in the same pig [23], although an American study found a high prevalence of *C. jejuni* [24].

The ability to rapidly and accurately quantify bacteria in complex substrates like faeces or environmental samples will greatly facilitate research work by documenting the kinetics of *Campylobacter* excretion by pigs and the routes of *Campylobacter* contamination in a pig herd.

As food safety has become an increasing concern for consumers, there is a growing need for fast and sensitive methods for specific detection and identification of zoonotic microorganisms. *Campylobacter* is very fastidious to culture: conventional methods for its detection and confirmation in food or in stool require 4-5 days and involve selective enrichment followed by isolation from selective agar and confirmation by biochemical and serological tests [25, 26]. Although these methods are standardized and efficient, molecular genotype-based methods represent an alternative to the identification of *Campylobacter*. One of the most promising methods is real-time PCR, which is more convenient than conventional PCR for rapid and reliable detection and quantification of pathogen-specific sequences [27-29]. By direct monitoring of the increasing amount of PCR products throughout the enzymatic assay, the real-time PCR technique allows a precise quantification of the target DNA copy number, when using standards [30].

Nevertheless, the presence of inhibitors in complex biological samples like faeces, food or environmental swabs, is an obstacle limiting the usefulness of PCR for detecting microorganisms in faeces. Sample preparation procedures by (i) an efficient extraction of DNA, (ii) an efficient elimination of inhibitors and (iii) the presence of an internal control of extraction and amplification can also contribute to the reliability of target detection within clinical samples [31]. Various internal controls for PCR have been described [32-34]. Recently, Lund *et al.* [35] have introduced as internal control for PCR the bacterium *Yersinia ruckeri* originated from salmonid fish species [36].

The aim of the present study was to develop a rapid, reproducible, specific and sensitive real-time PCR assay capable of detecting and quantifying *Campylobacter spp.* directly in complex substrates like pig faeces. The use of an internal control of extraction and amplification

contribute to the reliability of the *Campylobacter* detection and quantification within faecal and environmental samples. Specific objectives were to (i) develop primers and probes for detection and amplification of *Campylobacter* DNA and the internal control from faeces, (ii) measure the sensitivity and the specificity of PCR-based detection in faecal and environmental samples, and (iii) compare PCR with conventional microaerobic culture for detecting and quantifying *Campylobacter* in faeces of experimentally infected pigs and naturally contaminated pigs.

2. Material and Methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

A total of 27 different *Campylobacter* spp. and related *Helicobacter*, *Wolinella* and *Arcobacter* reference strains was used for testing the specificity of primers and probes for real-time PCR in identification of the genus *Campylobacter* (Table 1). In addition, 50 *C. jejuni* and 75 *C. coli* isolates (from human, poultry or pig origin) were included. They were selected from our inhouse collection, from the collection of the French Agency for Food Safety (AFSSA, Ploufragan), and from the collection of the French National Reference Center for *Campylobacter* and *Helicobacter* (CNR-CH, Bordeaux) (Table 1). Isolates were characterized by conventional PCR and electrophoresis as described by Denis *et al.* [37]. Strains were stored at -80°C in brain heart infusion broth (Difco, Detroit, Michigan) containing 20% (v/v) glycerol.

Campylobacter strains were grown at 25, 37 or 41.5°C for 48h in a microaerobic atmosphere (7% O_2 , 10% CO_2 , 83% N_2) on Karmali agar plates (AES laboratory, Rennes, France). All strains close to the genus *Campylobacter* and belonging to the class Epsilonbacteria [38], namely *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Wolinella* were cultured under appropriate

microaerobic and anaerobic conditions. Moreover, other enteric bacteria (clinical isolates or reference strains) from patients or from pigs (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*) were also tested (Table 1). Each was cultured with appropriate culture conditions.

2.2. Sample collection

The method was assessed with two types of faecal samples, either obtained from experimentally inoculated pigs and the sham-inoculated ones ($n = 93$) [39] or from pigs from conventional herds ($n = 282$). Moreover, 156 swabs were collected from the environment of naturally infected pigs. Among the rectal faecal samples from naturally contaminated pigs, three types can be defined: rectal faecal samples collected individually from sows, rectal faecal samples collected individually from pigs aged 3 to 16 weeks and rectal swabs samples collected from piglets aged 1 to 3 weeks. All samples were examined within 4 hours after collection, for *Campylobacter spp.* quantification by culture and by real-time PCR. Moreover, 15 *Campylobacter* negative specimens were obtained from Specific-Pathogen-Free (SPF) sows and piglets from the high-security barn at the AFSSA located in Ploufragan (France).

2.3. Enumeration of *Campylobacter spp.* by bacterial culture methods

Thermophilic *Campylobacter spp.*, obtained from faecal or environmental samples, were cultured at 41,5°C in microaerobic conditions. 90 mL of Preston broth (Oxoid, Dardilly, France) with a Preston antibiotic supplement (AES laboratory, Rennes, France) were added to ten gram of fresh faeces or to the environmental swabs. For *Campylobacter* enumeration, 100µL of a ten-fold dilution serie (10^{-1} to 10^{-5}) were plated both on Karmali agar (AES

laboratory, Rennes, France) and on Butzler agar (Oxoid, Dardilly, France) and incubated for 72 hours. To ensure the detection of *Campylobacter* in samples harbouring less than 100 CFU (Colony Forming Unit)/g of faeces, a second plating was carried out 24 hours after broth enrichment and incubated 48 hours. Then, for direct streaking or selective enrichment, presence of *Campylobacter* colonies was checked and the number of CFU/g of faeces was calculated. *Campylobacter spp.* were identified by observation of *Campylobacter*-like growth on Karmali or Butzler plates followed by microscopy and conventional PCR of colonies [37].

2.4. Isolation of DNA from bacterial cultures and collected samples

Genomic DNA of all bacteria from the bacterial culture was extracted using the Nucleospin® Tissue mini-kit (Macherey Nagel, Hoerdt, France) according to the manufacturer's instructions. The concentration of isolated DNA was determined by measuring the optical density at 260nm and the purity was assessed by examination of 260/280 nm optical density ratios. All DNA samples classified as pure, as defined by having a 260/280 nm optical density ratio between 1,8 and 2, were adjusted to 10ng μL^{-1} in TE buffer, stored at -20°C until required for analysis.

For the faecal samples, a total of 5g of faeces were diluted in 5mL of sterile water and homogenized. For the environmental samples, 10mL of sterile water was added to the swabs, which were stomached. Then, all the samples followed the same protocol of DNA extraction. First, they were boiled for 10 min, chilled on ice and centrifuged at 8000 x rpm for 5 min. This method was demonstrated to remove inhibitors of the Taq polymerase [40]. Then, 250 μL of supernatant was extracted for each sample using the Nucleospin® Tissue mini-kit (Macherey Nagel, Hoerdt, France) according to the manufacturer's instructions. Finally, the DNA preparations, eluted in 100 μL of elution buffer, were stored at 4°C prior to use and the

rest of the supernatant was stored at -20°C .

2.5. Internal Control for DNA isolation and PCR amplification

In order to ensure the complete removal of the PCR inhibitors after the easy and fast method of DNA preparation, an internal control (IC) was added to each sample.

2.6. PCR primers and probes

To optimize the PCR reaction, two Minor Groove Binder (MGB) probes and a different forward primer for the internal control were designed with Primer express version 2.0 (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) according to the recommendations of the manufacturer. Finally, the homologies of the selected primers and probes with unrelated sequences were checked by a search with the BLAST program of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

The Taqman probes, labeled with a fluorescent reporter at the 5' end and conjugated to a Minor Groove Binder (MGB) at the 3' end, and the primers were synthesized by Applied Biosystems. The MGB probes have been shown to improve specificity and sensitivity of real-time quantitative PCR [41].

2.7. Standard DNA preparation

Total genomic DNA of *C. coli* CIP 70.81, *C. jejuni* NCTC 11168 and from the bacterial internal control were extracted. A 108 bp fragment of the *Campylobacter 16S* rRNA gene and a 187 bp fragment of the internal control gene were amplified by PCR with primers **CampF/CampR** and **icF/icR** respectively. Amplified PCR products were cloned into a pGEM®-T Easy Vector System (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) according to the manufacturer's instruction. Plasmids were amplified in *Escherichia coli* JM 109 (Invitrogen,

Cergy Pontoise, France) and plasmid DNA were purified from transformed cells using Plasmix minipreps Talent (Euromedex, Mundolsheim, France). A 10-fold dilutions of the plasmid, representing 10 to 10^9 copies of DNA/ $5 \mu\text{L}$ of template (PCR) were realized. Aliquots of each dilution were stored at 4°C when use the same day or stocked at -20°C for further use.

2.8. Quantitative real-time PCR amplification

The real time-PCR was performed in an ABI PRISM® 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems) and the data were analyzed with the appropriate sequence detector software (SDS software, Applied Biosystems). The $20\mu\text{L}$ PCR mixture for one reaction contained $10\mu\text{L}$ of 1X Taqman Universal PCR Mastermix (containing AmpliTaq Gold™ DNA polymerase, dNTPs, Passive reference 1 (ROX) and optimised buffer components including 5mM MgCl_2), 500nM of **CampR** and **CampF** primers, 200nM of **icF/icR** primers 200nM of each probe and $5\mu\text{L}$ of template DNA. The thermal cycle protocol used was the following: activation of the Taq DNA polymerase at 95°C for 10 min and 45 cycles of 15s at 95°C and 60s at 60°C . All reactions were carried out alongside a non template control containing all reagents except DNA run in triplicate and positive controls containing DNA from reference strains *C. jejuni*, *C. coli* and internal control. All samples were run in duplicate.

Fluorescence of **VIC** and **NED** was measured at their respective wavelengths during the annealing/elongation step of each cycle. After acquisition data, the baseline cycles for the **VIC** signal were set from cycle 2 to three cycles below the cycle at which the first signal appeared and for the **NED** signal (Internal Control), the baseline cycles were set from 3 to 19. The threshold cycle (Ct) is the PCR cycle at which a statistically significant increase in fluorescent signal is first detected. The Ct was defined as 10 times the standard deviation of

the mean baseline fluorescence emission calculated for PCR cycles 3-17 for *Campylobacter spp.* and 3-19 for internal control. Samples in which both duplicates had a Ct value below 39 were regarded as positive.

2.9. Evaluation of analytical performance of the real-time PCR assays

The analytical specificity of each real-time PCR assay was assessed with purified genomic DNA preparations of different bacterial strains (see above Table 1) and with DNA isolated from 15 *Campylobacter* negative pig faecal samples.

The analytical sensitivity of the PCR assay was determined using the standard curves prepared with purified plasmid DNA (See section 2.7) and purified genomic DNA of cultures from *C. jejuni* NCTC 11168, *C. coli* CIP 70.81 and internal control ranging from 10^8 to 10 CFU/mL of bacterial suspension.

Moreover, in order to mimic realistic conditions and to evaluate the analytical sensitivity of the assay, a standard curve was prepared to quantify *Campylobacter* in faecal samples from naturally or experimentally infected pigs. *C. jejuni*, *C. coli* or internal control were grown overnight using routine bacteriological procedures. Then, *Campylobacter*-negative faecal samples were spiked respectively with serial 10-fold dilutions of viable suspensions of each bacteria, ranging from 10^8 to 10 CFU per gram of faeces. In parallel, identical volumes were seeded into faecal samples and were plated onto blood agar to control inoculates by standard colony counts. Then, DNA was extracted from inoculated faecal samples to create a standard curve. The standard curves were created automatically by the ABI PRISM® 7300 Sequence Detection System Software (Applied Biosystems), by plotting the Ct values against each standard dilution of known concentration. They have been used in every experiment.

The repeatability of the assay was tested from samples containing several amounts of *Campylobacter*, spanning the whole range covered by real-time PCR, with the DNA amounts obtained for the same samples in different assays (10 consecutive runs) and within an assay (10 times in the same assay), in order to calculate the inter-assay and intra-assay coefficient of variation (CV) for the Ct values experimentally determined, as previously described [42], as well as for the estimated copy number extrapolated from standard curve (CVn). The intra-assay and inter-assay variability was assessed for the standard curves generated with the plasmid *Campylobacter* DNA and with the DNA extracted from the *Campylobacter*-negative spiked faecal samples.

2.10. Inhibition

A fixed amount of the internal control bacterium was added to each sample prior DNA extraction, in order to obtain a concentration of 5×10^5 CFU (allowing a mean Ct value in the real-time PCR assay of 22 with a standard deviation (S.D.) of 1.6, as calculated by 60 separate runs). Samples in which the Ct value for the IC was >25.2 (average plus 2 S.D.) were excluded from analysis.

To investigate possible competition between *Campylobacter* DNA and internal control DNA amplifications, serial 10-fold dilutions of *Campylobacter* DNA (10 to 10^9 DNA copies) were spiked with different added amounts of internal control DNA (10^5 to 10^7 DNA copies).

2.11. Statistical analysis

PCR amplification efficiency (E) was estimated by using the slope of the standard curve and the formula $E=10^{(-1/\text{slope})}-1$. Data analysis was performed using the SDS software (Applied Biosystems).

A total of 531 samples was evaluated in parallel using a molecular real-time PCR assay and a microbiological method. All data analyses were performed with Microsoft excel and SAS Systems version 8 (SAS, Cary, N.C.). The specificity and the sensitivity were assessed using the bacterial culture as a gold standard. For measuring the agreement between the microaerophilic cultivation and real-time PCR, kappa-statistic was used.

For the description of the agreement of the quantitative results of both methods the intra-class correlation coefficient was calculated. To assess the quality of agreement, we used guidelines suggested by Fleiss [43]. We considered that the higher agreement limit equal to 0.40, of acceptable variability, was appropriate. An agreement of less than 0.40 was considered poor, between 0.41 and 0.59 fair, between 0.60 and 0.74 good, and of 0.75 or more excellent.

3. Results

3.1. Internal control performance

The set of primers **icF/icR** and the probe **icP** were validated for their specificity and failed to amplify other bacteria (Table 1). Linearity was obtained using a 10-fold serial dilution of standard DNA control from 10^9 to 10^1 genome copies.

Serial dilution of the internal control demonstrated that 100 μ L of the 10^7 CFU/ml dilution contained adequate template to produce a reliable signal in real-time PCR. The fixed amount of the internal control bacterium added to each sample prior DNA extraction, in order to obtain a concentration of 5×10^5 CFU, was chosen (i) to be easily detectable and (ii) to not interfere or modify the results of *Campylobacter* quantification.

In all the experiments to investigate possible competition between *Campylobacter* and internal control DNA amplifications, no significant interference between the amplifications occurred (data not shown). 96% of the examined samples (faecal and environmental samples) were positive for the Internal Control, giving Ct values below the threshold value of 25.2. Therefore, PCR inhibition occurred in only 4% of the examined samples during the real-time PCR assay, enabling a reliable quantification of the number of *Campylobacter* per gram of faeces for 96% of the analyzed samples.

3.2. Specificity of PCR primers and TaqMan probe

The specificity of the primers-probe set for the detection of *Campylobacter spp* was optimized and tested against (i) different species or strains of *Campylobacter*, all of which were found to be positive, (ii) several bacteria, genetically related or not, which could be present in faecal samples or responsible for diarrhoea in pigs and humans, all of which were found to be negative (Table 1). In addition, negative results were obtained for the 15 *Campylobacter*-negative faecal samples obtained from SPF pigs.

3.3. Analytical sensitivity and linear range of the *Campylobacter* real-time assay

To determine the linear range of the real-time PCR assay, standard curves of the template DNA, in units of genome copy number, were generated (See section 2.7) and the use of *Campylobacter* plasmid as standard was validated (Fig. 1). The standard curve spanned eight orders of magnitude and showed linearity over the entire quantitation range (slope = -3,34), providing an accurate measurement over a large variety of starting target amounts (R^2 values was equal to 0.99) (Fig. 1). The detection limit of the real-time PCR was 10 genome copies/PCR reaction and its efficiency was 99%.

Forty-five PCR cycles of 10-fold serial (from 10^8 to 10^9) dilutions of the *Campylobacter* plasmid allowed us to obtain a standard curve with a dynamic range of eight orders of magnitude and a strong linear correlation (R^2 values were all equal or above to 0.99, 10 PCR experiments) between the Ct and the log₁₀ of the starting plasmid copy number. The mean standard curve obtained from 10 independent PCR experiments was representative of the PCR efficiency (99%) of the assay.

3.3. Precision of the *Campylobacter* real-time assay

First, the coefficient of variation both for the Ct values experimentally determined (CV) and for the estimated copy number extrapolated from standard curve (CV_n) were calculated with the plasmid *Campylobacter* DNA as previously described [42]. The CV and the CV_n between and within runs for samples containing *Campylobacter* DNA amounts spanning the whole range expected are reported in Table 2. To assess the intra-assay variation, plasmid copy number from 10^8 to 10 were measured 10 times each within one PCR run. The standard curve was $y = -3,34x + 41.57$ with $R^2 = 0.99$. The inter-assay variation was evaluated with different dilutions of plasmid DNA in 10 independent PCR experiments on different days. For each PCR run, each dilution point was tested in duplicate and the standard curve mean ($y = -3,32x + 40.48$) was used for quantity estimation. The standard deviations of low (10 copies), middle (10^4 copies), and high (10^8 copies) copy number *Campylobacter* plasmid were respectively 0.22, 0.16 and 0.87.

3.4. Validation of the real time PCR assays for analysis of field samples

The specificity of the real-time PCR for pig faecal samples was characterized using a stool-screening strategy, as described by Lagier *et al.* [44]. The DNA extracted from the 15 negative specimens produced Ct values > 39, so considered as negative.

Moreover, several different spiking series with 10-fold dilutions of *Campylobacter* suspensions were performed using negative faecal samples. The detection limit for the quantitative PCR assay in spiked faecal samples was 200 CFU of *Campylobacter*/g of faeces, so similar to the bacteriological method. Although this assay was able to detect lower quantity between 50 and 200 CFU/g of faeces, the regression curve was only linear from $2 \cdot 10^7$ to $2 \cdot 10^2$ CFU with reaction volumes of 20 μ L.

Secondly, to assess the intra-assay variation in “realistic” conditions, DNA extracted from the *Campylobacter*-negative spiked faecal samples from $2 \cdot 10^7$ to $2 \cdot 10^2$ CFU of *Campylobacter*/g of faeces were measured 10 times each within one PCR run (Table 2). The standard curve was $y = -3,41x + 47.32$ with $R^2 = 0.99$. The inter-assay variation was evaluated with different dilutions of DNA extracted from the *Campylobacter*-negative spiked faecal samples in 10 independent PCR experiments on different days. For each PCR run, each dilution point was tested in duplicate and the standard curve mean ($y = -3,40x + 48.12$) was used for quantity estimation. For the DNA extracted from the *Campylobacter*-negative spiked faecal samples, the standard deviations of low (200 CFU/g of faeces)-, middle ($2 \cdot 10^4$ CFU/g of faeces)-, and high ($2 \cdot 10^7$ CFU/g of faeces) Colony Forming Units of *Campylobacter* per gram of faeces were respectively 0.36, 0.47 and 0.74.

The numbers of positive and negative samples determined by both detection methods for each assay are summarized in Table 3 for experimentally and naturally infected pigs (Table 3a and Table 3b, respectively). There was an excellent correlation between all positive and negative results by both techniques. Indeed, only two culture-negative samples were positive by real-time PCR leading to a specificity of 95% and two culture-positive samples were negative by

real-time PCR (Sensitivity of 96%) for the *Campylobacter* experimentally infected pigs. For the *Campylobacter* naturally infected pigs, three culture-positive samples were negative by real-time PCR leading to a sensitivity of 98% and four culture-negative samples were positive by real-time PCR leading to a specificity of 98%. When the environment samples are added, the sensitivity, the specificity and the kappa value decreased from 98% to 97%, from 98% to 89%, and from 0.96 to 0.87, respectively.

The amount of *Campylobacter* CFU in each faecal sample determined by the real-time PCR was calculated and compared to the results obtained by quantitative bacteriological method. Fig. 2 shows the relationship between quantitative results determined by bacteriological method and real-time PCR for the two kind of faecal samples. Data for *Campylobacter*-positive samples versus *Campylobacter*-negative samples by both methods ($n = 50$ and $n = 39$ for experimentally infected pigs respectively; $n = 198$ and $n = 11$ for naturally infected pigs respectively) fall close to the line equivalence. There was almost a good correlation at the qualitative level between PCR and culture for experimentally ($R^2 = 0.92$) and naturally infected pig samples ($R^2 = 0.79$).

The two samples that were culture positive (after an enrichment step, <100 CFU/g of faeces) and PCR negative and the two samples that were culture negative and PCR positive (100 CFU/g of faeces) are relatively close to zero and around the detection limit of both methods. Similarly, three samples were culture positive and PCR negative: two of them were cultured after an enrichment step and consequently relatively close to zero whereas the other showed a quantity of $10^{7.65}$ CFU/g of faeces with the culture. Among the PCR-culture positive samples for the experimentally infected pigs, 86% of the samples had a difference in cell number of less than 1 log (36% of the samples had a difference in cell number of less than 0.5 log, 50%

less than 1 log), 11% less than 1.5 logs and 3% less than 2 logs. The results obtained by real-time PCR matched the results obtained by culture of the subjects infected with *Campylobacter*, experimentally or naturally, with an excellent coefficient of intra-class correlation for inter-rater reliability of 0.96 and 0.80 respectively.

4. Discussion and Conclusions

The developed real-time PCR assay with an internal control of extraction and amplification correctly identified and quantified *Campylobacter* sp. in pig faecal samples, providing a good and easy alternative comparatively to the bacteriological methods to enhance our understanding of the epidemiology of *Campylobacter*. Molecular techniques constitute an important advance in the rapid diagnosis of gastrointestinal infections when the organisms are fastidious to culture.

Among the numerous molecular techniques, real-time PCR was chosen because this is an important quantitative and reliable tool to determine bacterial concentrations in complex samples, such as faecal samples. Moreover, the real-time closed-tube PCR methods remove the need to manipulate PCR products after amplification, thereby reducing the risk of false positive results by cross-contamination between amplicons and subsequent test samples. So, real-time PCR based techniques, such as 5'Taq nuclease assays, have been applied to the diagnosis of a wide range of pathogens from various sources, including *Campylobacter* from human stools [44, 45], from food products [46, 47] poultry, milk and water [28], and from faecal samples [35, 44, 48-51].

To our knowledge, the real-time PCR assay described in our study is the first which describe the quantification of *Campylobacter* directly in pig faecal samples. In 2005, Jensen *et al.* [51]

have developed a real-time PCR method allowing species-specific identification of *Campylobacter spp.* in naturally infected pig faecal samples but after an enrichment. Nevertheless, there is a prerequisite to use real-time PCR for quantitative measurements and to ensure a correct quantification, namely to have information on both linear range and amplification efficiency of the real-time PCR assay.

Absolute quantification of *Campylobacter* copy number requires a standard curve generated with known *Campylobacter* plasmid molecules. The established *Campylobacter* real-time PCR assay was highly linear over a range of eight orders of magnitude, from 10^1 to 10^8 genome copies of *Campylobacter* with a mean amplification efficiency of 99%.

The PCR assay described here was shown to be highly specific, since no PCR amplicons were detected when the method was applied to DNA from a set of bacterial reference and field strains, including *Campylobacter* phylogenetically related bacteria and some enterobacteria, which are common gastrointestinal bacterial flora or cause diarrhoeal diseases and other food-borne pathogens. Moreover, the specificity of the assay was further assessed (i) by the amplification of DNA from different *Campylobacter* species and (ii) by the absence of amplification from DNA isolated from 15 pig faecal samples previously determined to be *Campylobacter*-free by culture. Finally both intra-assay and inter-assay CVs were satisfactorily low and confirmed the reliability and correctness of the technical setup over time and over the complete range of quantification (Table 2).

The technique was developed to quantify *Campylobacter* directly in faecal samples. Several factors, including presence of inhibitory substances and quality of the extracted DNA could affect the sensitivity of real-time PCR. So, the detection limit of any PCR and real-time PCR

should always be assessed in association with the detection probability to illustrate the reliability of the assay [52]. Since no quantitative method has been previously established for measuring *Campylobacter* DNA amounts in the faeces of pigs and no *Campylobacter* reference standard exists, *Campylobacter*-negative faecal samples spiked with 10-fold dilutions of the *Campylobacter* suspensions, ranging from 2×10^1 to 2×10^8 CFU/g of faeces, were tested to evaluate the analytical sensitivity of the real-time PCR in realistic conditions.

The established *Campylobacter* real-time PCR assay showed a 7-log-wide linear dynamic range of quantification ($R^2=0.99$) with a detection limit of 2×10^2 CFU of *Campylobacter* per gram of faeces. This limit of detection is comparable to that of other studies using molecular methods on faecal samples: while Lund *et al.* [35] reported a sensitivity of 250-500 CFU of *Campylobacter*/g of chicken faeces and Inglis and Kalischuk [53] of 3×10^3 CFU of *C. jejuni* /g in bovine faeces. In human faeces, Lawson *et al.* [54] obtained a sensitivity of 10^5 CFU of *Campylobacter*/g and Lagier *et al.* [44] of 10^3 CFU of *C. coli* or *C. jejuni*/g. Like these previously developed molecular assays, our observed detection limit is suitable to describe *Campylobacter* excretion given the average bacterial quantity found in pig, chicken, bovine or human *Campylobacter*-infected faeces (from 10^4 to 10^8 CFU of *Campylobacter*/g of faeces) [23, 26, 48, 50, 55, 56].

In this study, we compared the results of a quantitative microaerobic culture method for detection and quantification in faecal samples with a real-time PCR assay specific to *Campylobacter* spp. including an internal control of extraction and amplification and performed with the TaqMan 7300 system. Thus, to assess the usefulness of this real-time PCR assay, we have used, like Lagier *et al.* [44] a stool-seeding approach and the sensitivity was similar for both culture assay and PCR, with the spiked faeces used for the construction of the standard curve.

For the first step of our study, we found a high correlation at the qualitative level between the positive and negative results obtained by real-time PCR and culture for all samples both with faecal samples of pigs experimentally infected with *Campylobacter* and with faecal samples of pigs naturally contaminated. Interestingly, in six samples culture no *Campylobacter* cells was detected, even after an enrichment step, while the real-time PCR quantified them at $10^{3.4}$, $10^{4.3}$, $10^{7.7}$, $10^{7.65}$ CFU/g of faeces and detected the two faecal samples of experimentally infected pigs at about 10^2 CFU/g of faeces, limit of quantification of the PCR. Among the four faecal samples of naturally contaminated pigs, three were swabs samples taken from young piglets. First, this difference may be attributable to the presence of viable but not culturable (VBNC) or dead *Campylobacter spp.* since PCR methods detect the presence of DNA [57, 58]. Detection of the VBNC is an advantage, for example in food or water testing, because non culturable forms present a potential risk to humans [59, 60]. Secondly, for the samples of the experimental infection, one was taken from a pig experimentally infected with *C. jejuni*, and now the enrichment of *C. jejuni* in pig faecal samples can be difficult due to overgrowth by the more numerous *C. coli* and a high background flora [51, 61]. Thirdly, due to differences in susceptibility to antibiotics present in selective agar, the sensitivity of culture may vary depending on the *Campylobacter spp.* [62].

Two samples from two pigs experimentally infected with *Campylobacter jejuni* strain [39] were negative by real-time PCR and positive by culture: few colonies were observed after enrichment for the first one and 10^5 CFU/g of faeces for the second one. The same result was found for three samples from the pigs naturally infected. Among them, two swabs taken from young piglets were positive after an enrichment step and one faecal sample by direct inoculation with $10^{7.65}$ CFU/g of faeces. Different hypothesis can explain this discrepant

result. Most commercially media can lead to identify other bacteria, relatively closed to the genus *Campylobacter*, as *Campylobacter* [48, 54].

In fact, one of the major challenge in optimizing an assay for detection of *Campylobacter* in faecal samples is overcoming the PCR-inhibitory components found in faeces. Moreover, successful quantification depends crucially on the quality of the sample DNA analyzed. To determine whether PCR inhibitors have been removed, an internal control was added to each faecal samples before the extraction as described by a number of researchers, who have designed internal primers and added them to faeces or foods prior to DNA extraction [32-35]. Therefore, with this internal control, inhibitors of real-time PCR can effectively be identified in samples which could be responsible for false negative results. In fact, in 96% of examined samples, we observed amplification of the internal control and of *Campylobacter* extracted DNA from pig faeces.

Faeces constitute complex biological samples no only because of the presence of numerous types of bacteria but also because of the different kinds of inhibitors like complex polysaccharides or polyphenolic compounds of plant origin [32, 63] or food degradation products. Moreover, in the current study, we have sampled faeces of sows, piglets (swabs), weaners and finishers, so considerable variation in consistency (e.g., water content and presence of mucus) and composition (e.g., fiber versus grain) of the pig faecal samples were observed and these variables may also have an impact on the efficacy of DNA extraction and inhibitor removal. A sample preparation procedure which included a large volume of faeces (5g [fresh weight]) compared to the commonly used amount of faeces recommended by the manufacturer (200 mg), an ebullition step known to remove inhibitors of the Taq polymerase [40] followed by the Nucleospin® tissue method allow a better homogenisation of the faeces

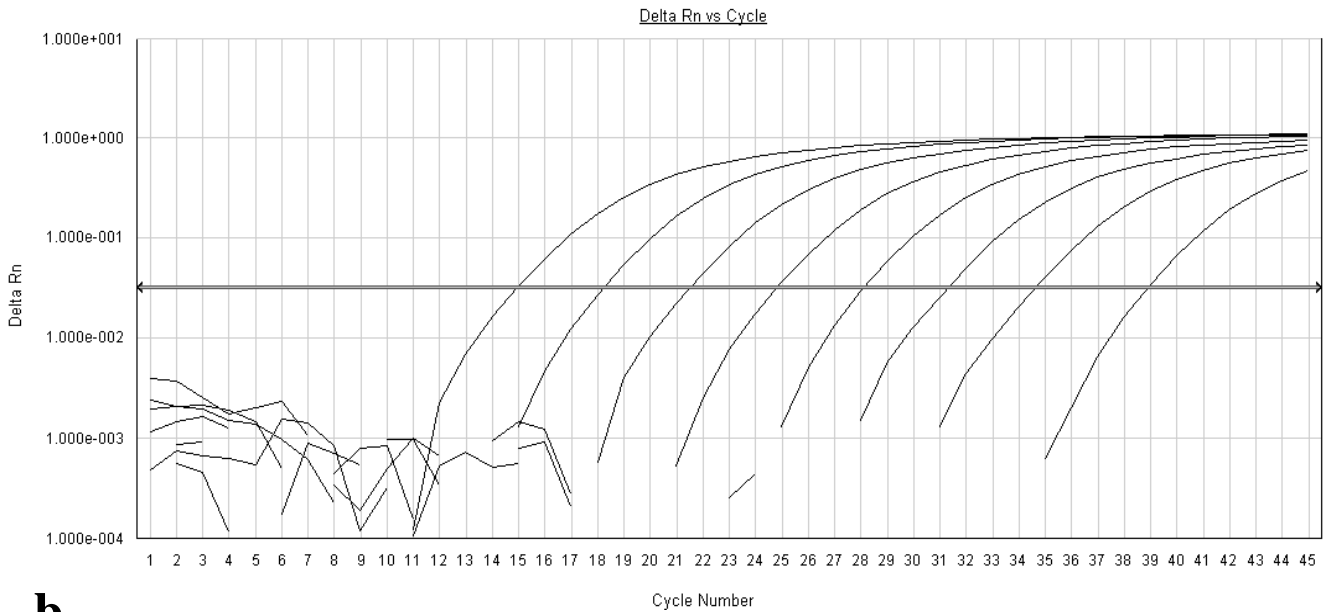
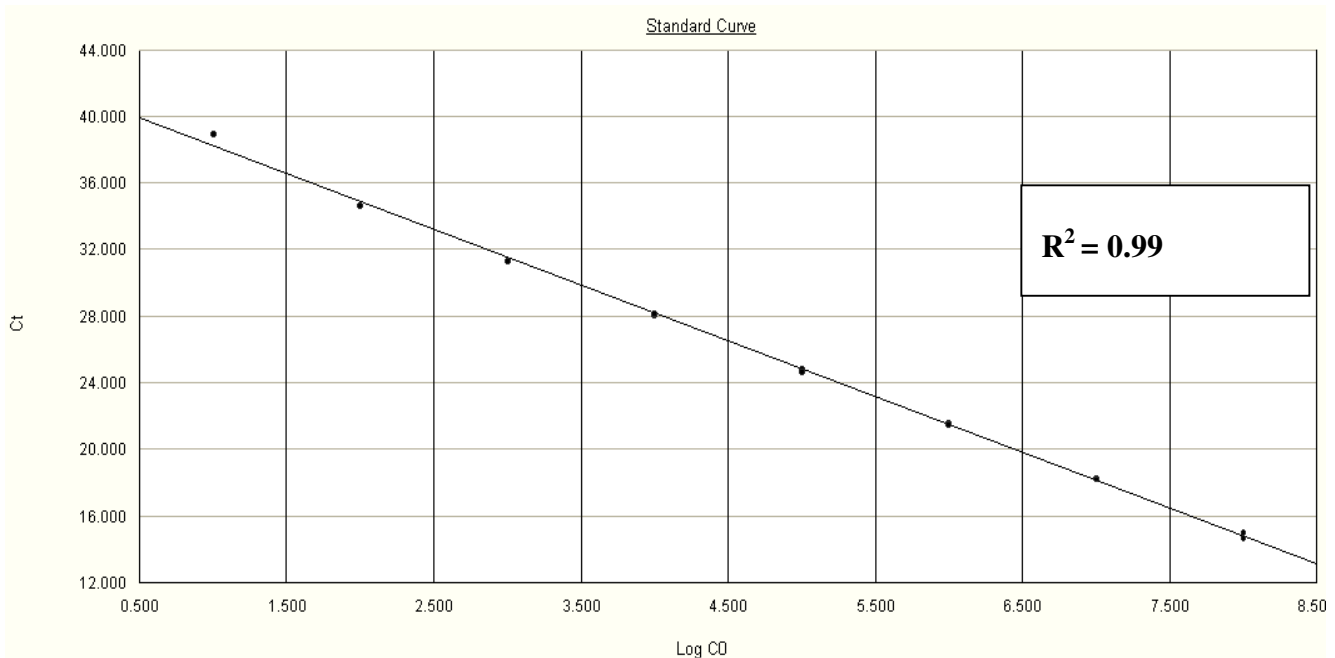
and increase the removal of inhibitors. Another advantage of this modified protocol is the possibility to detect *Campylobacter* even if they are aggregated. Indeed, very little is known about the spatial distribution of bacteria in faeces, and small amount of faeces sampled may provide an erroneous measure of *Campylobacter spp.* prevalence. Finally, this method could prove useful routine extraction of DNA from faeces compared to other long, complex, and fastidious methods of DNA extraction proposed in the past [64-67].

Moreover, in our trial, there is a good correlation between the techniques at the quantitative level for faecal samples either from experimentally pigs (ICC of 0.96) or from naturally pigs (ICC of 0.80). The discrepancies between the concentrations found by both methods could be attributed partly to the viable but non culturable cells (VBNC) or to the dead cells resulting in higher concentrations with the real-time quantitative PCR. The observed variability might be due to dilution factors used for quantitative culture, to an insufficient homogenization of the samples, pipetting errors, factors affecting the growth of different isolates, or possibly, the presence of antagonistic bacterial species. Nevertheless, the agreement concerning the intra-class correlation coefficient is higher than 0.75 and so considered as an excellent [68]. We can underline the ability of this PCR to quantify very little amount of faeces sampling for piglets by swabs compared to culture, which needed an enrichment step to detect *Campylobacter* from these swabs.

The *Campylobacter* specific real-time PCR assays developed in this study is very attractive because this method allow (i) a direct detection of *Campylobacter* in environmental samples, and (ii) a direct quantification of *Campylobacter* in pig faecal samples without need of isolation, enrichment and/or biochemical tests, and even if several bacteria species are present in the sample. Moreover, the presence of an internal control of extraction and ebullition

associated with a consequent volume of sampling (5 grams, when it is possible) allow a correct and reliable quantification of *Campylobacter* in pig faecal samples. Finally, although *C. jejuni* and *C. coli* are responsible for 95% of all cases of *Campylobacter*-induced diarrheal diseases, this assay can detect excretion of other *Campylobacter*, such as *C.r fetus*, *C. lari*, *C. laridis*, *C. hyointestinalis* and *C. upsaliensis*, which can be found in pig faeces and/or be responsible of human infections [69-72].

In conclusion, the real-time PCR developed in this study provides a new tool to study the epidemiology of *Campylobacter*. The rapidity of the method compared to culture and the possibility of the PCR to be increasingly automated makes it even more interesting. Indeed, it could be applied to further epidemiological surveys to investigate the carriage and the excretion of *Campylobacter* by conventional pig herds.

a**b****Figure 1**

Dynamic range and sensitivity of the *Campylobacter* plasmid real-time PCR assay.

(a) Detection of 10-fold serial dilution of *Campylobacter* standard plasmidic DNA by the real-time Taqman assay performed in duplicate from 10^1 to 10^8 genome copies per PCR reaction. The fluorescence intensity (Delta Rn) is plotted vs cycle number.

(b) Standard curve of these dilutions, each dot representing the result of duplicate amplification of each dilution. The coefficient of determination ($R^2 = 0.99$) and the slope of the regression curve ($y = -3.34x + 41.57$) are indicated. The standard curve is obtained by correlation of the threshold cycle values (Ct) and \log_{10} input plasmid copy number (Log CO) from the amplification plot.

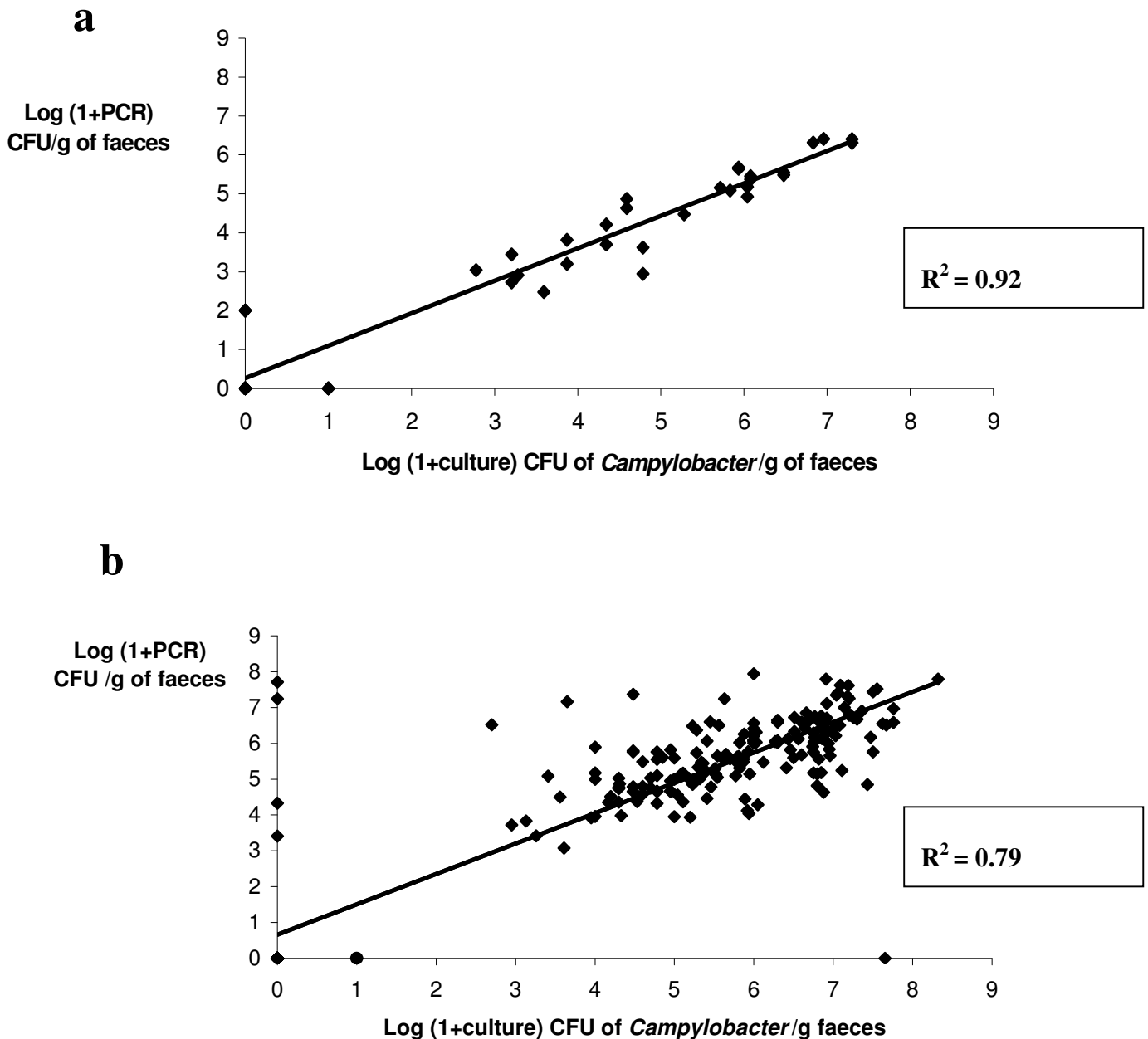


Figure 2.

Scatter plot showing the differences and correlations between the real-time PCR and the microaerophilic culture method for the faecal samples of pigs (a) experimentally infected with *Campylobacter* and (b) naturally infected with *Campylobacter* in farms. Data for *Campylobacter*-positive samples versus *Campylobacter*-negative samples by both methods, (a) $n=50$ and $n=39$ for experimentally infected pigs respectively, (b) $n=198$ and $n=11$ for naturally infected pigs respectively, fall close to the line equivalence ((a) $R^2=0.92$ and (b) $R^2=0.79$).

(a) The two samples that were culture positive (after an enrichment step, <100 CFU/g of faeces) and PCR negative and the two samples that were culture negative and PCR positive (100 CFU/g of faeces) are relatively close to zero and around the detection limit of both methods.

Similarly, (b) three samples were culture positive and PCR negative: two of them were cultured after an enrichment step and consequently relatively close to zero whereas the other showed a quantity of $10^{7.65}$ CFU/g of faeces with the culture. Four samples were culture negative (all after an enrichment step).

The coefficient of intra-class correlation for inter-rater reliability was calculated only for the quantitative results for the samples positive by culture and PCR ((a) ICC=0.96 and (b) ICC=0.80 respectively)

Table 1

List of strains used for validation of specificity of the *Campylobacter* real-time PCR assay. 174 isolates (representing 36 reference strains and 138 previously characterized field strains) of *Campylobacter* were used for the evaluation of this assay. Also listed are the non-*Campylobacter* control strains, closed to the genus *Campylobacter* and other enteric bacteria. Moreover, all these strains were tested for validate the specificity of the primers-probe set for the internal control.

Bacterial species (<i>n</i>)	Name or origin of strain	<i>Campylobacter</i> real-time PCR identification	<i>Yersinia ruckeri</i> real-time PCR identification
<i>Campylobacter coli</i> (2)	CCUG 11283, CIP 7081	Positive	Negative
<i>C. coli</i> pig isolates (25)	AFSSA, ENVN-INRA	Positive	Negative
<i>C. coli</i> poultry isolates (25)	AFSSA, ENVN-INRA	Positive	Negative
<i>C. coli</i> human isolates (25)	AFSSA, CNR-CH	Positive	Negative
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>jejuni</i> (4)	CCUG 11284, NCTC 11168, CIP 103726, NCTC 81176	Positive Positive	Negative Negative
<i>C. jejuni</i> poultry isolates (25)	AFSSA, ENVN-INRA	Positive	Negative
<i>C. jejuni</i> human isolates (25)	AFSSA, ENVN-INRA, CNR-CH	Positive	Negative
<i>Campylobacter jejuni doylei</i>	CCUG 24567	Positive	Negative
<i>Campylobacter fetus</i> subsp <i>fetus</i> (2)	CCUG 68231, CIP 2595396	Positive	Negative
<i>Campylobacter fetus</i> subsp <i>venerealis</i>	CCUG 33899	Positive	Negative
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	CCUG 14169	Positive	Negative
<i>Campylobacter lari</i> (3)	CCUG 23947, ATCC 35222, CIP 107080	Positive	Negative
<i>Campylobacter upsaliensis</i> (2)	CCUG 14913, CIP 400	Positive	Negative
<i>Campylobacter sputorum</i>	CIP 103749	Positive	Negative
<i>Helicobacter canis</i>	CIP 104753	Negative	Negative
<i>Helicobacter felis</i>	CIP 104382	Negative	Negative
<i>Helicobacter mustelae</i>	CIP 103759	Negative	Negative
<i>Helicobacter pullorum</i>	CIP 104787	Negative	Negative
<i>Helicobacter pylori</i> (3)	CIP 103995, CIP 26695, CIP 101260	Negative	Negative
<i>Wolinella succinogenes</i>	CCUG 13145	Negative	Negative
<i>Arcobacter butzleri</i>	CCUG 30485	Negative	Negative
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	CIP 104014	Negative	Negative
<i>Listeria monocytogenes</i> (3)	CIP 103575, ATCC 895807, ATCC 19115	Negative	Negative
<i>Listeria innocua</i> (3)	CCUG 15531, ENVN-INRA	Negative	Negative
<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>			
- serovar Enteritidis	ENVN-INRA	Negative	Negative
- serovar Typhimurium	ATCC 13311		
<i>Enterococcus faecalis</i> (2)	CIP 103013, CCUG 19916	Negative	Negative
<i>Escherichia coli</i>	V517	Negative	Negative
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)	ENVN-INRA	Negative	Negative
<i>Enterobacter aerogenes</i> (2)	ENVN-INRA	Negative	Negative
<i>Staphylococcus aureus</i> (2)	ENVN-INRA	Negative	Negative
<i>Internal control</i>		Negative	Positive
<i>Internal control</i> field isolates (5)		Negative	Positive

n, number of strains

NCTC, National Collection of Type Cultures (Colindale, UK); CCUG, Culture Collection University of Göteborg (Göteborg, Sweden); ATCC, American Type Culture Collection (Manassas, Va); CIP, Collection of the Pasteur Institut (Paris, France) AFSSA: Strains from the collection of the French Agency for Food Safety (Ploufragan, France); CNR-CH: Strains isolated from the collection of the French National Reference Center for *Campylobacter* and *Helicobacter* (Bordeaux, France); ENVN-INRA: Strains isolated from our inhouse collection.

Table 2

Variability analysis of the real-time PCR assay with plasmidic DNA (a) and with DNA extracted from spiked-negative faecal samples of pigs (b)

a	Plasmid copy number	Intra-assay ^{1a}		Inter-assay ^{2a}	
		CV (%)	CVn (%)	CV (%)	CVn (%)
	10 ⁸	0.64	5.95	1.55	14.94
	10 ⁷	0.21	2.45	0.54	6.99
	10 ⁶	0.68	9.36	0.58	6.80
	10 ⁵	1.24	22.10	0.60	8.99
	10 ⁴	0.39	7.53	0.59	9.42
	10 ³	0.67	13.03	0.69	13.59
	10 ²	2.89	14.24	1.16	20.17
	10 ¹	2.27	60.40	2.39	60.71

b	CFU of <i>Campylobacter</i> per gram of faeces	Intra-assay ^{1b}		Inter-assay ^{2b}	
		CV (%)	CVn (%)	CV (%)	CVn (%)
	2 x 10 ⁷	0.48	6.76	1.78	26.78
	2 x 10 ⁶	0.65	11.07	1.75	23.36
	2 x 10 ⁵	1.06	21.16	2.19	39.38
	2 x 10 ⁴	1.50	36.86	1.27	31.26
	2 x 10 ³	1.67	40.99	1.84	45.66
	2 x 10 ²	1.59	38.55	2.15	43.13

The coefficient of variation was determined for the Ct values (CV) as well as for the estimated plasmid copy number (CVn) extrapolated from plasmidic standard curve (a) and for the estimated CFU of *Campylobacter* per gram of faeces extrapolated from the standard curve generated with spiked faecal samples (b).

^{1a} Mean: CV 1.28 , CVn 19.29; values were obtained in 10 replicates.

^{1b} Mean: CV 1.16, CVn 20.23; values were obtained in 10 replicates.

^{2a} Mean: CV 0.99, CVn 22.20; values were obtained in 10 independent experiments.

^{2b} Mean: CV 1.57, CVn 29.94; values were obtained in 10 independent experiments.

Table 3.

Comparison of real-time PCR and conventional microaerobic culture (direct plating and indirect plating after an enrichment step) for the detection of *Campylobacter spp.* (i) in faecal samples of experimentally infected pigs (Table 3a) or (ii) in faecal and environmental samples of naturally contaminated pigs from conventional herds (Table 3b).

a	Faecal samples of experimentally infected pigs	Microaerobic culture			
		+	-	Total	
	Real-time PCR	+	50	2	52
		-	2	39	41
		Total	52	41	93

a Sensitivity Se=96%, Specificity Sp=95%, Kappa K=0.91

b	Faecal and environmental samples of pig from conventional herds	Microaerobic culture			
		+	-	Total	
	Real-time PCR	+	270	3	273
		-	4	142	146
		Total	274	145	419

b Sensitivity Se=98%, Specificity Sp=98%, Kappa K=0.96

References

1. Allos BM. *Campylobacter jejuni* Infections: Update on Emerging Issues and Trends. Clin Infect Dis 2001, 32(8):1201-1206.
2. Friedman CR, Hoekstra RM, Samuel M, Marcus R, Bender J, Shiferaw B, Reddy S, Ahuja SD, Helfrick DL, Hardnett F. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: A case-control study in FoodNet sites. Clin Infect Dis 2004, 38 Suppl 3:S285-296.
3. Megraud F. Appréciations des risques alimentaires liés aux *Campylobacter*. Application au couple poulet / *C. jejuni*. In: Rapport technique de l'AFSSA. Maisons-Alfort, France; 2004: 96.
4. Gallay A, Bousquet V, Siret V, Prouzet-Mauleon V, Valk Hd, Vaillant V, Simon F, Strat YL, Megraud F, Desenclos J-C. Risk Factors for Acquiring Sporadic *Campylobacter* Infection in France: Results from a National Case-Control Study. J Infect Dis 2008, 197(10):1477-1484.
5. Robinson DA. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. Br Med J (Clin Res Ed) 1981, 282(6276):1584.
6. Leonard EE, 2nd, Tompkins LS, Falkow S, Nachamkin I. Comparison of *Campylobacter jejuni* isolates implicated in Guillain-Barre syndrome and strains that cause enteritis by a DNA microarray. Infect Immun 2004, 72(2):1199-1203.
7. Engberg J, Aarestrup FM, Taylor DE, Gerner-Smidt P, Nachamkin I. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. Emerg Infect Dis 2001, 7(1):24-34.
8. Tauxe RV. Emerging foodborne pathogens. Int J Food Microbiol 2002, 78(1-2):31-41.
9. Werno AM, Klena JD, Shaw GM, Murdoch DR. Fatal Case of *Campylobacter lari* Prosthetic Joint Infection and Bacteremia in an Immunocompetent Patient. J Clin Microbiol 2002, 40(3):1053-1055.
10. Labarca JA, Sturgeon J, Borenstein L, Salem N, Harvey SM, Lehnkering E, Reporter R, Mascola L. *Campylobacter upsaliensis*: Another Pathogen for Consideration in the United States. Clin Infect Dis 2002, 34(11):e59-e60.
11. Kapperud G, Aasen S. Descriptive epidemiology of infections due to thermotolerant *Campylobacter spp.* in Norway, 1979-1988. Apmis 1992, 100(10):883-890.
12. Kapperud G, Espeland G, Wahl E, Walde A, Herikstad H, Gustavsen S, Tveit I, Natas O, Bevanger L, Digranes A. Factors associated with increased and decreased risk of *Campylobacter* infection : a prospective case-control study in Norway. Am J Epidemiol 2003, 158(3):234-242.

13. Neimann J, Engberg J, Molbak K, Wegener HC. A case-control study of risk factors for sporadic *Campylobacter* infections in Denmark. *Epidemiol Infect* 2003, 130(3):353-366.
14. Alter T, Fehlhaber K. [Use of AFLP analysis for the molecular biological fine typing of *Campylobacter jejuni* strains from turkey flocks]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2003, 116(11-12):454-459.
15. Nielsen EM, Engberg J, Madsen M. Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Danish patients, poultry, cattle and swine. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997, 19(1):47-56.
16. Petersen L, Newell DG. The ability of Fla-typing schemes to discriminate between strains of *Campylobacter jejuni*. *J Appl Microbiol* 2001, 91(2):217-224.
17. Refregier-Petton J, Rose N, Denis M, Salvat G. Risk factors for *Campylobacter* spp. contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. *Prev Vet Med* 2001, 50(1-2):89-100.
18. Broman T, Waldenstrom J, Dahlgren D, Carlsson I, Eliasson I, Olsen B. Diversities and similarities in PFGE profiles of *Campylobacter jejuni* isolated from migrating birds and humans. *J Appl Microbiol* 2004, 96(4):834-843.
19. Brown PE, Christensen OF, Clough HE, Diggle PJ, Hart CA, Hazel S, Kemp R, Leatherbarrow AJH, Moore A, Sutherst J et al. Frequency and Spatial Distribution of Environmental *Campylobacter* spp. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70(11):6501-6511.
20. Inglis GD, Kalischuk LD, Busz HW, Kastelic JP. Colonization of Cattle Intestines by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter lanienae*. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71(9):5145-5153.
21. Açık MN, Cetinkaya B. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from healthy cattle and sheep. *J Med Microbiol* 2006, 55(331-334).
22. Payot S, Dridi S, Laroche M, Federighi M, Magras C. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* isolated from fattening pigs in France. *Vet Microbiol* 2004, 101(2):91-99.
23. Weijtens MJ, Reinders RD, Urlings HA, Van der Plas J. *Campylobacter* infections in fattening pigs; excretion pattern and genetic diversity. *J Appl Microbiol* 1999, 86(1):63-70.
24. Young CR, Harvey R, Anderson R, Nisbet D, Stanker LH. Enteric colonisation following natural exposure to *Campylobacter* in pigs. *Res Vet Sci* 2000, 68(1):75-78.
25. On SL. Identification methods for *Campylobacters*, helicobacters, and related organisms. *Clin Microbiol Rev* 1996, 9(3):405-422.
26. Meinersmann RJ, Patton CM, Evins GM, Wachsmuth IK, Fields PI. Genetic diversity and relationships of *Campylobacter* species and subspecies. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002, 52(Pt 5):1789-1797.

27. Nogva HK, Bergh A, Holck A, Rudi K. Application of the 5'-Nuclease PCR Assay in Evaluation and Development of Methods for Quantitative Detection of *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 2000, 66(9):4029-4036.
28. Yang C, Jiang Y, Huang K, Zhu C, Yin Y. Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003, 38(3):265-271.
29. Yang C, Jiang Y, Huang K, Zhu C, Yin Y, Gong J-H, Yu H. A real-time PCR assay for the detection and quantitation of *Campylobacter jejuni* using SYBR Green I and the LightCycler. *Yale Journal of Biology and Medicine* 2004, 77(5-6):125-132.
30. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000, 25(2):169-193.
31. Cone RW, Hobson AC, Huang ML. Coamplified positive control detects inhibition of polymerase chain reactions. *J Clin Microbiol* 1992, 30(12):3185-3189.
32. Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, Cabrita J, Megraud F. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol* 1997, 35(4):995-998.
33. Rijpens N, Herman L, Vereecken F, Jannes G, De Smedt J, De Zutter L. Rapid detection of stressed *Salmonella* spp. in dairy and egg products using immunomagnetic separation and PCR. *Int J Food Microbiol* 1999, 46(1):37-44.
34. Perelle S, Josefsen M, Hoorfar J, Dilasser F, Grout J, Fach P. A LightCycler real-time PCR hybridization probe assay for detecting food-borne thermophilic *Campylobacter*. *Mol Cell Probes* 2004, 18(5):321-327.
35. Lund M, Nordentoft S, Pedersen K, Madsen M. Detection of *Campylobacter* spp. in Chicken Fecal Samples by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 2004, 42(11):5125-5132.
36. Gibello A, Blanco MM, Moreno MA, Cutuli MT, Domenech A, Dominguez L, Fernandez-Garayzabal JF. Development of a PCR Assay for Detection of *Yersinia ruckeri* in Tissues of Inoculated and Naturally Infected Trout. *Appl Environ Microbiol* 1999, 65(1):346-350.
37. Denis M, Soumet C, Rivoal K, Ermel G, Blivet D, Salvat G, Colin P. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Lett Appl Microbiol* 1999, 29(6):406-410.
38. Cavalier-Smith T. The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002, 52(1):7-76.
39. Leblanc Maridor M, Denis M, Lalande F, Beaurepaire B, Cariolet R, Fravallo P, Federighi M, Seegers H, Belloc C. Experimental infection of specific pathogen-free pigs with *Campylobacter*: Excretion in faeces and transmission to non-inoculated pigs. *Vet Microbiol* 2008, 131(3-4):309-317.

40. Schunck B, Kraft W, Truyen U. A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. *J Virol Methods* 1995, 55(3):427-433.
41. Kuzio S, Hanguelhard A, Morelle M, Ronsin C. Rapid screening for HLA-B27 by a TaqMan-PCR assay using sequence-specific primers and a minor groove binder probe, a novel type of TaqMan™ probe. *J Immun Methods* 2004, 287(1-2):179-186.
42. Stelzl E, Muller Z, Marth E, Kessler HH. Rapid Quantification of Hepatitis B Virus DNA by Automated Sample Preparation and Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 2004, 42(6):2445-2449.
43. Fleiss JLFJ. *Statistical Methods for Rates and Proportions*, John Wiley & Sons, Inc. edn. New York: John Wiley & Sons; 1981.
44. LaGier MJ, Joseph LA, Passaretti TV, Musser KA, Cirino NM. A real-time multiplexed PCR assay for rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Mol Cell Probes* 2004, 18(4):275-282.
45. Logan JMJ, Edwards KJ, Saunders NA, Stanley J. Rapid Identification of *Campylobacter* spp. by Melting Peak Analysis of Biprobe in Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 2001, 39(6):2227-2232.
46. Sails AD, Fox AJ, Bolton FJ, Wareing DR, Greenway DL. A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Appl Environ Microbiol* 2003, 69(3):1383-1390.
47. Mateo E, Cárcamob J, Urquijoa M, Peralesb I, Fernández-Astorga A. Evaluation of a PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in retail poultry products. *Res Microbiol* 2005, 156(4):568-574.
48. Inglis GD, Kalischuk LD. Use of PCR for Direct Detection of *Campylobacter* Species in Bovine Feces. *Appl Environ Microbiol* 2003, 69(6):3435-3447.
49. Keramas G, Bang DD, Lund M, Madsen M, Bunkenborg H, Telleman P, Christensen CBV. Use of Culture, PCR Analysis, and DNA Microarrays for Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Chicken Feces. *J Clin Microbiol* 2004, 42(9):3985-3991.
50. Rudi K, Hoidal HK, Katla T, Johansen BK, Nordal J, Jakobsen KS. Direct Real-Time PCR Quantification of *Campylobacter jejuni* in Chicken Fecal and Cecal Samples by Integrated Cell Concentration and DNA Purification. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70(2):790-797.
51. Jensen AN, Andersen MT, Dalsgaard A, Baggesen DL, Nielsen EM. Development of real-time PCR and hybridization methods for detection and identification of thermophilic *Campylobacter* spp. in pig faecal samples. *J Appl Microbiol* 2005, 99(2):292-300.
52. Stonnet V, Guesdon J-L. *Campylobacter jejuni*: Specific oligonucleotides and DNA probes for use in polymerase chain reaction-based diagnosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1993, 7(4):337-344.

53. Inglis GD, Kalischuk LD. Direct Quantification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter lanienae* in Feces of Cattle by Real-Time Quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70(4):2296-2306.
54. Lawson AJ, Linton D, Stanley J, Owen RJ. Polymerase chain reaction detection and speciation of *Campylobacter upsaliensis* and *C. helveticus* in human faeces and comparison with culture techniques. *J Appl Microbiol* 1997, 83(3):375-380.
55. Harvey RB, Young CR, Ziprin RL, Hume ME, Genovese KJ, Anderson RC, Droleskey RE, Stanker LH, Nisbet DJ. Prevalence of *Campylobacter spp* isolated from the intestinal tract of pigs raised in an integrated swine production system. *J Am Vet Med Assoc* 1999, 215(11):1601-1604.
56. Harvey RB, Young CR, Anderson RC, Droleskey RE, Genovese KJ, Egan LF, Nisbet DJ. Diminution of *Campylobacter* colonization in neonatal pigs reared off-sow. *J Food Prot* 2000, 63(10):1430-1432.
57. Beumer RR, de Vries J, Rombouts FM. *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. *InterJ Food Microbiol* 1992, 15(1-2):153-163.
58. Mederma GJ, Schets FM, Giessen AW, Havelaar AH. Lack of colonization of 1 day old chicks by viable, non-culturable *Campylobacter jejuni*. *J Appl Microbiol* 1992, 72(6):512-516.
59. Rollins DM, Colwell RR. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl Environ Microbiol* 1986, 52(3):531-538.
60. Cappelier JM, Minet J, Magras C, Colwell RR, Federighi M. Recovery in embryonated eggs of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells and maintenance of ability to adhere to HeLa cells after resuscitation. *Appl Environ Microbiol* 1999, 65(11):5154-5157.
61. Madden RH, Moran L, Scates P. Optimising recovery of *Campylobacter spp.* from the lower porcine gastrointestinal tract. *J Microbiol Methods* 2000, 42(2):115-119.
62. Linton D, Lawson AJ, Owen RJ, Stanley J. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *J Clin Microbiol* 1997, 35(10):2568-2572.
63. Koonjul PK, Brandt WF, Farrant JM, Lindsey GG. Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA. *Nucl Acids Res* 1999, 27(3):915-916.
64. Frankel G, Riley L, Giron JA, Valmassoi J, Friedmann A, Strockbine N, Falkow S, Schoolnik GK. Detection of Shigella in feces using DNA amplification. *J Infect Dis* 1990, 161(6):1252-1256.
65. Wilde J, Eiden J, Yolken R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. *J Clin Microbiol* 1990, 28(6):1300-1307.

66. Islam D, Lindberg AA. Detection of *Shigella dysenteriae* type 1 and *Shigella flexneri* in feces by immunomagnetic isolation and polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992, 30(11):2801-2806.
67. van Zwet AA, Thijs JC, Kooistra-Smid AM, Schirm J, Snijder JA. Use of PCR with feces for detection of *Helicobacter pylori* infections in patients. *J Clin Microbiol* 1994, 32(5):1346-1348.
68. Shrout PE, Fleiss JL. Intraclass correlations: Uses in assessing rater reliability. *Psychol Bulletin* 1979, 86:420-427.
69. Gebhart CJ, Edmonds P, Ward GE, Kurtz HJ, Brenner DJ. "*Campylobacter hyointestinalis*" sp. nov.: a new species of *Campylobacter* found in the intestines of pigs and other animals. *J Clin Microbiol* 1985, 21(5):715-720.
70. Minet J, Grosbois B, Megraud F. *Campylobacter hyointestinalis*: an opportunistic enteropathogen? *J Clin Microbiol* 1988, 26(12):2659-2660.
71. Söderström C, Schalen C, Walder M. Septicaemia caused by unusual *Campylobacter* species (*C. laridis* and *C. mucosalis*). *Scand J Infect Dis* 1991, 23(3):369-371.
72. Bourke B, Chan VL, Sherman P. *Campylobacter upsaliensis*: Waiting in the Wings. *Clin Microbiol Rev* 1998, 11(3):440-449.

**2. ARTICLE 2 : PCR EN TEMPS REEL
DIFFERENTIATION ET QUANTIFICATION DE *C. COLI* ET *C. JEJUNI*
A PARTIR DE CULTURES PURES, DE MATIERES FECALES OU DE
PRELEVEMENTS ENVIRONNEMENTAUX**

**Rapid identification and quantification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*
by real-time PCR in pure cultures and in complex samples**

Mily Leblanc Maridor^{a,*}, Henri Seegers^a, Martine Denis^b, Catherine Belloc^a

^aINRA, Veterinary School, Research group on Bio-aggression, Epidemiology and Risk
Analysis in Animal Health, UMR 1300, BP 40706, 44307 Nantes Cedex 03, France

^bAFSSA, French Agency for Food Safety, Pig and Poultry Veterinary Research laboratory,
Hygiene and Quality of poultry and Swine Products Research Unit, BP53, 22440 Ploufragan,
France

Manuscrit en préparation

En vue d'une valorisation et/ou d'une soumission à BMC Microbiology

1. Introduction

Campylobacter spp. are recognized as the leading human foodborne pathogens in developed countries, and within the genus *Campylobacter*, the thermophilic species *C. jejuni* and *C. coli* are the most frequently associated with illness, accounting for over 95% of infections when selective culture media are used for isolation [1-5]. These two species are asymptotically present in the intestinal tract of birds and mammals, including food production animals and pets, without causing clinical signs [6-8]. *Campylobacter* carriage of livestock animals poses an important risk for human contamination (contamination of carcasses at slaughter, of milk, of water by rain washed-off livestock wastes and slurries). Pigs are known to be frequently infected with *Campylobacter* (prevalence between 50% and 100%) and to exhibit high counts of this pathogen in their faeces ranging from 10^2 to 10^7 CFU/g and the predominant species carried by pigs is *C. coli* [9-14]. Nevertheless, studies carried out in the United States found a high prevalence of *C. jejuni* on farms [15, 16] and *C. jejuni* may coexist with *C. coli* in pigs [8, 13, 14, 17, 18].

The detection of *C. coli* and *C. jejuni* is difficult due to specific growth requirements, all the more in complex substrates like faeces or environmental samples, and because it may enter in a viable but not culturable state. Furthermore, correct differentiation of thermophilic *Campylobacter spp.*, especially *C. coli* and *C. jejuni*, by phenotypic tests is difficult and the use of hippurate hydrolysis test to distinguish these two species is often problematic [19, 20]. Molecular tools, particularly PCR-based methods, provide a good, rapid and sensitive alternative to the bacteriological method for the detection and for the identification of *C. coli* and *C. jejuni*.

In recent years, numerous molecular PCR-based diagnostic approaches have been developed to detect *Campylobacter spp.* or to identify *C. coli* and *C. jejuni* in various substrates, including pure culture [21, 22], human stools [23, 24], food products [25] and chicken faecal samples [26]. Real-time PCR assays have been developed to detect *C. jejuni* and *C. coli* or to quantify *C. jejuni* only on pure culture [27-29], in complex substrates like food products after an enrichment step [30], in poultry, milk and environmental water [31], cattle faeces [32] or chicken faecal samples [33]. Recently, real-time PCR methods allowing species-specific identification of *C. coli* and *C. jejuni* have been developed in human stools by Lagier *et al.* [34] and by Persson and Olsen [35], and in pig faecal samples after an enrichment step by Jensen *et al.* [18]; However, real-time PCR technique has not yet been reported for quantitative differentiation of *C. coli* and *C. jejuni* in complex substrates such as pig faecal samples.

The aim of this study was to develop a real-time quantitative PCR method to species-specific quantification of *C. coli* and *C. jejuni* in faecal and environmental samples. The first step in the development of the final assay was the definition of the multiplex PCR assay to quantify *C. coli* and *C. jejuni* isolates. Then a modified DNA extraction protocol associated with the addition of an internal control for extraction and PCR amplification was also examined for its ability (i) to evaluate DNA purification with different parameters (potential presence of PCR inhibitory compounds, DNA yield and reproducibility), and (ii) to detect *C. jejuni* among predominant *C. coli* in naturally infected pig faecal or environmental samples. This would allow assessing the co-colonization of *Campylobacter spp.* in pigs). Finally, the last step was the application of these new developed real-time PCR assays to field complex substrates, that is to say faecal samples from experimentally and naturally infected pigs and environmental

samples. The bacterial culture was taken as a gold standard for their validation at the quantitative level.

2. Material and Methods

2.1. Bacterial strains, culture conditions

Campylobacter jejuni NCTC 11168 and *Campylobacter coli* CIP 7081 were used for preparing the quantification standards for the real-time quantitative PCR. These two species and three other strains selected from the collection of the French Agency for Food Safety (AFSSA, Ploufragan) and described in the study of Leblanc Maridor *et al.* [36] were used as inocula in a faecal inoculation experiment to create standards curve for faecal samples.

Different *Campylobacter spp.* and related *Helicobacter*, *Wolinella* and *Arcobacter* reference strains were used for testing the specificity of primers and probes for real-time PCR identification and differentiation of *C. coli* and *C. jejuni* (Table 1). In addition, we have tested 50 *C. jejuni* and 75 *C. coli* isolates (of human, poultry or pig origin) selected from our inhouse collection, from the collection of the French Agency for Food Safety (AFSSA, Ploufragan), and from the collection of the French National Reference Center for *Campylobacter* and *Helicobacter* (CNR-CH, Bordeaux) (Table 1). All the isolates were characterized by the PCR described by Denis *et al.* (1999). Strains were stored at -80°C in brain heart infusion broth (Difco, Detroit, Michigan) containing 20% (v/v) glycerol.

Campylobacter strains were grown at 25, 37 or 41.5°C for 48h in a micro-aerophilic atmosphere (7% O₂, 10% CO₂, 83% N₂) on Karmali agar plates (AES laboratory, Rennes, France). *Arcobacter*, *Helicobacter*, *Wolinella* and the other enteric bacteria (clinical isolates or reference strains) were cultured under appropriate microaerobic and anaerobic conditions (Table 1).

2.2. DNA extraction and quantification standard DNA preparation

Genomic DNA of all bacteria from the bacterial culture was extracted using the Nucleospin® Tissue mini-kit (Macherey Nagel, Hoerd, France) according to the manufacturer's instructions. The concentration of isolated double stranded DNA was determined by measuring the optical density at 260 nm and the purity was assessed by examination of 260/280 nm optical density ratios. All DNA samples classified as pure (*i.e.* having a 260/280 nm optical density ratio between 1,8 and 2) were adjusted to 10 ng μL^{-1} in TE buffer, stored at -20°C until required for analysis.

Total genomic DNA of *C. jejuni* NCTC 11168 and *C. coli* CIP 7081 were thus extracted. The numbers of genome copies of *C. jejuni* (based on a genome size of 1640 Kbp) and *C. coli* (based on a genome size of 1860 Kbp) in 100ng of DNA (for one PCR reaction) were 5.24×10^7 and 4.62×10^7 , respectively. After DNA quantitation by spectrophotometrical analysis, 10-fold dilutions of each extract, representing 10^8 to 10^1 genome copies of *C. jejuni* per 5 μL of template (PCR) and 3×10^8 to 3×10^0 genome copies of *C. coli* per 5 μL of template (PCR reaction) were realized. Moreover, a standard curve with equal genome copies of *C. jejuni* and *C. coli* together was realized. Aliquots of each dilution were stocked at 4°C to be use directly or were stocked at -20°C and thawed once for use.

2.3. PCR primers and probes

The sequences were chosen to identify and discriminate specifically *C. jejuni* and *C. coli* from the clinically relevant *Campylobacter* species. The *C. jejuni* and *C. coli* species-specific primers and TaqMan® probe sets were designed with Primer Express version 2.0 (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) according to the recommendations of the manufacturer. This software was used to choose the best combinations of each primers-probe set by

checking primer-dimer or internal hairpin configurations, melting temperature, and percent G+C values. To optimize the PCR reaction, we have designed two Minor Groove Binder (MgB) probes. In fact, a minor groove binder at the 3' end increases the melting temperature of probes [37], allowing the use of shorter probes. Consequently, the shorter TaqMan® MGB probes have been shown to ameliorate specificity of real-time PCR [38] and mismatch discrimination [39]. Finally, the homologies of the selected primers and probes with unrelated sequences were checked by a search with the BLAST program of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The Taqman probes, labeled with a fluorescent reporter at the 5' end and conjugated to a Minor Groove Binder (MGB) at the 3' end, and the primers were all synthesized by Applied Biosystems.

2.3. Field samples collection and DNA preparation for direct real-time PCR-based quantification

The method to identify and quantify *C. coli* and *C. jejuni* was first assessed with faecal samples ($n = 119$) obtained from experimentally inoculated pigs with *C. coli* and *C. jejuni* alone or in a mix and from sham-inoculated ones [36]. Then, faecal and environmental samples from pigs from conventional herds ($n = 282$) were tested with both real-time PCR assays. Moreover, 15 *Campylobacter* negative specimens obtained from Specific-Pathogen-Free (SPF) sows and piglets from the high-security barn at the AFSSA located in Ploufragan (France) were used to test the specificity of the real-time PCR assays.

All samples were examined within 4 hours after sampling, for *Campylobacter spp.* quantification by conventional culture and by the real-time PCR described by Leblanc Maridor *et al.* [36]. The use of an internal control for the amplification and the extraction has

proven to be an effective tool for monitoring PCR inhibitors of PCR and build confidence in negative results obtained with *Campylobacter* specific real-time PCR assay.

DNA isolation from the faecal and environmental samples was performed using a modified extraction protocol of the Nucleospin® Tissue mini-kit (Macherey Nagel, Hoerd, France) with a preliminary step of “boiling” as described in the study of Leblanc Maridor *et al.* [36]. Finally, the DNA preparations, eluted in 100µL of elution buffer, were stored at -4°C prior to use and the rest of the supernatant was stored at -20°C.

2.4. Enumeration of Campylobacter spp. by bacterial culture methods and species identification by conventional multiplex PCR

For all the faecal samples, conventional bacteriological methods with direct streaking for the *Campylobacter* enumeration and indirect streaking with an enrichment step were applied as described by Leblanc Maridor *et al.* [36]. Finally, from each positive field sample corresponding to one pig, 10 colonies taken at random were purified and then suspended in 100 µL TE buffer (10 mmol Tris-HCl, 1 mmol EDTA, pH 7.6). DNA extraction was performed by heating the bacteria at 95°C for 10 min. After a low-speed centrifugation (5000 x g, 2 min), 3 µl of the supernatant was used for species identification by PCR. PCR and electrophoresis were performed as described by Denis *et al.* [21] to distinguish *C. coli* to *C. jejuni* strains.

2.5. Quantitative real-time PCR amplification

The real time-PCR was performed in a ABI PRISM® 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems) and the data were analyzed with the appropriate sequence detector software (SDS software, Applied Biosystems). The 20 µL PCR mixture for one reaction

contained 10µL of 1X Taqman Universal PCR Mastermix (containing AmpliTaq Gold™ DNA polymerase, dNTPs, Passive reference 1 (ROX) and optimised buffer components including 5mM MgCl₂), 400nM of each primer (*glyA*-R and *glyA*-F, *hipO*-R and *hipO*-F) and 200nM of each probe (*glyA*-P and *hipO*-P) for the duplex real-time PCR assay and 5µL of template DNA. In parallel, we have tested the two simplex real-time PCR assays, where the primers-probe sets were added separately in two different mixes. The thermal cycle protocol used was the following: activation of the Taq DNA polymerase at 95°C for 10 min and 45 or 48 cycles of 15s at 95°C and 60s at 60°C. All reactions were carried out alongside a non template control containing all reagents except DNA run in triplicate, positive controls containing DNA from reference strains *C. jejuni*, *C. coli* and negative controls containing DNA from *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. All samples were run in duplicate. Fluorescence of **FAM** and **VIC** was measured at their respective wavelengths during the annealing/elongation step of each cycle. After acquisition data, the baseline cycles for the **FAM** and **VIC** signal were set from cycle 3 to three cycles below the cycle at which the first signal appeared (generally between cycles 9 and 12 for the **FAM** signal and between cycles 11 and 15 for the **VIC** signal). The threshold cycle (Ct) is the PCR cycle at which a statistically significant increase in fluorescent signal is first detected. The Ct was defined as 10 times the standard deviation of the mean baseline fluorescence emission calculated for PCR cycles 3-9 for *C. coli* (**FAM** signal) and 3-14 for *C. jejuni* (**VIC** signal). Samples in which both duplicates had a Ct value below 42 were regarded as positive.

2.6. Evaluation of analytical performance of the real-time PCR assays

The analytical specificity of each real-time PCR assay alone or as duplex was assessed with purified genomic DNA preparations of different bacterial strains (see above Table 1) and with DNA isolated from the 15 *Campylobacter* negative pig faecal samples defined before (see

section 2.4).

The analytical sensitivity of the PCR assays was determined using the standard curves prepared with purified genomic DNA of cultures from *C. jejuni* NCTC 11168 and *C. coli* ATCC 33559 (see section 2.2).

Moreover, in order to generate a standard curve to quantify *C. coli* and *C. jejuni* in faecal samples and to evaluate the sensitivity of the assay for field samples, *Campylobacter*-negative faecal samples were spiked respectively with serial 10-fold dilutions of viable suspensions of each bacteria, ranging from 10^8 to 10 CFU per gram of faeces, and with equal volumes of the 10-fold dilutions of viable suspensions of each bacteria together. After seeding the negative faecal samples, DNA was extracted from each and the three standard curves were created automatically by the ABI PRISM® 7300 Sequence Detection System Software (Applied Biosystems), by plotting the Ct values against each standard dilution of known concentration. These standard curves have been used in each experiment to allow a reliable quantification.

The assay variability was established by repeatedly testing samples containing several concentrations of *C. coli* or *C. jejuni* spanning the whole range covered by each real-time PCR, with the DNA amounts obtained for the same samples in different assays (10 consecutive runs) and within an assay (10 times in the same assay), in order to calculate the inter-assay and intra-assay coefficient of variation (CV) for the Ct values experimentally determined, as previously described [40]. The intra-assay and inter-assay variability was assessed for the standard curves generated with the purified genomic DNA and with the DNA extracted from the *Campylobacter*-negative spiked faecal samples for each real-time PCR assay.

To test the presence of PCR inhibitors in the DNA isolated from the unseeded stools and from the faecal and environmental samples, we have used the real-time PCR with an internal bacterial control described by Leblanc Maridor *et al.* [36]. All the samples with inhibitors were discarded from the present study for the species quantification.

2.8. Statistical analysis

PCR amplification efficiency (E) was estimated by using the slope of the standard curve and the formula $E=10^{(-1/\text{slope})}-1$. Data analysis were performed using the SDS software (Applied Biosystems).

A total of 119 field samples from the experimental infection were evaluated in parallel using a molecular real-time PCR assay and a microbiological method. All data analyses were performed with Microsoft excel and SAS Systems version 8 (SAS, Cary, N.C.). The specificity and the sensitivity were assessed using the bacterial culture as a gold standard. The sensitivity was determined as the number of samples found positive both by direct inoculation or selective enrichment and by real-time PCR divided by the numbers of positive results by the cultivation method. The specificity was calculated as the number of negatives results found concomitant by both tests divided by the number of negative results by the bacteriological method. For measuring the agreement between the microaerophilic cultivation and real-time PCR kappa-statistic was used [41].

3. Results

3.1. Specificity, analytical sensitivity and linear range of the real-time PCR assays

The specificity of the primers-probe sets for the detection of *C. coli* and *C.jejuni*, alone or

together in a duplex assay, was optimized and tested against (i) different species or different strains of *Campylobacter*, all of which were found to be positive for its target, (ii) bacteria, genetically related or not, which could be present in faecal samples or responsible for diarrhoea in pigs and humans, all of which were found to be negative (Table 1). In addition, negative results were obtained for the 15 *Campylobacter*-negative faecal samples.

To determine the linear range of the real-time PCR assay, standard curves of the template DNA, in units of genome copy number, were generated for *C. coli*, for *C. jejuni* and for both. The standard curves spanned respectively eight, seven and seven orders of magnitude and showed linearity over the entire quantitation range. We observed a strong linear correlation (R^2 values were all equal or above to 0.99), providing an accurate measurement over a large variety of starting target amounts (Figures 1 and 2). The detection limits of the real-time PCR assays were of 3, 10 and 10 genome copies/reaction PCR for *C. coli*, *C. jejuni* and for both, and their efficiency of 99% for all of them.

3.2. Precision of the *C. jejuni* and *C. coli* real-time assays

The CV between runs and within run for samples containing *Campylobacter* DNA amounts spanning the whole range Sare reported in Table 2. To assess the intra-assay variation, purified genomic DNA of cultures from *C. jejuni* NCTC 11168 and *C. coli* ATCC 33559 from approximately 10^8 to 10 were measured 10 times each within one PCR run. The standard curves were $y = -3.33x + 40.17$ with $R^2 = 0.99$ for *C. coli* PCR and $y = -3.33x + 40.53$ with $R^2 = 0.99$ for *C. jejuni* PCR. The inter-assay variation was evaluated with different dilutions of purified genomic DNA in 10 independent PCR experiments on different days. For each PCR run, each dilution point was tested in duplicate and the standard curve mean was used for quantity estimation ($y = -3.39x + 42.7$ for the *C. coli* real-time PCR and $y = -3.20x + 40.2$ for

the *C. jejuni* real-time PCR). The standard deviations of low (10^2 copies)-, middle (10^5 copies)-, and high (10^8 copies) copy number of *C. coli* were respectively 0.70, 0.78 and 0.57. For *C. jejuni*, the standard deviations of low (10^2 copies)-, middle (10^5 copies)-, and high (10^8 copies) copy number were respectively 0.76, 1.13 and 0.94.

3.3. Validation of the real time PCR assays for analysis of field samples

The specificity of the real-time PCR for pig faecal samples was characterized using a stool-screening strategy, as described by Lagier *et al.* [34]. The DNA extracted from the 15 negative specimens produced Ct values > 42 , so considered as negative.

Moreover, several different spiking series with 10-fold dilutions of *C. coli*, *C. jejuni* and both suspensions were performed using negative faecal samples. The detection limit for the quantitative real-time PCR assays in spiked faecal samples were 250 CFU of *C. coli*/g of faeces and 200 CFU of *C. jejuni*/g of faeces, so similar to the bacteriological method. Although this assay was able to detect lower quantity between 50 and 200 CFU/g of faeces, the regression curve was only linear from about 10^7 to 10^2 CFU with reaction volumes of 20 μ L. Nevertheless, the quantification of the two species in a duplex reaction was not possible due to the competition between primers when high quantity of one target was mixed with low quantity of the other. Consequently, to quantify directly *C. coli* and *C. jejuni* in pig faecal samples, known to harbour high quantity of one species, two simplex PCR assays have to be done.

To assess the intra-assay variation, DNA extracted from the *Campylobacter*-negative spiked faecal samples from 2.5×10^7 to 2.5×10^2 CFU of *C. coli* /g of faeces and from 2×10^7 to 2×10^2 CFU of *C. jejuni* /g of faeces were measured 10 times each within one PCR run and the

results were reported in Table 2. The standard curves were $y = -3.33 + 45.82$ with $R^2 = 0.98$ and $y = -3.24x + 46.00$ with $R^2 = 0.98$ respectively. The inter-assay variation was evaluated with different dilutions of DNA extracted from the *Campylobacter*-negative spiked faecal samples in 10 independent PCR experiments on different days. For each PCR run, each dilution point was tested in duplicate and the standard curve mean was used for quantity estimation ($y = -3.36x + 43.7$ for the *C. coli* real-time PCR and $y = -3.25x + 46.2$ for the *C. jejuni* real-time PCR). For the DNA extracted from the *Campylobacter*-negative spiked faecal samples, the standard deviations of low (200 - 250 CFU/g of faeces)-, middle ($2 \cdot 10^4$ - $2.5 \cdot 10^4$ CFU/g of faeces)-, and high ($2 \cdot 10^7$ - $2.5 \cdot 10^7$ CFU/g of faeces) Colony Forming Units of *C. coli* or *C. jejuni* per gram of faeces were respectively 1.12, 1.14 and 1.59 or 0.77, 0.70 and 0.73.

3.4. Analysis of the faecal samples of pigs experimentally infected with *C. coli* or *C. jejuni*

The numbers of positive and negative samples determined by both detection methods for each assay are summarized in Table 3 for experimentally infected pigs. There was an excellent correlation at the qualitative level by both techniques. Indeed, for *C. jejuni* and *C. coli*, two culture-positive samples and one culture sample respectively were negative by real-time PCR for the *Campylobacter* experimentally infected pigs, and for both of them, only one culture-negative sample was positive by real-time PCR leading to a specificity of 96%.

The amount of CFU of *Campylobacter* in each faecal sample determined by the real-time PCR was calculated and compared to the results obtained by quantitative bacteriological method. Figure 3 shows the relationship between quantitative results determined by bacteriological method and real-time PCR for *C. jejuni* and *C. coli* real-time PCR assays. We observed a good correlation between PCR and culture at the quantitative level for

experimentally infected pig samples both for *C. jejuni* real-time PCR ($R^2 = 0.86$) and for *C. coli* real-time PCR ($R^2 = 0.94$). Among the PCR-culture positive samples for the experimentally infected pigs, 72.5% of the samples had a difference in cell number of less than 1 log, 25% less than 2 logs and 2.5% less than 2.5 logs for *C. coli* assay. For *C. jejuni* assay, the results obtained by real-time PCR matched equally the results obtained by culture: 67% of the samples had a difference in cell number of less than 1 log, 29% less than 2 logs and 4% less than 3 logs.

3.5. Analysis of the field samples of pigs naturally infected with Campylobacter

All *Campylobacter* of faecal and environmental samples from the different pig herds were identified as *C. coli* by conventional and real-time PCR assay.

3.6. Analysis of the Campylobacter colonies isolated from each positive sample for one pig

The concordance between the conventional PCR and the duplex real-time PCR for all the DNA extracted from pure cultures was of 100%.

4. Discussion and Conclusions

To our knowledge, this assay is the first report of the application of real-time quantitative PCR assays for the quantification of *C. jejuni* and *C. coli* directly in field samples containing a wide range of bacterial DNA amounts. The established *C. coli* and *C. jejuni* real-time PCR assays proved highly sensitive (with a quantitative detection limit of approximately 250 CFU/g of faeces) and linear over a range of seven to eight orders of magnitude, from 10^1 to 10^8 genome copies allowing a precise quantification of *C. coli* or *C. jejuni* DNA loads both in two different simplex reaction or in a single duplex PCR. . Nevertheless, these assays were able to detect lower amounts but with less reliability. Given that pigs are known to excrete

high quantity of one predominant species, especially *C. coli*, a reliable quantification of the two species directly in faecal samples required the use of the two simplex real-time PCR assays in different wells. The two simplex and the multiplex PCR were shown to be highly specific, since no PCR amplicons were detected when the method was applied to DNA from different bacterial reference strains, including different *Campylobacter* species, *Campylobacter*-related bacteria, and other enterobacteria. The identification at the species level and the quantification on all the DNA extracted from faecal and environmental samples is a new tool to enhance our understanding of the epidemiology of *Campylobacter*.

One of the major challenges in optimizing an assay for the detection for *Campylobacter* in faecal and environmental samples is overcoming the PCR-inhibitory components found in these complex substrates [42]. Faeces and environmental samples constitute complex biological samples due to the presence (i) of numerous types of bacteria, (ii) of different kinds of inhibitors [43, 44], or (iii) of food degradation products. Moreover, contrary to faecal and caecal chicken samples [45, 46], the consistency and the composition of pig faecal samples are highly variable and heterogeneous in the same way as for cattle faeces as described by Inglis and Kalischuck [47]. All these variables have an impact on the efficacy of DNA extraction and inhibitor removal. Consequently, a modified DNA extraction protocol associated with the use of an internal control was applied to all the examined samples in this study. The potential presence of PCR inhibitory compounds, the DNA yield and the reproducibility, important parameters when evaluating the DNA purification, were previously assessed with this approach for pig faecal and environmental samples. The modified sample preparation procedure described by Leblanc Maridor *et al.* [36], which included (i) a large volume of faeces (5g fresh weight), (ii) an ebullition step known to remove inhibitors of the

Taq polymerase [48], and (iii) the use of a DNA extraction kit, allow a better homogenization of the faeces and achieve partial removal of inhibitors. Moreover, to determine whether PCR inhibitors have been removed, the internal control was added to each sample before the extraction as described by Leblanc Maridor *et al.* [36].

Three culture-assay positive sample after enrichment were detected as negative by PCR, respectively one on 41 for *C. coli* real-time PCR assay and two on 26 for *C. jejuni* real-time PCR assay, leading to a sensitivity of 97.6% and 92.3%. Some explanations for these three discordant results can be proposed: some PCR primers are more markedly affected than others by impurities present in DNA preparations [49] which may reflect differences in the stability of genetic marker. Moreover, some *Campylobacter* strains do not release PCR-detectable DNA when boiled [50] and genetic variability among the isolates of *Campylobacter* species, which has been demonstrated previously [51, 52], can affect the efficacy of a PCR if changes occurs within one or both of the binding sites [53]. Finally, the enrichment in selective Preston broth enhanced *Campylobacter* detection but can selectively affect growth of *C. jejuni* and *C. coli*. In fact researchers have reported several cases in which *C. jejuni* signals detected by direct PCR disappeared after enrichment, whereas *C. coli* signals were maintained when present before enrichment, or else became detectable when absent before enrichment [21, 25, 30].

Furthermore, only one culture-assay negative sample was positive by real-time PCR for each target leading to a specificity of 96.2% for both *C. coli* and *C. jejuni* real-time PCR assays. These results can be due to the presence of viable but non culturable or dead bacteria cells. In fact, a major obstacle encountered with the current DNA-based tests is the separation of living

and dead microorganisms [54] because PCR detect all DNA of the extract from live as well as dead bacteria cells. Nevertheless, this particularity is also an advantage due to the ability of *Campylobacter* cells to enter a state that has been termed “viable but non culturable” (VBNC) [55], which represent a potentially infectious state [56]. The capacity of the real-time PCR to detect them is especially important in elucidating routes of infection. Ethidium monoazide (EMA) has recently been suggested as a means of distinguish viable and dead cells by reducing the PCR signal from DNA originating from dead bacterial cells [57, 58]. In 2005, Rudi *et al.* [58] have applied EMA/real-time PCR with success to detect and quantify different foodborne pathogens. Nevertheless, we have no information concerning the influence of the EMA on VBNC and the results of Flekna *et al.* [59] suggest that EMA influences not only dead but also viable cells of *C. jejuni* (DSMZ 4688) and seems to be a poor indicator of cell viability, at least as concerns the strains and incubation conditions tested.

Finally, we observed a good correlation at the quantitative level between culture numeration and quantitative PCR for both *C. coli* and *C. jejuni* real-time PCR assays ($R^2 = 0.90$ and $R^2=0.93$ respectively). This method provides a mean to identify and quantify at the species level *C. coli* and *C. jejuni* directly from faecal samples without requiring an enrichment step. The real time PCR assays described in this study have several advantages, allowing a large increase in throughput, enabling simultaneous processing of several samples (the real-time PCR can be run in a 96-well format and many steps in the assay can be automated), and reducing the total time requested for analysis.

According to the objectives of further epidemiological research, different strategies with the real-time PCR assays described can also be applied depending on the type of samples. In fact, the method developed in this study provides a mean to identify and quantify to the species level *C. coli* and *C. jejuni* (i) directly in complex samples with the two simplex assays, or (ii) in a duplex real-time PCR for bacterial culture or DNA extracted from isolated colonies.

Depending on the requests, one can use separately or simultaneously the quantitative real-time PCR assay for *Campylobacter spp.* (described by Leblanc Maridor *et al.* [36]), and/or the species-specific quantitative real-time PCR assays for *C. coli* or/and *C. jejuni*. If one needs to characterize at the species level some colonies from pure culture, the duplex real-time quantitative PCR assay described in this study allow not only the differentiation between *C. coli* and *C. jejuni* but also a DNA quantification in genome copy number, which could be useful for *Campylobacter* isolates from pig, poultry or human samples before a molecular analysis by genetic typing methods. The duplex real-time PCR will be able to identify *C. jejuni* and *C. coli* and to quantify the DNA extract rapidly and directly without any additional step like electrophoresis or spectrophotometer analysis for the DNA quantification.

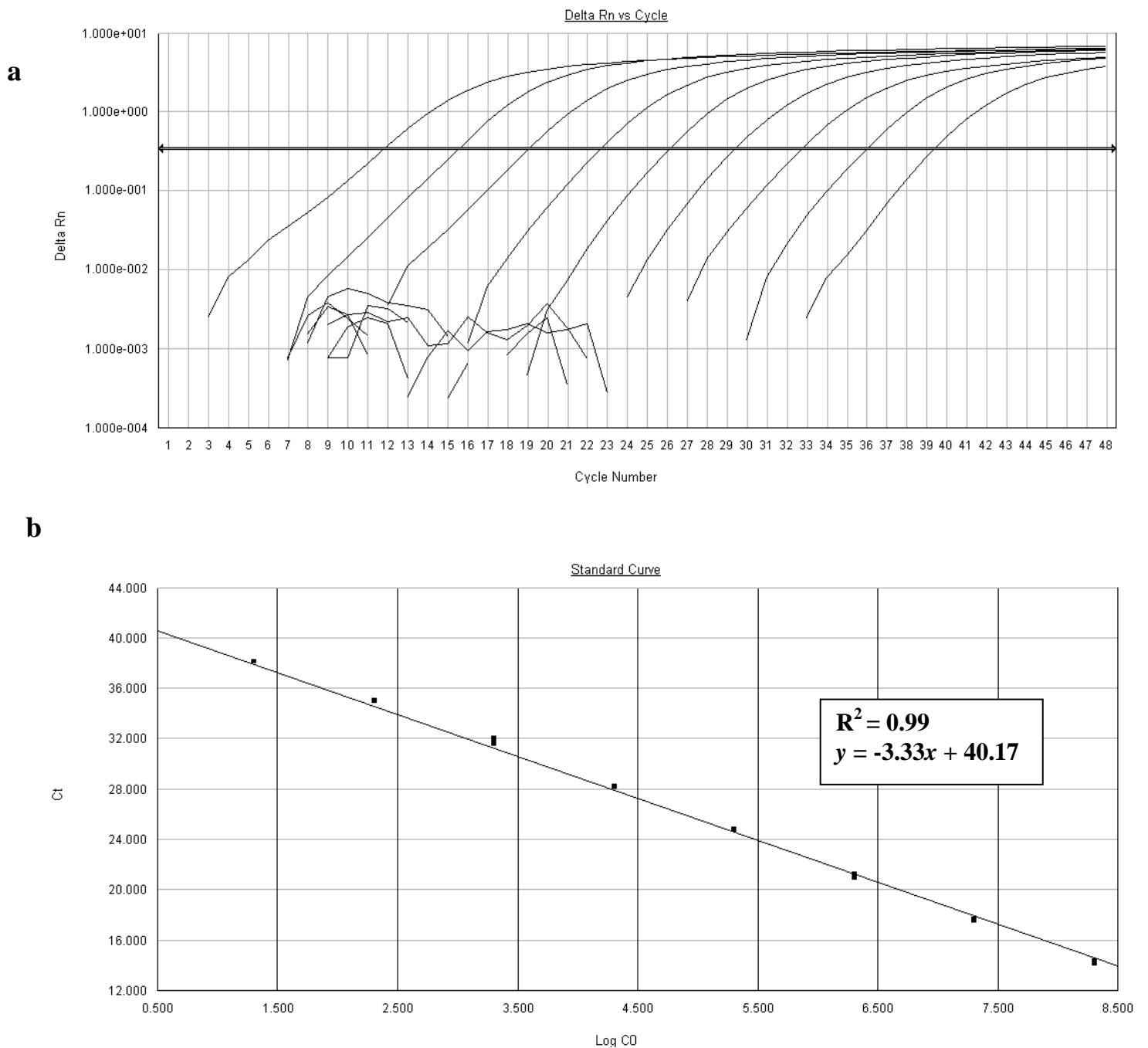


Figure 1

Dynamic range and sensitivity of the *C. coli* real-time PCR assay.

a-Detection of 10-fold serial dilution of *C. coli* standard DNA by the real-time Taqman assay performed in duplicate from 3×10^1 to 3×10^8 genome copies per PCR reaction. The fluorescence intensity (Delta Rn) is plotted vs cycle number.

b-Standard curve of these dilutions, each dot representing the result of duplicate amplification of each dilution. The coefficient of determination ($R^2 = 0.99$) and the slope of the regression curve ($y = -3.33x + 40.17$) are indicated. The standard curve is obtained by correlation of the threshold cycle values (Ct) and \log_{10} input plasmid copy number (Log CO) from the amplification plot.

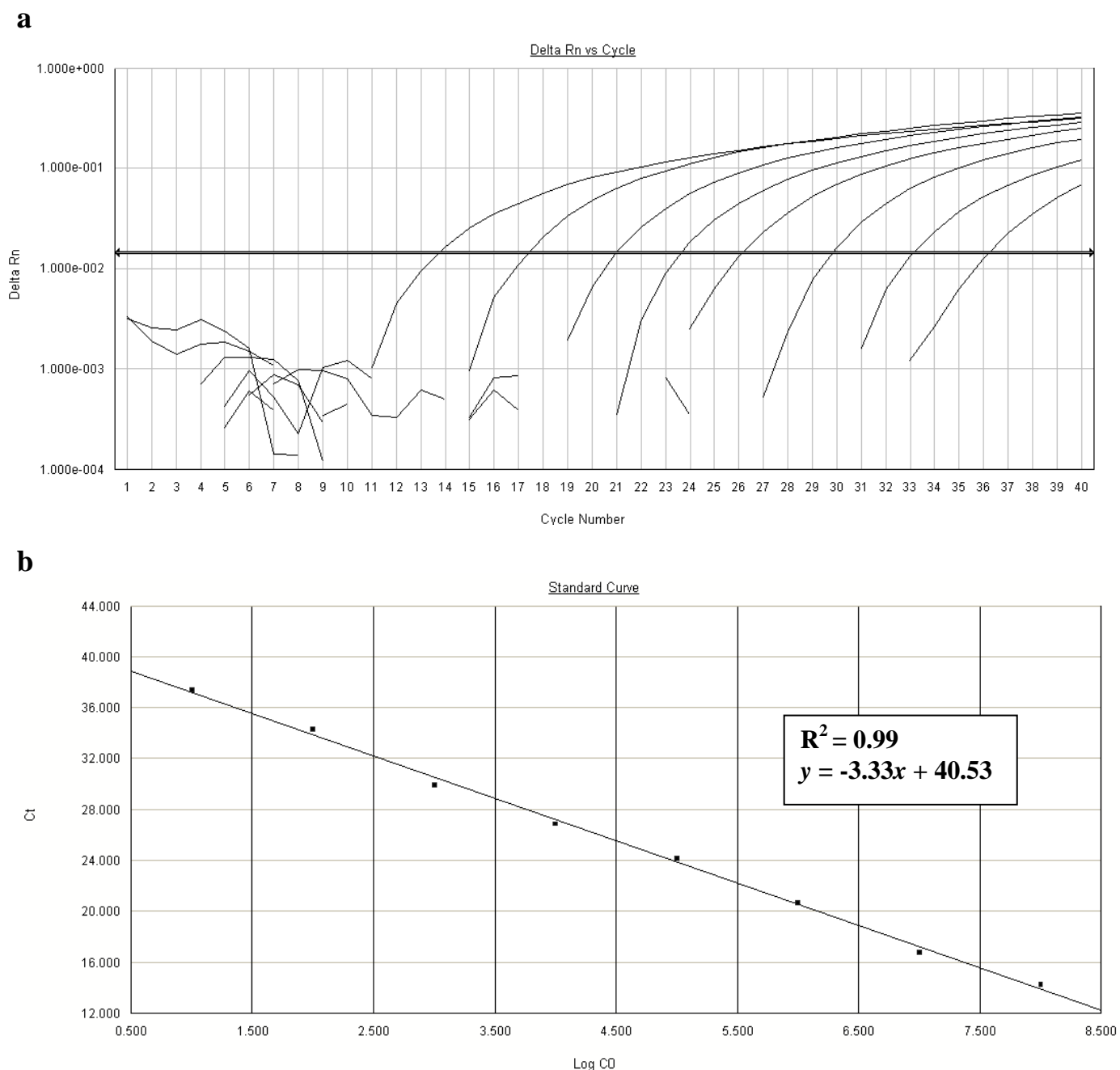


Figure 2

Dynamic range and sensitivity of the *C. jejuni* real-time PCR assay.

a-Detection of 10-fold serial dilution of *C. jejuni* standard DNA by the real-time Taqman assay performed in duplicate from 10^1 to 10^8 genome copies per PCR reaction. The fluorescence intensity (Delta Rn) is plotted vs cycle number.

b-Standard curve of these dilutions, each dot representing the result of duplicate amplification of each dilution. The coefficient of determination ($R^2 = 0.99$) and the slope of the regression curve ($y = -3.33x + 40.53$) are indicated. The standard curve is obtained by correlation of the threshold cycle values (Ct) and \log_{10} input plasmid copy number (Log CO) from the amplification plot.

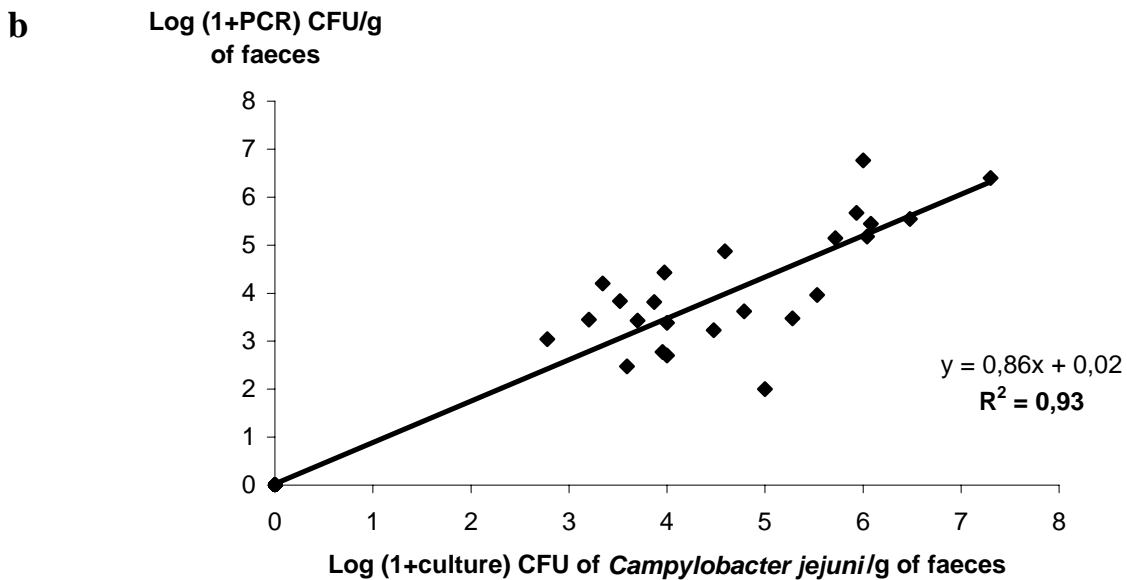
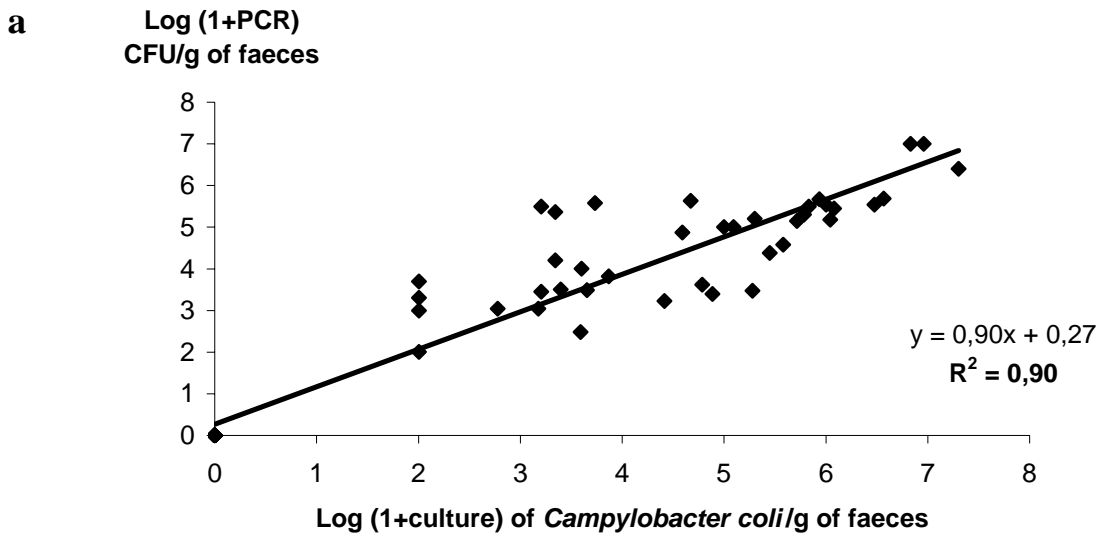


Figure 3

Scatter plot showing the differences and correlations between the real-time PCR and the microaerophilic culture method for the faecal samples of pigs experimentally infected with *Campylobacter* for the detection of *C. coli* (Figure 3a) and for the detection of *C. jejuni* (Figure 3b)

Data for *Campylobacter*-positive samples versus *Campylobacter*-negative samples by both methods fall close to the line equivalence:

a- $n=40$ and $n=25$ *Campylobacter*-positive and *Campylobacter*-negative samples respectively with a coefficient of correlation of 0.90 ($R^2=0.90$)

b- $n=24$ and $n=25$ *Campylobacter*-positive and *Campylobacter*-negative samples respectively with a coefficient of correlation of 0.93 ($R^2=0.93$).

Table 1. List of strains used for validation of specificity of the *C. coli* and *C. jejuni* real-time PCR assays. 77 isolates of *C. coli* and 54 isolates of *C. jejuni* were used for the evaluation of the reliability of the detection of the real-time PCR assays (verification both for each simplex real-time PCR assay and for the duplex real-time PCR assay). In parallel, 10 other *Campylobacter* species, 10 non-*Campylobacter* control strains, closed to the genus *Campylobacter*, 17 other enteric bacteria and 6 isolates of Internal Control were also tested for validate the specificity of the primers-probe sets.

Bacterial species (<i>n</i>)	Name or origin of strain	<i>C. coli</i> real-time PCR identification	<i>C. jejuni</i> real-time PCR identification
<i>Campylobacter coli</i> (2)	CCUG 11283, CIP 7081	Positive	Negative
<i>C. coli</i> pig isolates (25)	AFSSA, ENVN-INRA	Positive	Negative
<i>C. coli</i> poultry isolates (25)	AFSSA, ENVN-INRA	Positive	Negative
<i>C. coli</i> human isolates (25)	AFSSA, CNR-CH	Positive	Negative
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>jejuni</i> (4)	CCUG 11284, NCTC 11168, CIP 103726, NCTC 81176	Negative	Positive
<i>C. jejuni</i> poultry isolates (25)	AFSSA, ENVN-INRA	Negative	Positive
<i>C. jejuni</i> human isolates (25)	AFSSA, ENVN-INRA, CNR-CH	Negative	Positive
<i>Campylobacter fetus</i> subsp <i>fetus</i> (2)	CCUG 68231, CIP 2595396	Negative	Negative
<i>Campylobacter fetus</i> subsp <i>venerealis</i>	CCUG 33899	Negative	Negative
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	CCUG 14169	Negative	Negative
<i>Campylobacter lari</i> (3)	CCUG 23947, ATCC 35222, CIP 107080	Negative	Negative
<i>Campylobacter upsaliensis</i> (2)	CCUG 14913, CIP 400	Negative	Negative
<i>Campylobacter sputorum</i>	CIP 103749	Negative	Negative
<i>Helicobacter canis</i>	CIP 104753	Negative	Negative
<i>Helicobacter felis</i>	CIP 104382	Negative	Negative
<i>Helicobacter mustelae</i>	CIP 103759	Negative	Negative
<i>Helicobacter pullorum</i>	CIP 104787	Negative	Negative
<i>Helicobacter pylori</i> (3)	CIP 103995, CIP 26695, CIP 101260	Negative	Negative
<i>Wolinella succinogenes</i>	CCUG 13145	Negative	Negative
<i>Arcobacter butzleri</i>	CCUG 30485	Negative	Negative
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	CIP 104014	Negative	Negative
<i>Listeria monocytogenes</i> (3)	CIP 103575, ATCC 895807, ATCC 19115	Negative	Negative
<i>Listeria innocua</i> (3)	CCUG 15531, ENVN-INRA	Negative	Negative
<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>			
- serovar Enteritidis	ENVN-INRA	Negative	Negative
- serovar Typhimurium	ATCC 13311		
<i>Enterococcus faecalis</i> (2)	CIP 103013, CCUG 19916	Negative	Negative
<i>Escherichia coli</i>	V517	Negative	Negative
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)	ENVN-INRA	Negative	Negative
<i>Enterobacter aerogenes</i> (2)	ENVN-INRA	Negative	Negative
<i>Staphylococcus aureus</i> (2)	ENVN-INRA	Negative	Negative
Internal control		Negative	Positive
Internal control field isolates (5)		Negative	Positive

n, number of strains

NCTC, National Collection of Type Cultures (Colindale, UK); CCUG, Culture Collection University of Göteborg (Göteborg, Sweden); ATCC, American Type Culture Collection (Manassas, Va); CIP, Collection of the Pasteur Institut (Paris, France) AFSSA: Strains from the collection of the French Agency for Food Safety (Ploufragan, France); CNR-CH: Strains isolated from the collection of the French National Reference Center for *Campylobacter* and *Helicobacter* (Bordeaux, France); ENVN-INRA: Strains isolated from our inhouse collection

Table 2.

Variability analysis of the real-time PCR assay with DNA from the DNA standard curve (a) and with DNA extracted from spiked-negative faecal samples of pigs (b)

a	Genome copy number	Intra-assay ^{1a}		Inter-assay ^{2a}	
		CV _{coli} (%)	CV _{jejuni} (%)	CV _{coli} (%)	CV _{jejuni} (%)
	10 ⁸	2.27	5.63	4.89	1.94
	10 ⁷	1.33	0.95	4.69	0.83
	10 ⁶	1.99	1.13	3.42	1.37
	10 ⁵	1.60	0.57	4.08	0.67
	10 ⁴	0.81	0.35	1.52	2.65
	10 ³	1.28	0.53	1.90	1.99
	10 ²	1.22	0.40	2.46	1.39
	10 ¹	0.87	2.21	3.10	2.21

b	CFU of <i>Campylobacter</i> per gram of faeces	Intra-assay ^{1b}		Inter-assay ^{2b}	
		CV _{coli} (%)	CV _{jejuni} (%)	CV _{coli} (%)	CV _{jejuni} (%)
	2 x 10 ⁷	3.23	2.28	0.75	1.21
	2 x 10 ⁶	1.33	2.53	2.37	0.70
	2 x 10 ⁵	1.89	0.91	0.57	1.46
	2 x 10 ⁴	1.15	1.40	2.58	2.10
	2 x 10 ³	2.20	1.98	2.07	1.80
	2 x 10 ²	4.40	1.62	1.64	1.92

The coefficient of variation was determined for the Ct values (CV) from DNA standard curve (a) and for the estimated CFU of *Campylobacter* per gram of faeces extrapolated from the standard curve generated with spiked faecal samples (b), either for the *C. coli* real-time PCR (CV_{coli}) or for the *C. jejuni* real-time PCR (CV_{jejuni}).

^{1a} Mean: CV_{coli} 1.42%, CV_{jejuni} 1.47% ; values were obtained in 10 replicates for *C. coli* real-time PCR and for *C. jejuni* real-time PCR respectively (Table 3a: genome copy number)

^{2a} Mean: CV_{coli} 3.26%, CV_{jejuni} 1.63% ; values were obtained in 10 independent experiments for *C. coli* real-time PCR and for *C. jejuni* real-time PCR respectively (Table 3a)

^{1b} Mean: CV_{coli} 2.37%, CV_{jejuni} 1.79% ; values were obtained in 10 replicates for *C. coli* real-time PCR and for *C. jejuni* real-time PCR respectively (Table 3b: CFU of *Campylobacter* per gram of faeces)

^{2b} Mean: CV_{coli} 1.66%, CV_{jejuni} 1.53% ; values were obtained in 10 independent experiments for *C. coli* real-time PCR and for *C. jejuni* real-time PCR respectively (Table 3b)

Table 3

Comparison of real-time PCR and conventional microaerobic culture (direct plating and indirect plating after an enrichment step) in faecal samples of experimentally infected pigs (i) for the detection of *C. coli* (Table 3a) or (ii) for the detection of *C. jejuni* (Table 3b).

a		Microaerobic culture		
		+	-	Total
<i>Campylobacter coli</i> detection				
Real-time PCR	+	40	1	41
	-	1	25	26
	Total	41	26	67

b		Microaerobic culture		
		+	-	Total
<i>Campylobacter jejuni</i> detection				
Real-time PCR	+	24	1	25
	-	2	25	27
	Total	26	26	52

a Sensitivity Se=97.6%, Specificity Sp=96.2%, Kappa K=0.94

b Sensitivity Se=92.3%, Specificity Sp=96.2%, Kappa K=0.89

1. Friedman CR, Neimann J, Wegener HC, Tauxe RV: Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: *Campylobacter*. 2nd edition edn. Washington D.C., USA: ASM press; 2000: 121-138.
2. Allos BM: *Campylobacter jejuni* Infections: Update on Emerging Issues and Trends. *Clin Infect Dis* 2001, 32(8):1201-1206.
3. EFSA: The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006. In. Edited by THE EFSA Journal; 2007: 130.
4. Gally A, Bousquet V, Siret V, Prouzet-Mauleon V, Valk Hd, Vaillant V, Simon F, Strat YL, Megraud F, Desenclos J-C: Risk Factors for Acquiring Sporadic *Campylobacter* Infection in France: Results from a National Case-Control Study. *J Infect Dis* 2008, 197(10):1477-1484.
5. Gally A, Prouzet-Mauleon V, Kempf I, Lehours P, Labadi L, Camou C, Denis M, de Valk H, Desenclos JC, Megraud F: *Campylobacter* antimicrobial drug resistance among humans, broiler chickens, and pigs, France. *Emerg Infect Dis* 2007, 13(2):259-266.
6. Rivoal K, Ragimbeau C, Salvat G, Colin P, Ermel G: Genomic Diversity of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* Isolates Recovered from Free-Range Broiler Farms and Comparison with Isolates of Various Origins. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71(10):6216-6227.
7. Englen MD, Hill AE, Dargatz DA, Ladely SR, Fedorka-Cray PJ: Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* in US dairy cattle. *J Appl Microbiol* 2007, 102(6):1570-1577.
8. Keller J, Wieland B, Wittwer M, Stephan R, Perreten V: Distribution and genetic variability among *Campylobacter* spp. isolates from different animal species and humans in Switzerland. *Zoonoses Public Health* 2007, 54(1):2-7.
9. Munroe DL, Prescott JF, Penner JL: *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* serotypes isolated from chickens, cattle, and pigs. *J Clin Microbiol* 1983, 18(4):877-881.
10. Weijtens MJB, Reinders RD, Urlings HAP, Van der Plas J: *Campylobacter* infections in fattening pigs; excretion pattern and genetic diversity. *J Appl Microbiol* 1999, 86(1):63-70.
11. Payot S, Avrain L, Magras C, Praud K, Cloeckert A, Chaslus-Dancla E: Relative contribution of target gene mutation and efflux to fluoroquinolone and erythromycin resistance, in French poultry and pig isolates of *Campylobacter coli*. *Int J Antimicrob Agents* 2004, 23(5):468-472.
12. Boes J, Nersting L, Nielsen EM, Kranker S, Enoe C, Wachmann HC, Baggesen DL: Prevalence and diversity of *Campylobacter jejuni* in pig herds on farms with and without cattle or poultry. *J Food Prot* 2005, 68(4):722-727.

13. Jensen AN, Dalsgaard A, Baggesen DL, Nielsen EM: The occurrence and characterization of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in organic pigs and their outdoor environment. *Vety Microbiol* 2006, 116(1-3):96-105.
14. Oporto B, Esteban JI, Aduriz G, Juste RA, Hurtado A: Prevalence and strain diversity of thermophilic campylobacters in cattle, sheep and swine farms. *J Appl Microbiol* 2007, 103(4):977-984.
15. Harvey RB, Young CR, Ziprin RL, Hume ME, Genovese KJ, Anderson RC, Droleskey RE, Stanker LH, Nisbet DJ: Prevalence of *Campylobacter* spp isolated from the intestinal tract of pigs raised in an integrated swine production system. *J Am Vet Med Assoc* 1999, 215(11):1601-1604.
16. Young CR, Harvey R, Anderson R, Nisbet D, Stanker LH: Enteric colonisation following natural exposure to *Campylobacter* in pigs. *Res Vet Sci* 2000, 68(1):75-78.
17. Madden RH, Moran L, Scates P: Optimising recovery of *Campylobacter* spp. from the lower porcine gastrointestinal tract. *J Microbiol Methods* 2000, 42(2):115-119.
18. Jensen AN, Andersen MT, Dalsgaard A, Baggesen DL, Nielsen EM: Development of real-time PCR and hybridization methods for detection and identification of thermophilic *Campylobacter* spp. in pig faecal samples. *J Appl Microbiol* 2005, 99(2):292-300.
19. Steinhäuserová I, Cesková J, Fojtíková K, Obrovská I: Identification of thermophilic *Campylobacter* spp. by phenotypic and molecular methods. *J Appl Microbiol* 2001, 90(3):470-475.
20. Waino M, Bang DD, Lund M, Nordentoft S, Andersen JS, Pedersen K, Madsen M: Identification of campylobacteria isolated from Danish broilers by phenotypic tests and species-specific PCR assays. *J Appl Microbiol* 2003, 95(4):649-655.
21. Denis M, Soumet C, Rivoal K, Ermel G, Blivet D, Salvat G, Colin P: Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Lett Appl Microbiol* 1999, 29(6):406-410.
22. On SL, Jordan PJ: Evaluation of 11 PCR assays for species-level identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Clin Microbiol* 2003, 41(1):330-336.
23. Linton D, Lawson AJ, Owen RJ, Stanley J: PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *J Clin Microbiol* 1997, 35(10):2568-2572.
24. Debruyne L, Samyn E, De Brandt E, Vandenberg O, Heyndrickx M, Vandamme P: Comparative performance of different PCR assays for the identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Res Microbiol* 2008, 159(2):88-93.
25. Mateo E, Carcamo J, Urquijo M, Perales I, Fernandez-Astorga A: Evaluation of a PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni* and

- Campylobacter coli in retail poultry products. *Res Microbiol* 2005, 156(4):568-574.**
- 26. Keramas G, Bang DD, Lund M, Madsen M, Bunkenborg H, Telleman P, Christensen CBV: Use of Culture, PCR Analysis, and DNA Microarrays for Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Chicken Feces. *J Clin Microbiol* 2004, 42(9):3985-3991.**
 - 27. Nogva HK, Bergh A, Holck A, Rudi K: Application of the 5'-Nuclease PCR Assay in Evaluation and Development of Methods for Quantitative Detection of *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 2000, 66(9):4029-4036.**
 - 28. Best EL, Powell EJ, Swift C, Grant KA, Frost JA: Applicability of a rapid duplex real-time PCR assay for speciation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* directly from culture plates. *FEMS Microbiol Lett* 2003, 229(2):237-241.**
 - 29. Abu-Halaweh M, Bates J, Patel BK: Rapid detection and differentiation of pathogenic *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by real-time PCR. *Res Microbiol* 2005, 156(1):107-114.**
 - 30. Sails AD, Fox AJ, Bolton FJ, Wareing DR, Greenway DL: A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Appl Environ Microbiol* 2003, 69(3):1383-1390.**
 - 31. Yang C, Jiang Y, Huang K, Zhu C, Yin Y: Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003, 38(3):265-271.**
 - 32. Inglis GD, Kalischuk LD: Direct Quantification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter lanienae* in Feces of Cattle by Real-Time Quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70(4):2296-2306.**
 - 33. Rudi K, Hoidal HK, Katla T, Johansen BK, Nordal J, Jakobsen KS: Direct Real-Time PCR Quantification of *Campylobacter jejuni* in Chicken Fecal and Cecal Samples by Integrated Cell Concentration and DNA Purification. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70(2):790-797.**
 - 34. Lagier MJ, Joseph LA, Passaretti TV, Musser KA, Cirino NM: A real-time multiplexed PCR assay for rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Mol Cell Probes* 2004, 18(4):275-282.**
 - 35. Persson S, Olsen KEP: Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *J Med Microbiol* 2005, 54(11):1043-1047.**
 - 36. Leblanc Maridor M, Denis M, Lalande F, Beaurepaire B, Cariolet R, Fravallo P, Federighi M, Seegers H, Belloc C: Experimental infection of specific pathogen-free pigs with *Campylobacter*: excretion in faeces and transmission to non-inoculated pigs. *Vet Microbiol* 2008, 131(3-4):309-317.**

37. **Kutyavin IV, Lukhtanov EA, Gamper HB, Meyer RB: Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization. *Nucleic Acids Res* 1997, 25(18):3718-3723.**
38. **Kuzio S, Hanguelhard A, Morelle M, Ronsin C: Rapid screening for HLA-B27 by a TaqMan-PCR assay using sequence-specific primers and a minor groove binder probe, a novel type of TaqMan™ probe. *J Immunol Methods* 2004, 287((1-2)):179-186.**
39. **Yao Y, Nellåker C, Karlsson H: Evaluation of minor groove binding probe and Taqman probe PCR assays: Influence of mismatches and template complexity on quantification. *Mol Cell Probes* 2006, 20(5):311-316.**
40. **Stelzl E, Muller Z, Marth E, Kessler HH: Rapid Quantification of Hepatitis B Virus DNA by Automated Sample Preparation and Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 2004, 42(6):2445-2449.**
41. **Fleiss J: Statistical Methods for Rates and Proportions. New York; 1981.**
42. **Rasmussen HN, Olsen JE, Jorgensen K, Rasmussen OF: Detection of *Campylobacter jejuni* and *Camp. coli* in chicken faecal samples by PCR. *Lett Appl Microbiol* 1996, 23(5):363-366.**
43. **Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, Cabrita J, Megraud F: Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol* 1997, 35(4):995-998.**
44. **Koonjul PK, Brandt WF, Farrant JM, Lindsey GG: Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA. *Nucl Acids Res* 1999, 27(3):915-916.**
45. **Lund M, Nordentoft S, Pedersen K, Madsen M: Detection of *Campylobacter* spp. in Chicken Fecal Samples by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 2004, 42(11):5125-5132.**
46. **Skanseng B, Kaldhusdal M, Rudi K: Comparison of chicken gut colonisation by the pathogens *Campylobacter jejuni* and *Clostridium perfringens* by real-time quantitative PCR. *Mol Cell Probes* 2006, 20(5):269-279.**
47. **Inglis GD, Kalischuk LD: Use of PCR for Direct Detection of *Campylobacter* Species in Bovine Feces. *Appl Environ Microbiol* 2003, 69(6):3435-3447.**
48. **Schunck B, Kraft W, Truyen U: A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. *J Virol Methods* 1995, 55(3):427-433.**
49. **Kitchin PA, Bootman JS: Quality Control of the Polymerase Chain Reaction. *Rev Med Virol* 1993, 3(2):107-114.**
50. **Mohran ZS, Guerry P, Lior H, Murphy JR, el-Gendy AM, Mikhail MM, Oyfo BA: Restriction fragment length polymorphism of flagellin genes of**

- Campylobacter jejuni and/or C. coli isolates from Egypt. *J Clin Microbiol* 1996, 34(5):1216-1219.**
- 51. Ragimbeau C, Salvat G, Colin P, Ermel G: Development of a multiplex PCR gene fingerprinting method using gyrA and pflA polymorphisms to identify genotypic relatedness within Campylobacter jejuni species. *J Appl Microbiol* 1998, 85(5):829-838.**
 - 52. On SL, Nielsen EM, Engberg J, Madsen M: Validity of SmaI-defined genotypes of Campylobacter jejuni examined by SallI, KpnI, and BamHI polymorphisms: evidence of identical clones infecting humans, poultry, and cattle. *Epidemiol Infect* 1998, 120(3):231-237.**
 - 53. On SL: Identification methods for campylobacters, helicobacters, and related organisms. *Clin Microbiol Rev* 1996, 9(3):405-422.**
 - 54. McKillip JL, Jaykus LA, Drake M: Nucleic acid persistence in heat-killed Escherichia coli O157 : H7 from contaminated skim milk. *J Food Protect* 1999, 62(8):839-844.**
 - 55. Rollins DM, Colwell RR: Viable but nonculturable stage of Campylobacter jejuni and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl Environ Microbiol* 1986, 52(3):531-538.**
 - 56. Pearson AD, Greenwood M, Healing TD, Rollins D, Shahamat M, Donaldson J, Colwell RR: Colonization of broiler chickens by waterborne Campylobacter jejuni. *Appl Environ Microbiol* 1993, 59(4):987-996.**
 - 57. Nogva HK, Dromtorp SM, Nissen H, Rudi K: Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques* 2003, 34(4):804-808, 810, 812-803.**
 - 58. Rudi K, Moen B, Dromtorp SM, Holck AL: Use of Ethidium Monoazide and PCR in Combination for Quantification of Viable and Dead Cells in Complex Samples. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71(2):1018-1024.**
 - 59. Flekna G, Stefanic P, Wagner M, Smulders FJM, Mozina SS, Hein I: Insufficient differentiation of live and dead Campylobacter jejuni and Listeria monocytogenes cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/real-time PCR. *Res Microbiol* 2007, 158(5):405-412.**

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de mise au point d'une méthode de quantification et de discrimination rapide des espèces majeures de *Campylobacter* à l'aide d'une méthode de biologie moléculaire s'inscrit dans un contexte de production de connaissances en vue de l'étude du portage de *Campylobacter* en élevage porcin. Le projet à venir est de préciser les mécanismes de transmission expliquant la dynamique d'infection par *Campylobacter* en élevage. Outre les gains en rapidité et l'absence de manipulation pour la lecture (diminution des risques de contamination post-PCR), la PCR temps réel (technologie TaqMan®) permet d'associer spécificité et quantification.

Ces techniques de PCR quantitative en temps réel ont ainsi été validées sur des échantillons de matières fécales contaminées avec des quantités connues de bactéries, puis sur des échantillons de matières fécales prélevés sur des porcs Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiques (EOPS) inoculés expérimentalement avec différentes souches connues de *Campylobacter* (Chapitre III), enfin sur des animaux naturellement infectés provenant d'élevages conventionnels différents et à différents stades de croissance. Cette étape de validation de méthode était un préalable indispensable pour pouvoir ensuite utiliser ces techniques de PCR quantitative en temps réel pour décrire les modalités de la cinétique d'excrétion de *Campylobacter* en élevage porcin conventionnel (Chapitre V). Dans un premier temps, il s'agira de quantifier l'excrétion de *Campylobacter* (durée et intermittence éventuelle) avec la PCR spécifique du genre comprenant un témoin bactérien interne d'extraction et d'amplification garantissant la fiabilité des résultats, en particulier pour des matrices complexes telles que les matières fécales ou les prélèvements environnementaux.

Dans un second temps, il s'agira alors de décrire cette excrétion en discriminant et en quantifiant les principales espèces de *Campylobacter*, à savoir *Campylobacter coli* et *Campylobacter jejuni*, avec les deux techniques PCR mises au point et validées. Au final, ces techniques permettront d'évaluer la durée d'excrétion, l'existence éventuelle d'une intermittence, la variabilité de la quantité excrétée (données quantitatives) et les espèces excrétées (données qualitatives), ce notamment lors d'enquêtes épidémiologiques en élevage porcin. Du fait de leurs qualités intrinsèques, ces tests pourront également être appliqués à d'autres matrices.

ANNEXE 1

CARACTERISTIQUES CULTURALES DES PRINCIPALES ESPECES DE *CAMPYLOBACTER SPP.* THERMOTOLERANTS D'INTERET EN SECURITE DES ALIMENTS (d'après Corry *et al.*, 1995)

	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Aspect en microscopie optique de contraste	Formes spiralées de 1-1.5 µm de long et de 0.4-0.5 µm d'amplitude			
Caractéristiques de l'incubation	Incubation de 24 à 48 heures en milieu microaérophile à une température		Incubation de 48 à 72 heures à une température optimale de 37°C	
	La croissance est impossible à 25°C			
Caractéristiques phénotypiques des colonies	Colonies de 1 à 2 mm de diamètre, rondes, bombées, brillantes, de couleur grise, opaques en leur centre et translucides sur leurs bords Possibilité de colonies lisses et plates		Colonies de 0.5 à 1 mm de diamètre, bombées, lisses, de couleur grise, translucides	

CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES DES PRINCIPALES ESPECES DE *CAMPYLOBACTER SPP.* THERMOTOLERANTS D'INTERET EN SECURITE DES ALIMENTS (d'après Pilet *et al.*, 1997).

<i>Campylobacter spp.</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	
Catalase	+	+	+	- ou faible	
Sulfure d'hydrogène sur agar-TSI	-	-	-	-	
Hydrolyse de l'hippurate	+	-	-	-	
Uréase	-	-	-	-	
Nitrate réductase	+	+	+	+	
Tests de tolérance	25°C	-	-	-	
	42°C	+	+	+	
	Glycine à 1%	+	+	+	V
	NaCl à 3.5%	-	-	-	-
	Anaérobiose	-	-	+	-
Sensibilité aux antibiotiques	Acide nalidixique (disque de 30µg)	V	V	R	S
	Céphalosporines	R	R	R	S

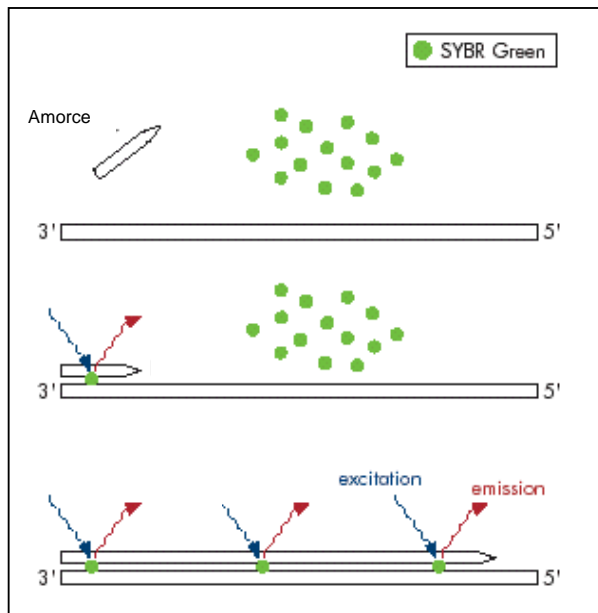
Légende: +, colonies le plus souvent positives ; -, colonies le plus souvent négatives
V, réactions variables ; S, sensible (zone d'inhibition > 6mm) ; R, résistant (pas de zone d'inhibition)

ANNEXE 2

Systèmes de détection des produits PCR lors d'une PCR quantitative en temps réel

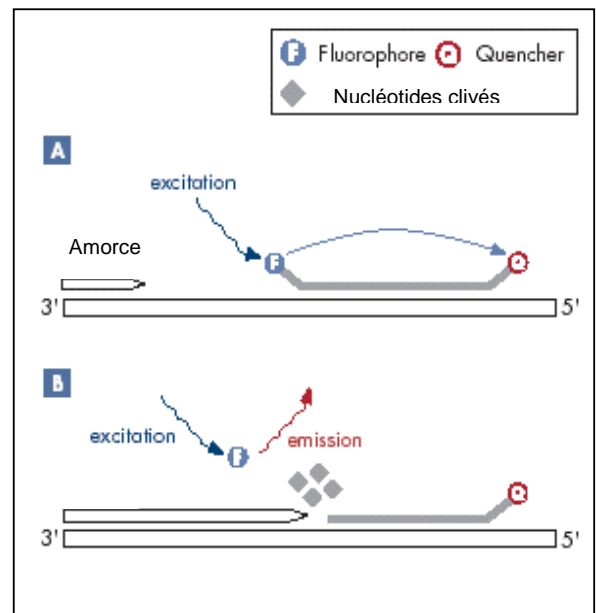
Principe de la technologie SyBR Green :

Utilisation de molécules se liant non spécifiquement à l'ADN



Principe de la technologie Taqman :

Utilisation de sondes d'hydrolyse type Taqman®



CHAPITRE III :

DESCRIPTION DE LA CINETIQUE

D'EXCRETION DE *CAMPYLOBACTER*

CHEZ DES PORCS EOPS

EXPERIMENTALEMENT INFECTES

1. CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE

De précédentes études ont établi la fréquence élevée du portage asymptomatique de *Campylobacter* dans les élevages porcins (prévalence entre 50% et 100%) et l'importance des quantités excrétées (de 10^2 à 10^7 Unités Formant Colonies de *Campylobacter* par gramme de matières fécales (UFC/g MF)) (Munroe *et al.*, 1983 ; Weijtens *et al.*, 1993 ; Jensen *et al.*, 2006 ; EFSA, 2007 ; Oporto *et al.*, 2008).

Dans la plupart des travaux conduits en Europe, *C. coli* est plus fréquemment isolé que les autres *Campylobacter* (Weijtens *et al.*, 1999 ; Payot *et al.*, 2004 ; EFSA, 2007). Seules deux études américaines ont mis en évidence une prédominance de *C. jejuni* en élevage porcine (Harvey *et al.*, 1999 ; Young *et al.*, 2000) mais la co-existence chez le porc de *C. coli* avec plusieurs espèces de *Campylobacter* dont *C. jejuni* est souvent observée (Madden *et al.*, 2000 ; Jensen *et al.*, 2006 ; Keller *et al.*, 2007 ; Oporto *et al.*, 2008).

La prévalence du portage et la quantité de *Campylobacter* excrétée semblent diminuer avec l'âge des animaux au cours de l'engraissement, comme le montrent les études de Weijtens *et al.* (1993). Certains animaux peuvent même présenter ponctuellement une absence d'excrétion au cours de l'élevage (Weijtens *et al.*, 1999) ou au moins une excrétion non détectable avec les méthodes utilisées. Cette cinétique d'excrétion est cependant variable selon les conditions d'élevage, ainsi Alter *et al.* (2005) n'observent pas de diminution de la prévalence ni du niveau d'excrétion.

Toutes ces observations suggèrent plusieurs possibilités pouvant expliquer la persistance des *Campylobacter* (Belloc *et al.*, 2004), comme par exemple :

- Un défaut de sensibilité de la méthode de détection,
- Une succession de phases d'élimination et de recontamination des porcs à partir de leurs matières fécales, de celles des autres porcs et/ou à partir d'autres sources de *Campylobacter* présentes dans l'environnement,
- Une excrétion intermittente de *Campylobacter*, comme l'envisagent Von Altrock *et al.* (2006) et comme cela a pu être observé sur des souris par Lee *et al.* (1986).

On entend par « excrétion intermittente », le fait que les animaux soient toujours porteurs mais n'excrètent plus la bactérie (absence de détection dans les matières fécales). Cependant, à la faveur d'un facteur, comme par exemple un stress lié au transport des animaux, ils peuvent ré-excréter la bactérie, cette dernière sera alors détectée dans leurs matières fécales. Cette excrétion intermittente est observée chez les porcs pour *Salmonella*. En effet, les salmonelles sont présentes dans le tractus digestif des porcs et les animaux excrètent la bactérie de façon intermittente dans leurs matières fécales sans manifester de signes cliniques (Nielsen *et al.*, 1995 ; Berends *et al.*, 1996). Les porcs porteurs (non excréteurs) peuvent ré-excréter la bactérie sous l'influence d'un stress (sevrage, allotement, transport vers l'abattoir), d'une modification de la flore intestinale ou d'une dépression de leur système immunitaire (par une autre maladie par exemple) (Kranker *et al.*, 2003).

Concernant la cinétique d'excrétion de *Campylobacter* dans les matières fécales des porcs (durée et intermittence de l'excrétion, variation dans le temps de la quantité de *Campylobacter* présents dans les matières fécales, description de la variabilité des souches excrétées simultanément et à différents moments), les études épidémiologiques sont peu nombreuses et visent souvent à déterminer la prévalence du portage à différents stades d'élevage ou dans certains cas à évaluer les modalités de contamination des animaux. Les données relevées sur le terrain sont difficiles à interpréter étant donné l'absence de contrôle des différents paramètres de l'élevage tels que les déplacements des animaux, de l'éleveur et éventuellement des autres intervenants ainsi que les facteurs exogènes entrants comme l'aliment, l'eau, l'air et éventuellement les nuisibles ou les animaux sauvages.

Ainsi pour pouvoir interpréter les données relevées sur le terrain, il est intéressant de générer des données plus fondamentales en conditions contrôlées dans le cadre d'une approche par infection expérimentale. Cette expérimentation animale permettra d'une part de valider les méthodes d'étude avant de les appliquer en élevage et d'autre part de décrire les modalités de la cinétique d'excrétion de *Campylobacter* dans les matières fécales des porcs en conditions contrôlées.

Notre étude vise, au travers d'une expérimentation animale où des souches de *Campylobacter* d'origines différentes (*C. coli* d'origine porcine, *C. coli* et *C. jejuni* d'origine aviaire) sont inoculées, seules ou en association, à des porcs Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiques (EOPS), à préciser le portage et la cinétique d'excrétion de cette bactérie dans des conditions contrôlées. Les méthodes de biologie moléculaire mises au point

lors de la première étape (présentées dans le chapitre II) seront ainsi appliquées et validées sur les prélèvements de matières fécales issues de l'expérimentation animale.

Cette étude sur une durée de 80 jours post-inoculation permettra ainsi de déterminer les quantités excrétées dans les matières fécales, d'évaluer la durée d'excrétion, la souche excrétée et, si elles existent, de mettre en évidence des intermittences de l'excrétion. De plus, la transmission de *Campylobacter* sera évaluée en observant l'excrétion des porcs « contacts », animaux non inoculés, logés dans un parc adjacent à celui des animaux inoculés.

Cet essai a également pour but de valider les méthodes d'identification quantitative mises au point (PCR en temps réel présentées dans le chapitre II) ainsi que les méthodes de typage génétique choisies pour décrire la variabilité des souches excrétées en élevage porcin (la PCR-RFLP sur le gène *flaA* et la macrorestriction génomique suivie d'une électrophorèse en champ pulsé (RFLP-PFGE) présentées ultérieurement dans le chapitre IV).

2. ARTICLE 3 : INFECTION EXPERIMENTALE DE PORCS EOPS

Experimental infection of Specific-Pathogen-Free pigs with *Campylobacter*: excretion in faeces and transmission to non-inoculated pigs

Leblanc Maridor Mily^{*a}, Denis Martine^b, Lalande Françoise^b, Beaurepaire Bernard^c, Cariolet Roland^c, Fravallo Philippe^b, Federighi Michel^d, Seegers Henri^a, Belloc Catherine^a

^aINRA, Veterinary School, Research group on Bio-aggression, Epidemiology and Risk Analysis in Animal Health, UMR 1300, BP 40706, 44307 Nantes Cedex 03, France

^bAFSSA, French Agency for Food Safety, Pig and Poultry Veterinary Research laboratory, Hygiene and Quality of poultry and Swine Products Research Unit, BP53, 22440 Ploufragan, France

^cAFSSA, French Agency for Food Safety, Service de Production de Porcs Assainis et d'Expérimentation, BP53, 22440 Ploufragan, France

^dINRA, Veterinary School, Unit of Food Safety, UMR 1014 SECALIM ENVN/ENITIAA, BP 40706, 44307 Nantes Cedex 03, France

Article publié dans *Veterinary Microbiology*

Leblanc Maridor M., Denis M., Lalande F., Beaurepaire B., Cariolet R., Fravallo P., Federighi M., Seegers H., Belloc C. 2008. Experimental infection of specific pathogen-free pigs with *Campylobacter*: Excretion in faeces and transmission to non-inoculated pigs. Vet. Microbiol. 131 (3-4) : 309-317.



Experimental infection of specific pathogen-free pigs with *Campylobacter*: Excretion in faeces and transmission to non-inoculated pigs

Mily Leblanc Maridor^{a,*}, Martine Denis^b, Françoise Lalande^b,
Bernard Beaurepaire^c, Roland Cariolet^c, Philippe Fravallo^b,
Michel Federighi^d, Henri Seegers^a, Catherine Belloc^a

^aINRA, Veterinary School, Unit of Bio-aggression, Epidemiology and Risk Analysis in Animal Health, UMR 1300, BP 40706, 44307 Nantes Cedex 03, France

^bAFSSA, French Agency for Food Safety, Pig and Poultry Veterinary Research Laboratory, Hygiene and Quality of Poultry and Swine Products Research Unit, BP 53, 22440 Ploufragan, France

^cAFSSA, French Agency for Food Safety, Service de Production de Porcs Assainis et d'Expérimentation, BP 53, 22440 Ploufragan, France

^dINRA, Veterinary School, Unit of Food Safety, UMR 1014, BP 40706, 44307 Nantes Cedex 03, France

Received 18 January 2008; received in revised form 4 April 2008; accepted 10 April 2008

Abstract

Campylobacter species are leading agents of human bacterial gastroenteritis and consumption of food of animal origin is a major source of infection. Although pigs are known to frequently exhibit high counts of *Campylobacter* in their faeces, more information is needed about the dynamics of this excretion. An experimental trial was conducted to evaluate the faecal excretion of *Campylobacter* by 7-week-old specific pathogen-free piglets inoculated *per os* with three *Campylobacter* strains (one *C. coli* isolated from a pig, one *C. coli* and one *C. jejuni* from chickens) alone or simultaneously (5×10^7 CFU/strain). Non-inoculated pigs were housed in adjacent pens. Pigs were monitored for 80 days for clinical signs and by bacteriological analysis of faeces. Pigs inoculated with porcine *C. coli* or with a mix of the three strains excreted from 10^3 to 10^6 CFU/g of faeces with a slight decrease at the end of the trial. Animals inoculated with poultry *C. coli* or *C. jejuni* strain excreted a lower quantity and some of them stopped excreting. At the end of the trial, only *C. coli* was detected in the faeces of pigs inoculated simultaneously with the three bacteria. Moreover, the transmission of *Campylobacter* was noticed between pens for the two *C. coli* strains and all the neighbouring animals became shedders with a level of excretion similar to the inoculated pigs. Intermittence in the *Campylobacter* excretion was also observed. Finally, our study highlighted a host preference of *Campylobacter*, namely *C. coli* seems to have a higher colonization potential for pigs than *C. jejuni*.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Campylobacter*; Pigs; Faecal excretion; Experimental infection

* Corresponding author. Tel.: +33 2 40 68 76 52; fax: +33 2 40 68 77 68.

E-mail address: leblanc@vet-nantes.fr (M. Leblanc Maridor).

1. Introduction

Campylobacter, a major cause of food-borne gastroenteritis, is commonly carried in the intestinal tract of a wide range of birds and mammals, including food production animals and pets, without causing clinical signs (Petersen et al., 2001; Moore et al., 2005; Englen et al., 2007; Keller et al., 2007). Recently, the 2003/99/CE directive on the monitoring of zoonoses and zoonotic pathogens has forced the European Union Member States to collect relevant and comparable data on these agents. Pigs seem to be a natural reservoir of *Campylobacter* species with a prevalence of infection between 50 and 100% and excretion levels ranging from 10^2 to 10^7 bacteria/g of faeces (Nielsen et al., 1997; Weijtens et al., 1997; Von Altrock et al., 2006). Variable counts of *Campylobacter* in the faeces were observed and a possible intermittent excretion was suggested by Weijtens et al. (1999). *Campylobacter coli* has been shown to be the predominant species carried by pigs (Payot et al., 2004; Alter et al., 2005; Thakur and Gebreyes, 2005). Nevertheless, one study found a high prevalence of *Campylobacter jejuni* on an American farm (Young et al., 2000) and *C. jejuni* may co-exist with *C. coli* in pigs (Madden et al., 2000; Jensen et al., 2005). However, these findings were based on small sample sizes and often concerned only one or few farms with occasional sampling schemes. Better knowledge of the dynamics of excretion of *Campylobacter* in pig faeces is thus necessary to understand the way of transmission and dissemination of this bacterium.

The aims of the present study are to describe *Campylobacter* excretion in pigs under controlled conditions after experimental infection of specific pathogen-free (SPF) piglets and to assess the possible transmission to pigs housed in adjacent pens. The preferential infection of pigs in the field with *C. coli* suggests a differential capacity of *Campylobacter* species/strains to successfully colonize the digestive tract of pigs. To assess this, the experimental infection was carried out using *C. coli* strains of two origins (poultry and porcine) and *C. jejuni*. Furthermore, we were interested in studying the possible co-existence of different *Campylobacter* strains and/or species in pigs. The experiment thus included animals inoculated with the three strains in a mix.

2. Materials and methods

2.1. *Campylobacter* strains and inoculum preparation

Three *Campylobacter* field strains, stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ in glycerol peptone broth, were used in this experiment. One *C. coli* strain was isolated from faeces of pigs collected in a French slaughterhouse. The other strains, one *C. coli* and one *C. jejuni*, were obtained from caeca of standard broilers from two different French slaughterhouses. These strains will be hereafter referred to as “porcine *C. coli*”, “poultry *C. coli*” and *C. jejuni*, respectively. These strains were differentiated by their pulsed field gel electrophoresis (PFGE) patterns.

For pig inoculation, *Campylobacter* culture was performed on Karmali plates in a micro-aerophilic atmosphere (7% O_2 , 10% CO_2 and 83% N_2) for 24 h at a temperature of $41.5\text{ }^\circ\text{C}$. Colonies were suspended in 50 ml of sterile Brucella broth and cultivated for 16 h in the same conditions as mentioned above in order to obtain a solution of 5×10^8 CFU of *Campylobacter*/ml for each strain in broth. One millilitre of each culture was diluted in 9 ml of tryptone salt medium in order to obtain an inoculum of 10 ml containing 5×10^7 CFU of *Campylobacter* for a pig.

2.2. Animal samples and experimental design of the trial

Specific pathogen-free 7-week-old Large White piglets were obtained from the high-security barn at the French Agency of Food Safety located in Ploufragan (France). Pigs were housed and treated in accordance with the regulations of the local veterinary office (Direction des Services Vétérinaires des Côtes d’Armor, France). All the animals were reared in isolation rooms with controlled airflow and the experiment was carried out in standardized conditions (Cariolet et al., 2004).

Twenty-one SPF piglets were distributed into seven groups of three animals (Fig. 1). One group of three piglets was kept as negative controls and placed in a separate unit (one unit corresponding to one room) (Unit number 4, Pen g). The 18 other piglets were placed in three separate units (Unit numbers 1–3) each including two pens with three animals each. In Unit 1,

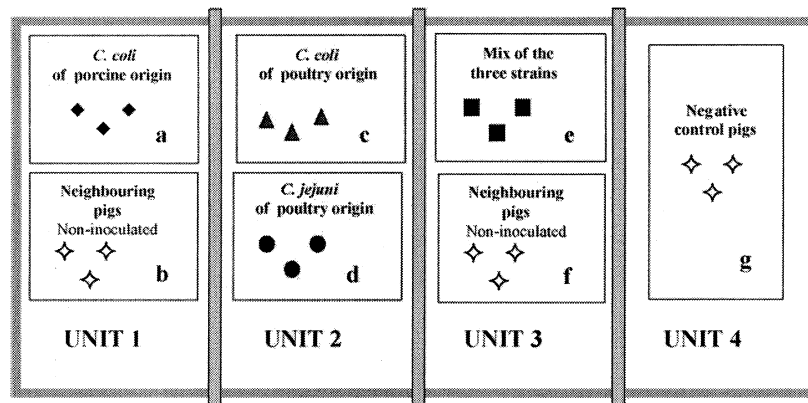


Fig. 1. Experimental design of the trial. Unit 1—Pen a: pen with three pigs inoculated with the porcine *C. coli* strain (◆) and Pen b: pen with three non-inoculated pigs (◇); Unit 2—Pen c: pen with three pigs inoculated with the poultry *C. coli* strain (▲) and Pen d: pen with three pigs inoculated with the poultry *C. jejuni* strain (●); Unit 3—Pen e: pen with three pigs inoculated with a mix of the three strains (■) and Pen f: pen with three neighbouring non-inoculated pigs; Unit 4—Pen g: pen with the three negative control non-inoculated pigs.

three pigs in Pen a were orally inoculated each with 10 ml of tryptone salt medium containing 5×10^7 CFU of porcine *C. coli*. In Pen b, three animals received the same volume of tryptone salt medium without bacteria. The sham-inoculated pigs will be referred to as “neighbouring pigs” hereafter. Unit 2 consisted of a pen of piglets inoculated each with 5×10^7 CFU of poultry *C. coli* (Pen c) and the second pen of piglets inoculated each with 5×10^7 CFU of *C. jejuni* (Pen d). Unit 3 included a pen of piglets inoculated each with a mix of the three strains ($(3 \times 5) \times 10^7$ CFU) (Pen e) and a pen with three neighbouring animals treated with the same volume of tryptone salt medium without bacteria (Pen f). Finally, strict rules of circulation were established to avoid transmission of *Campylobacter* between units (clean material for each pen, floor washed before any sampling, hands and feet washed before and after the sampling). Inside a given unit, non-inoculated pigs were always manipulated at first. In the Unit 2, *C. jejuni*-inoculated pigs were manipulated before *C. coli*-inoculated pigs. Moreover, the animal handler manipulated the group of piglets kept as negative controls and housed in a separate unit at the end of each sampling time.

2.3. Clinical examination

Piglets were monitored daily after inoculation to check for clinical signs of disease (rectal tempera-

ture and general inspection), notably diarrhoea. Body weight and food consumption were measured twice a week to assess growth performances. If clinical signs like fever or diarrhoea were observed, bacterial investigations were planned in order to determine the etiology. Moreover, in case of mortality, it was planned to carry out a necropsic examination and to collect samples for bacterial investigations. The pigs were examined this way for 80 days after inoculation.

2.4. Collection of faecal and environmental samples

Before inoculation, faecal samples and environmental samples from each pen were analysed to confirm that piglets were free of *Campylobacter*. For the environment, swabs were collected from each pen and from the floor and walls around each pen in each unit the day before the inoculation of pigs. Each week, swabs were sampled on the air filter in each unit to detect *Campylobacter* in the air and feed samples were taken in the feed storage room. After inoculation, faecal samples of pigs were collected individually once a week from pigs aged 7–16 weeks and were cultured within 4 h after sampling. At the end of the experiment, the pigs were slaughtered and the caecal and rectal content of each animal were collected separately for bacteriological analyses.

2.5. Enumeration and isolation of *Campylobacter* spp.

Campylobacter was cultured in a micro-aerophilic atmosphere (5% O₂, 10% CO₂ and 85% N₂) and at a temperature of 41.5 °C. Ten grams of fresh faeces were added to 90 ml of Preston broth (Oxoid, Dardilly, France) with a Preston antibiotic supplement (AES Laboratory, Rennes, France). For *Campylobacter* numeration, a ten-fold dilution series (10⁻¹ to 10⁻⁵) was carried out and 100 µl of each dilution were plated on Karmali agar (AES Laboratory, Rennes, France) and incubated for 24 h. A second plating was carried out 24 h after broth enrichment in order to confirm the absence of *Campylobacter* in the samples or to confirm the presence of *Campylobacter* in samples harbouring less than 100 CFU of *Campylobacter*/g of faeces (detection limit of the direct method). After 48 h of incubation (72 h for direct streaking) of the agar plates, presence of *Campylobacter* colonies was checked and the number of CFU per gram of faeces was calculated. For the non-inoculated pigs, the faecal samples were cultured after an enrichment step of 24 h to determine the presence or the absence of *Campylobacter*. If successive positive samples were observed, a *Campylobacter* numeration, like for the inoculated pigs, was planned. From each positive sample corresponding to one pig, 10 colonies taken at random were sub-cultured on blood agar for 48 h at 41.5 °C. The *Campylobacter* isolate was stored at -80 °C in glycerol peptone broth. Random colonies were suspended in 100 µl TE buffer (10 mmol Tris-HCl, 1 mmol EDTA, pH 7.6) and stored at -20 °C for DNA extraction. For each pig, excreted colonies obtained at the end of the trial were the species identified by PCR. If animals did not excrete any more at the last sampling time, PCR identification was carried out on isolates obtained from previous samples.

2.6. DNA extraction and PCR for species identification

DNA extraction was performed by heating the bacteria at 95 °C for 10 min. After a low-speed centrifugation (5000 × g, 2 min), 3 µl of the supernatant was used for species identification by PCR. PCR and electrophoresis were performed as described

by Denis et al. (1999) to distinguish *C. coli* to *C. jejuni* strains. The three inoculated strains were used as positive controls in the PCR.

2.7. Pulsed field gel electrophoresis

At the end of the trial, 20 isolates (10 from caecal content and 10 from rectal content) per pig in Unit 3 were genotyped by PFGE as described by Rivoal et al. (2005) in order to distinguish which strains were excreted, namely to differentiate porcine and poultry *C. coli*. Two DNA restriction patterns were obtained for each isolate by using two restriction enzymes, SmaI and KpnI.

3. Results

3.1. Clinical observations and growth performances

Few pigs exhibited clinical signs during the entire trial. Two animals from the group inoculated simultaneously with the three strains (Pen e) had diarrhoea for 1 day without associated hyperthermia or anorexia. Moreover, post-mortem examination did not reveal any pathological change. The mean average daily gain (ADG) value was calculated for each pen. The results were similar between groups with 1039, 907 and 925 g for pigs inoculated with one strain (porcine *C. coli*, poultry *C. coli* and *C. jejuni*, respectively) and 966 g for animals inoculated with the mix of three strains. For the sham-inoculated pigs, their ADG was 953 and 908 g in Pens b and f, respectively. These values appeared similar to those of the negative control animals in Unit 4 (ADG of 921 g).

3.2. Bacteriological results and kinetics of excretion

Before inoculation, no *Campylobacter* was detected in the environment (wall and floor swabs, feed and air samples) and in the pig faeces. The number of CFU per gram of faeces excreted until 80 days p.i. (post-inoculation) is presented in Fig. 2. Two days after inoculation, all the animals infected by the porcine *C. coli* strain (Unit 1, Pen a) excreted from 10³ to 10⁷ CFU/g of faeces for most pigs. The excretion

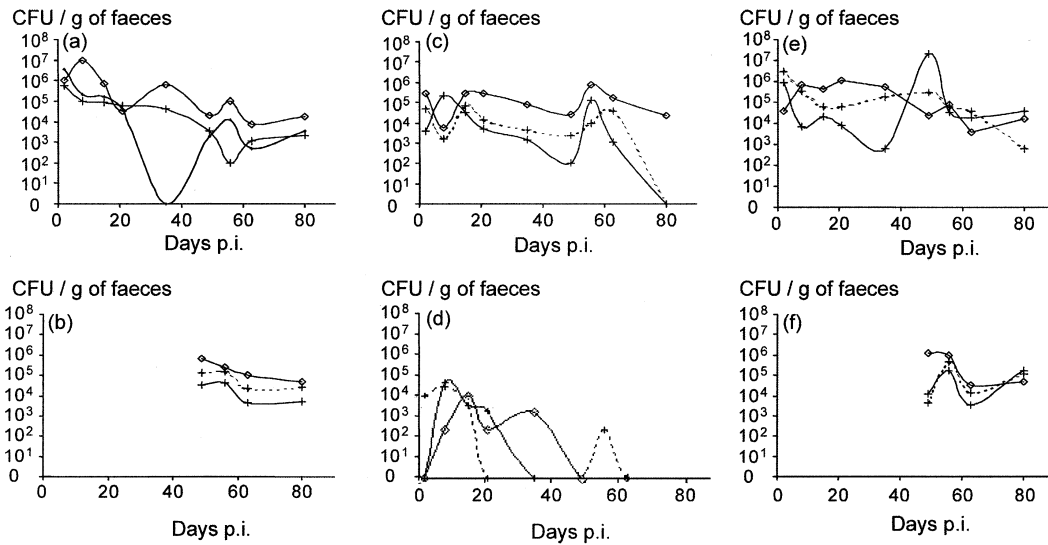


Fig. 2. Number of CFU of *Campylobacter* per gram of faeces excreted by pigs during 80 days from inoculation. Unit 1: (a) pen with three pigs inoculated with the porcine *C. coli* strain and (b) pen with three neighbouring non-inoculated pigs; Unit 2: (c) pen with three pigs inoculated with the poultry *C. coli* strain and (d) pen with three pigs inoculated with the poultry *C. jejuni* strain; Unit 3: (e) pen with three pigs inoculated with a mix of the three strains and (f) pen with three neighbouring non-inoculated pigs.

was continuous during the entire test with a slight decrease at the end of the fattening period (approximately 10^4 CFU/g of faeces). No *Campylobacter* was found in the faeces of one animal at 35 days p.i.

Animals inoculated with poultry *C. coli* (Pen c) excreted at the beginning of the trial a lower quantity of *Campylobacter* compared to the pigs inoculated with porcine *C. coli* (Pen a) (4×10^3 , 4.7×10^4 and 3×10^5 CFU/g of faeces versus 1×10^6 , 3.7×10^6 and 5.6×10^5 CFU/g of faeces, respectively). Moreover, at the last sampling time (80 days post-inoculation), the level of *Campylobacter* in the faeces slightly decreased. At the end of the trial, *Campylobacter* was detected only in faeces of one pig and in caecal content for another pig.

Two days after the inoculation, only one animal inoculated with *C. jejuni* (Pen d) excreted *Campylobacter* (3×10^3 CFU/g of faeces). After 8 days, the three animals excreted 1×10^2 , 9×10^3 and 6×10^3 CFU/g of faeces. The level of *Campylobacter* in the faeces rapidly decreased and *Campylobacter* was not found from the 21st day for one animal, from the 35th day for the second and from the 49th day for the third. Re-excretion of *Campylobacter* was observed for one pig at 56 days post-inoculation.

For the animals inoculated with a mix of the three strains (Pen e), the level of *Campylobacter* excreted ranged from 10^3 to 10^7 CFU/g of faeces. This excretion was observed at all sampling times and the average level of *Campylobacter* in the faeces was around 10^5 CFU/g at 80 days post-inoculation. At 49 days after the inoculation, one pig excreted 2×10^7 CFU/g. This increase was associated with diarrhoea.

At the different times of sampling, no *Campylobacter* was ever found in the faeces of the negative control pigs. On the contrary, pigs in the adjacent pens (sham-inoculated pigs) shedded *Campylobacter* 21 days after inoculation. Their excretion, quantified from the 49th day after inoculation, was continuous and between 10^3 and 10^6 CFU/g of faeces, similar to those of the inoculated pigs housed in the same unit.

3.3. Species identification and distinction of porcine and poultry *C. coli* by PFGE

All the isolates collected from faecal samples and caecal contents at the end of the trial were analysed by PCR. For Unit 1, all of them were identified as *C. coli*. PCR confirmed that isolates excreted by pigs in Pens c

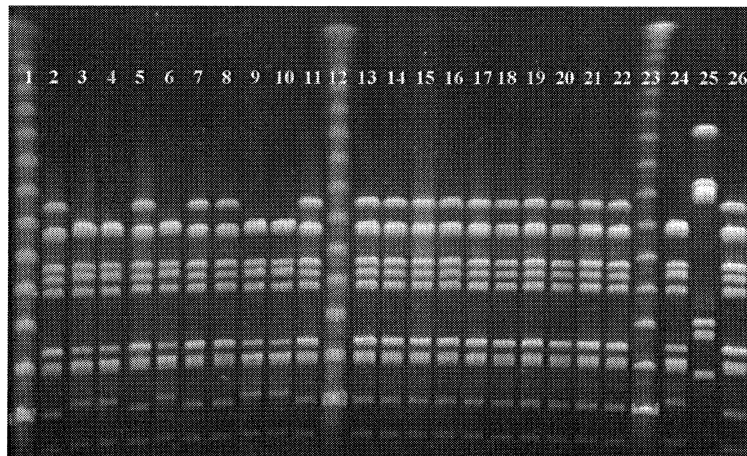


Fig. 3. PFGE profiles with SmaI enzyme from the 20 isolates of the pig number 5 in Pen f (Table 1). Lanes 1, 12, 23: lambda ladder 50–1000 kb; lanes 3, 4, 6, 9, 10: porcine *C. coli* isolates; lanes 2, 5, 7, 8, 11, 13–22: poultry *C. coli* isolates; lane 24, reference profile for porcine *C. coli* strain; lane 25: reference profile for poultry *C. jejuni* strain; lane 26: reference profile for poultry *C. coli* strain.

and d were always *C. coli* and *C. jejuni*, respectively, suggesting the absence of *Campylobacter* transmission between Pens c and d. All the isolates from the pigs inoculated with the three strains and from the sham-inoculated pigs (Pens e and f) were identified as *C. coli*. In Unit 3, PFGE was used to identify the animal origin of the *C. coli* isolates of the pigs inoculated with the three strains and the sham-inoculated pigs (Fig. 3). Porcine and poultry *C. coli* isolates excreted by each pig are presented in Table 1. Of the 20 isolates studied per pig, 1 pig (numbered 1 in Pen e) alone excreted *C. coli* of porcine origin. The others, inoculated pigs and sham-inoculated pigs,

excreted both *C. coli* of porcine origin and *C. coli* of poultry origin.

4. Discussion

This trial assessed the *Campylobacter* excretion quantitatively by the pigs of three strains from different origins during 80 days post-inoculation. It also demonstrated the transmission of *Campylobacter* from the inoculated pigs to the neighbouring animals housed in adjacent pens. To our knowledge, this trial is the first reported experimental infection of weaners with *Campylobacter*. These weaned animals, with established intestinal flora, had never been in contact with *Campylobacter* before the inoculation. Moreover, the control pigs remained negative throughout the experimentation. This allows to exclude a possible contamination by exogenous factors entering the barn such as food, water, uncontrolled airflow or handlers. The presence of *Campylobacter* in the digestive tract of piglets did not lead to health disorder and/or a decrease in growth performances.

In the present study, 2 days after inoculation, the six animals infected with *C. coli* of porcine origin (alone or in a mix) became positive and excreted *Campylobacter*. This finding was also observed for the neighbouring sham-inoculated animals which excreted *Campylobacter* at the same level at the

Table 1
Number of isolates per origin among the 20 isolates collected at the end of the trial from pigs in Unit 3

Animals	Isolate species and origin		
	Porcine <i>C. coli</i>	Poultry <i>C. jejuni</i>	Poultry <i>C. coli</i>
Inoculated pigs (Pen e)			
1	20	0	0
2	17	0	3
3	13	0	7
Neighbouring pigs (Pen f)			
4	13	0	7
5	5	0	15
6	6	0	14

Three pigs (1–3) were inoculated with the three strains and three pigs (4–6) were housed in the adjacent pen.

end of the trial. The levels of excretion were similar to those observed in the fattening pigs after natural infection (Weijtens et al., 1993, 1999, 2000; Harvey et al., 1999). These results did not seem to be influenced by the simultaneous inoculation of three *Campylobacter* strains, which led to a higher infection doses (15×10^7 versus 5×10^7).

The average colony count of *Campylobacter* in the faeces decreased slowly with the age of the animals. Weijtens et al. (1993) have shown that the percentage of carrier pigs tended to decrease during the fattening period (95% of positive samples at the beginning and 85% at the end of the fattening period with a smaller quantity of *Campylobacter* in the faeces). A more rapid decrease in the excretion level was reported in Weijtens et al. (1999) as well as in our study, compared to Weijtens et al. (1993). It could be due to the fact that the two former studies were experiments with strict hygiene management whereas the latter was a field study. Indeed, in our study, there was a combination of a high level of cleaning with good living conditions for the pigs (housed in pens with a restricted number of animals, in a quiet environment and fed *ad libitum*).

Campylobacter could not be detected in one animal at one time point whereas high counts were observed in faeces from the same pig at previous and later sampling times. These observations suggest an intermittent excretion of *Campylobacter*. Moreover, similar to previous findings (Weijtens et al., 1999), variations in the number of *Campylobacter* in the faeces between both animals and samples from a given animal were observed in our trial. Lee et al. (1986) showed in a germfree adult mouse model that *C. jejuni* colonized the intestinal tract *via* an association with the intestinal mucus layer on the surface mucosa or in the intestinal crypts and did not adhere to the epithelial cells. In addition, Hugdahl et al. (1988) and Takata et al. (1992) noticed the chemotactic behavior of *C. jejuni* and its importance for the effective colonization of the intestinal tract, especially in the mucus layer, where more chemoattractant might be present than in the gut space. These results suggest a heterogeneous distribution of *Campylobacter* in the gut content and consequently in samples taken from the rectal content. This could explain the discrepancies between quantities of *Campylobacter* observed in successive samples. Furthermore, the result with one pig

exhibiting a negative faecal sample and a positive caecal sample could favour this assumption.

In our trial, three strains of *Campylobacter* differing in species (*C. coli* and *C. jejuni*) and in origin (pig and poultry) were tested to evaluate a possible differential infection potential and the possible co-existence of different strains in pigs. Animals inoculated with the poultry *C. coli* strain excreted lower quantities of bacteria compared to the animals inoculated with the porcine *C. coli* strain and their excretion period was shorter. *Campylobacter* was not any more present in faeces of pigs inoculated with *C. jejuni*. Moreover, we could not evidence *C. jejuni* by PCR identification for (i) the animals inoculated with the mix of strains and (ii) the neighbouring ones. Our results are supported by reports from other European countries (Denmark, Portugal and Italy), showing low prevalences of *C. jejuni* in pigs (Cabrita et al., 1992; Nielsen et al., 1997; Pezzotti et al., 2003). Recently Jensen et al. (2006) have investigated the occurrence and species distribution of thermophilic *Campylobacter* in organic outdoor pigs in Denmark. They found that all the pigs excreted *Campylobacter*; *C. jejuni* was always detected to a lesser extent than *C. coli* and individual pigs were *C. jejuni* positive just once or in non-consecutive weeks. This indicates that the presence of *C. jejuni* in pigs may be sporadic and/or that the detection of low numbers of *C. jejuni* in pigs is difficult. Boes et al. (2005) observed that pigs were infrequently infected by *C. jejuni* even in farms where *C. jejuni* infected cattle or poultry had been demonstrated. Some studies in the United States or in Canada have reported higher *C. jejuni* prevalences of 30–50% in slaughterhouse pigs and pork (Finlay et al., 1986; Harvey et al., 1999; Young et al., 2000). Different hypotheses can explain the discrepant *C. jejuni* finding in pigs among these studies: (i) the species identification method which may influence the result as demonstrated previously for the hippurate test (Englen et al., 2003; Waino et al., 2003) or (ii) the bacteriological method especially in the enrichment step (Manser and Dalziel, 1985; Richardson et al., 2001). Our results suggest that *C. coli*, especially the porcine strain, is more likely to colonize the digestive tract in pigs compared to poultry *C. coli* or *C. jejuni* strains. These findings suggest a preferential association between some *Campylobacter* strains and some animal species. These associations between hosts and

Campylobacter strains have been confirmed by several authors through genotyping technics. Dingle et al. (2005) using a MLST technique observed that chickens and pigs located on a same farm were colonized with different STs indicating a host preference by some *C. coli* genotypes. Host-associated alleles by MLST of *C. coli* were also identified in the USA by Miller et al. (2006). Using the AFLP method, genetic separation between *C. coli* from poultry and *C. coli* from pigs was described by Hopkins et al. (2004) and by Siemer et al. (2004).

To summarize, the transmission of *Campylobacter* was demonstrated between pens and all the neighbouring animals became shedders with a level of excretion similar to inoculated pigs. This transmission could be demonstrated for the two *C. coli* strains. These results highlighted the possible between-pen transmission, given that pens might harbour perforated separations in commercial herds. Our experimental trial confirmed field results like the level of *Campylobacter* excretion, the intermittence in the excretion of the bacteria by pig. Finally, this trial illustrated the preferential association between *Campylobacter* species/strains and host animal species: *C. coli* seems to have a higher capacity to colonize the pig digestive tract.

Acknowledgements

This work was partly funded by INRA, by AFSSA and by the Region Pays de La Loire.

References

- Alter, T., Gaull, F., Kasimir, S., Gurtler, M., Mielke, H., Linnebur, M., Fehlhaber, K., 2005. Prevalences and transmission routes of *Campylobacter* spp. strains within multiple pig farms. *Vet. Microbiol.* 108, 251–261.
- Boes, J., Nersting, L., Nielsen, E.M., Kranker, S., Enoe, C., Wachmann, H.C., Baggesen, D.L., 2005. Prevalence and diversity of *Campylobacter jejuni* in pig herds on farms with and without cattle or poultry. *J. Food Prot.* 68, 722–727.
- Cabrita, J., Rodrigues, J., Braganca, F., Morgado, C., Pires, I., Goncalves, A.P., 1992. Prevalence, biotypes, plasmid profile and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from wild and domestic animals from northeast Portugal. *J. Appl. Bacteriol.* 73, 279–285.
- Cariolet, R., LeDiguierher, G., Ecobichon, P., Julou, P., Jolly, J.P., Madec, F., 2004. Production of long term, low cost specific pathogen free pigs. In: Madec, F., Clement, G. (Eds.), *Animal Production in Europe: The Way Forward in a Changing World*, Proceedings of the Symposium of the International Society for Animal Hygiene, Saint-Malo, France, p. 149.
- Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G., Colin, P., 1999. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 406–410.
- Dingle, K.E., Colles, F.M., Falush, D., Maiden, M.C.J., 2005. Sequence typing and comparison of population biology of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 340–347.
- Englen, M.D., Ladely, S.R., Fedorka-Cray, P.J., 2003. Isolation of *Campylobacter* and identification by PCR. *Methods Mol. Biol.* 216, 109–121.
- Englen, M.D., Hill, A.E., Dargatz, D.A., Ladely, S.R., Fedorka-Cray, P.J., 2007. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* in US dairy cattle. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1570–1577.
- Finlay, R.C., Mann, E.D., Horning, J.L., 1986. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* contamination in Manitoba swine carcasses. *Can. Vet. J.* 27, 185–187.
- Harvey, R.B., Anderson, R.C., Young, C.R., Hume, M.E., Genovese, K.J., Ziprin, R.L., Farrington, L.A., Stanker, L.H., Nisbet, D.J., 1999. Prevalence of *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Arcobacter* species at slaughter in market age pigs. *Adv. Exp. Med. Biol.* 473, 237–239.
- Hopkins, K.L., Desai, M., Frost, J.A., Stanley, J., Logan, J.M.J., 2004. Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains and its relationship with host specificity, serotyping, and phage typing. *J. Clin. Microbiol.* 42, 229–235.
- Hugdahl, M.B., Beery, J.T., Doyle, M.P., 1988. Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 56, 1560–1566.
- Jensen, A.N., Andersen, M.T., Dalsgaard, A., Baggesen, D.L., Nielsen, E.M., 2005. Development of real-time PCR and hybridization methods for detection and identification of thermophilic *Campylobacter* spp. in pig faecal samples. *J. Appl. Microbiol.* 99, 292–300.
- Jensen, A.N., Dalsgaard, A., Baggesen, D.L., Nielsen, E.M., 2006. The occurrence and characterization of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in organic pigs and their outdoor environment. *Vet. Microbiol.* 116, 96–105.
- Keller, J., Wieland, B., Wittwer, M., Stephan, R., Perreten, V., 2007. Distribution and genetic variability among *Campylobacter* spp. isolates from different animal species and humans in Switzerland. *Zoonoses Public Health* 54, 2–7.
- Lee, A., O'Rourke, J.L., Barrington, P.J., Trust, T.J., 1986. Mucus colonization as a determinant of pathogenicity in intestinal infection by *Campylobacter jejuni*: a mouse cecal model. *Infect. Immun.* 51, 536–546.
- Madden, R.H., Moran, L., Scates, P., 2000. Optimising recovery of *Campylobacter* spp. from the lower porcine gastrointestinal tract. *J. Microbiol. Methods* 42, 115–119.

- Manser, P.A., Dalziel, R.W., 1985. A survey of *Campylobacter* in animals. *J. Hyg.* 95, 15–21.
- Miller, W.G., Englen, M.D., Kathariou, S., Wesley, I.V., Wang, G., Pittenger-Alley, L., Siletz, R.M., Muraoka, W., Fedorka-Cray, P.J., Mandrell, R.E., 2006. Identification of host-associated alleles by multilocus sequence typing of *Campylobacter coli* strains from food animals. *Microbiology* 152, 245–255.
- Moore, J.E., Corcoran, D., Dooley, J.S., Fanning, S., Lucey, B., Matsuda, M., McDowell, D.A., Megraud, F., Millar, B.C., O'Mahony, R., O'Riordan, L., O'Rourke, M., Rao, J.R., Rooney, P.J., Sails, A., Whyte, P., 2005. *Campylobacter*. *Vet. Res.* 36, 351–382.
- Nielsen, E.M., Engberg, J., Madsen, M., 1997. Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Danish patients, poultry, cattle and swine. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 19, 47–56.
- Payot, S., Avrain, L., Magras, C., Praud, K., Cloeckeaert, A., Chaslus-Dancla, E., 2004. Relative contribution of target gene mutation and efflux to fluoroquinolone and erythromycin resistance, in French poultry and pig isolates of *Campylobacter coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 23, 468–472.
- Petersen, L., Nielsen, E.M., Engberg, J., On, S.L., Dietz, H.H., 2001. Comparison of genotypes and serotypes of *Campylobacter jejuni* isolated from Danish wild mammals and birds and from broiler flocks and humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3115–3121.
- Pezzotti, G., Serafin, A., Luzzi, I., Mioni, R., Milan, M., Perin, R., 2003. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in north-eastern Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 281–287.
- Richardson, J.F., Frost, J.A., Kramer, J.M., Thwaites, R.T., Bolton, F.J., Wareing, D.R., Gordon, J.A., 2001. Coinfection with *Campylobacter species*: an epidemiological problem? *J. Appl. Microbiol.* 91, 206–211.
- Rivoal, K., Ragimbeau, C., Salvat, G., Colin, P., Ermel, G., 2005. Genomic diversity of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolates recovered from free-range broiler farms and comparison with isolates of various origins. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6216–6227.
- Siemer, B.L., Harrington, C.S., Nielsen, E.M., Borck, B., Nielsen, N.L., Engberg, J., On, S.L.W., 2004. Genetic relatedness among *Campylobacter jejuni* serotyped isolates of diverse origin as determined by numerical analysis of amplified fragment length polymorphism (AFLP) profiles. *J. Appl. Microbiol.* 96, 795–802.
- Takata, T., Fujimoto, S., Amako, K., 1992. Isolation of nonchemo-tactic mutants of *Campylobacter jejuni* and their colonization of the mouse intestinal tract. *Infect. Immun.* 60, 3596–3600.
- Thakur, S., Gebreyes, W.A., 2005. *Campylobacter coli* in swine production: antimicrobial resistance mechanisms and molecular epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5705–5714.
- Von Altrock, A., Louis, A.L., Rosler, U., Beyerbach, M., Kreienbrocks, L., Waldmann, K.H., 2006. The bacteriological and serological prevalence of *Campylobacter* spp. and *Yersinia enterocolitica* in fattening pig herds in Lower Saxony. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 119, 391–399.
- Waino, M., Bang, D.D., Lund, M., Nordentoft, S., Andersen, J.S., Pedersen, K., Madsen, M., 2003. Identification of *Campylobacter* isolated from Danish broilers by phenotypic tests and species-specific PCR assays. *J. Appl. Microbiol.* 95, 649–655.
- Weijtens, M.J.B.M., Bijker, P.G.H., van der Plas, J., Urlings, H.A.P., Biesheuvel, M.H., 1993. Prevalence of *Campylobacter* in pigs during fattening; an epidemiological study. *Vet. Q.* 15, 138–143.
- Weijtens, M.J.B.M., van der Plas, J., Bijker, P.G.H., Urlings, H.A.P., Koster, D., van Logtestijn, J.G., Huis in't Veld, J.H.J., 1997. The transmission of *Campylobacter* in piggeries; an epidemiological study. *J. Appl. Microbiol.* 83, 693–698.
- Weijtens, M.J.B.M., Reinders, R.D., Urlings, H.A.P., van der Plas, J., 1999. *Campylobacter* infections in fattening pigs; excretion pattern and genetic diversity. *J. Appl. Microbiol.* 86, 63–70.
- Weijtens, M.J.B.M., Urlings, H.A.P., van der Plas, J., 2000. Establishing a *Campylobacter*-free pig population through a top-down approach. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 479–484.
- Young, C.R., Harvey, R., Anderson, R., Nisbet, D., Stanker, L.H., 2000. Enteric colonisation following natural exposure to *Campylobacter* in pigs. *Res. Vet. Sci.* 68, 75–78.

3. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'infection expérimentale présentée ici est à notre connaissance la première réalisée avec *Campylobacter* sur des porcs EOPS en suivi longitudinal. Cet essai montre la possibilité d'infecter expérimentalement des animaux sevrés, avec un système immunitaire fonctionnel et une flore intestinale établie. Etant donné la forte prévalence de l'infection dans les élevages commerciaux, il est difficile d'obtenir des animaux négatifs et les animaux de l'étude sont donc des porcs EOPS issus de la porcherie protégée de l'AFSSA à Ploufragan. Outre la formation du troupeau de truies par hystérectomie, des règles de circulation du personnel sont établies, des conditions d'hygiène strictes sont appliquées et tous les facteurs exogènes entrants dans l'animalerie sont contrôlés.

Après la vérification de la négativité des animaux et de l'environnement (cases) au début de l'essai, les animaux «témoins», restés négatifs tout au long de l'expérimentation, ont permis un contrôle des facteurs exogènes entrants dans l'animalerie comme la nourriture, l'eau et l'air communs à tous les animaux de l'essai.

L'approche expérimentale en conditions contrôlées était originale et intéressante puisqu'elle permettait de tester l'installation et les modalités d'excrétion de plusieurs souches de *Campylobacter* d'origines différentes (porcine ou aviaire) et, en particulier, les deux espèces principalement mises en cause lors de campylobactérioses humaines (*C. coli* et *C. jejuni*). De plus, la présence de parcs adjacents avec des animaux « contacts » non inoculés ou des animaux inoculés avec des souches différentes permettaient d'évaluer la transmission à distance de *Campylobacter*.

Les grandes tendances décrites dans les études épidémiologiques concernant le statut des élevages porcins vis à vis de *Campylobacter* se retrouvent dans notre étude : le portage asymptomatique, les niveaux d'excrétion élevés et une légère baisse des quantités excrétées en fin d'engraissement.

La présence de *Campylobacter* dans le tube digestif ne semble pas à l'origine de troubles de santé et/ou d'altération du niveau de production chez les animaux porteurs. Dans notre étude, ce portage asymptomatique a été mis en évidence sur des porcs EOPS âgés de sept semaines, avec une flore intestinale établie et qui, bien que n'ayant jamais été mis en

contact avec la bactérie, présentent un système immunitaire fonctionnel. De plus, les performances de croissance sont comparables pour tous les animaux de l'essai et élevées par rapport aux données de référence (Moyenne ITP 2004 : GMQ engraissement = 760 g). Ces résultats sont à corrélés à la situation particulière des animaux logés en petits parcs, nourris *ad libitum* et vivant dans un environnement non stressant.

Pour les animaux infectés expérimentalement avec *C. coli* (seul ou en association), la prévalence et le niveau d'excrétion sont similaires à ceux observés en élevage. En effet, dès le 2^{ème} jour post-inoculation, tous les animaux sont excréteurs et la quantité excrétée varie de 10³ à 10⁶ UFC de *Campylobacter*/g de matières fécales. Cette observation est également vraie pour les animaux « contacts » qui se contaminent tous naturellement à partir du 21^{ème} jour et qui conservent tout au long de l'essai un niveau d'excrétion similaire à celui des animaux inoculés.

La prévalence du portage et la quantité de *Campylobacter* excrétée semblent diminuer avec l'âge des animaux selon une étude de Weijtens *et al.* (1993). Toutefois, Alter *et al.* (2005) n'ont pas observé cette cinétique d'excrétion. La diminution du portage et de la quantité de *Campylobacter* pourrait être due à une conduite particulière des animaux associant des logements individuels (ou des parcs avec un nombre restreint d'animaux) à un respect de mesures d'hygiène relativement strictes. A l'inverse, une exposition constante des animaux à des matières fécales contenant des quantités élevées de *C. coli* pourrait expliquer le maintien d'une prévalence et d'un niveau d'excrétion élevés pendant la période d'engraissement. Les résultats de notre étude pour les animaux « contacts » ainsi que ceux de Alter *et al.* (2005) appuient cette hypothèse.

De plus, des informations complémentaires ont pu être mises en évidence lors de cette étude : une intermittence de l'excrétion, une contagiosité de *Campylobacter* avec une transmission rapide aux animaux des cases adjacentes, un effet souche/espèce marqué.

Au cours de l'engraissement, on observe des variations des quantités de *Campylobacter* présents dans les matières fécales et ponctuellement des animaux préalablement détectés porteurs présentent des prélèvements négatifs (résultats similaires à ceux observés par Weijtens *et al.*, 1993 et 1999). Ces observations suggèrent une excrétion intermittente de *Campylobacter* ou une succession de phases d'élimination puis de recontamination. Cette dernière hypothèse sous entendrait que les animaux deviennent

temporairement non porteurs puis se réinfectent. Néanmoins des quantités excrétées élevées dans les prélèvements précédant et suivant l'échantillon négatif associées à une pression d'infection élevée au même moment dans l'environnement (l'un des animaux excrète environ $6 \cdot 10^5$ UFC/g) vont à l'encontre de cette hypothèse. De plus, même si deux isollements (direct et après enrichissement) ont été réalisés pour l'analyse bactériologique (comme recommandé par Endtz *et al.*, 1991), il est possible que la quantité de bactéries présente soit inférieure à la limite de détection pour certains prélèvements. Enfin, l'existence d'une excrétion intermittente de *Campylobacter* est aussi une hypothèse à envisager. Lee *et al.*, en 1986, montrent que chez les souris *Campylobacter* a tendance à s'accumuler au fond des cryptes et qu'il persiste dans le mucus intestinal. De plus, au cours du temps, la capacité des *Campylobacter* à coloniser le tube digestif des porcs varie. Divers facteurs entrent en jeu tels que le statut physiologique de l'animal, des facteurs externes modifiant la flore intestinale et la résistance de l'intestin à la colonisation ainsi que la diversité des *Campylobacter* dans la capacité de virulence. Ces observations, associées à l'éventualité d'une distribution hétérogène de *Campylobacter* dans le contenu intestinal, pourraient expliquer la cinétique d'excrétion de *Campylobacter* dans les matières fécales, notamment les variations des quantités de *Campylobacter* excrétées au cours du temps pour un même animal. Un portage sans excrétion associée est possible au moins ponctuellement puisque dans notre étude, lors de l'abattage, un animal ne présentait pas d'excrétion fécale (aucun *Campylobacter* dans le contenu rectal) alors que des *Campylobacter* avaient été retrouvés dans son contenu caecal.

De plus, tous les animaux « contacts » sont devenus excréteurs avec un niveau d'excrétion similaire à celui des animaux infectés expérimentalement. Ces résultats mettent en évidence la possibilité d'une transmission à distance de *Campylobacter*. Cependant, bien que les parcs soient séparés de trente centimètres, il s'agit de séparations ajourées et non de barrières pleines. Une projection de matières fécales d'un parc à l'autre est envisageable permettant la transmission des *Campylobacter* par voie oro-fécale.

Enfin pour notre essai, nous avons sélectionné deux espèces différentes et deux souches de *C. coli* d'origines différentes afin de mettre en évidence l'existence éventuelle d'une variation dans l'implantation, le niveau d'excrétion et la persistance dans le tube digestif. Au vu des résultats, il apparaît que les animaux infectés expérimentalement avec la souche *C. coli* d'origine aviaire excrètent moins longtemps et en quantité inférieure par rapport aux animaux inoculés avec la souche *C. coli* isolée en élevage porcin. Les animaux

infectés expérimentalement avec *C. jejuni* ne sont pas tous excréteurs deux jours post-inoculation et l'excrétion de *C. jejuni* n'est plus mise en évidence à partir du 63^{ème} jour post-inoculation. La capacité de colonisation et d'implantation des souches *C. jejuni* et *C. coli* d'origine aviaire chez l'animal avait été vérifiée par une infection expérimentale préliminaire sur des volailles. *C. jejuni* semblerait ainsi moins bien s'implanter chez le porc que *C. coli* et de même pour *C. coli* d'origine aviaire par rapport à *C. coli* d'origine porcine.

Les résultats de la PCR conventionnelle sur les isolats des animaux de l'animalerie 3 au moment de l'abattage, animaux inoculés avec le mélange des trois souches ou animaux « contacts », montrent que les porcs n'excrètent plus *C. jejuni*. L'application de la PCR quantitative en temps réel spécifique de *C. coli* et de *C. jejuni* (Chapitre II, Article 2) sur l'ADN total extrait de chaque échantillon a mis en évidence l'absence d'installation de *C. jejuni* chez les porcs EOPS quand cette souche est inoculée avec *C. coli*. Dès le départ, *i.e.* deux jours après inoculation, les animaux excrètent uniquement *C. coli*. La réalisation d'une RFLP-PFGE sur ces mêmes isolats a permis de distinguer *C. coli* d'origine porcine de *C. coli* d'origine aviaire. Si *C. coli* d'origine porcine semble prédominer chez les animaux inoculés, les deux souches sont retrouvées chez les animaux « contacts » dans des proportions similaires.

La description de l'évolution qualitative et quantitative de l'excrétion, l'existence d'une différence éventuelle dans l'installation et la survie d'une souche par rapport à une autre constituent une première approche de la notion éventuelle d'interaction spécifique hôte-bactérie au niveau espèce et souche. Les résultats de notre étude nous conduisent à émettre l'hypothèse d'un éventuel effet souche et/ou espèce. Une pression de sélection semble également exister par rapport à l'espèce animale. De plus, aucun passage n'a été mis en évidence entre les porcs inoculés avec *C. coli* d'origine aviaire et ceux inoculés avec *C. jejuni*. En plus, d'une première hypothèse concernant l'existence d'une interaction spécifique hôte-bactérie, il est possible que l'inoculation avec *C. jejuni* ait empêché la colonisation secondaire de *C. coli*.

Cependant, les résultats obtenus sont à relativiser étant donné qu'il s'agit d'une étude menée sur trois à six animaux pour chaque lot. La mise en place d'un autre essai permettrait d'étudier la capacité de transmission de ces souches à des animaux « contacts » non inoculés et de confirmer un effet « compétition » entre deux souches en réalisant des inoculations successives sur des porcs EOPS.

4. CONCLUSION

Cette expérimentation animale a permis de valider les méthodes d'étude présentées dans le chapitre II sur des animaux inoculés avec des souches connues et élevés dans des conditions contrôlées (eau, aliment, air, règles de conduite strictes pour les animaliers). Outre les gains en rapidité et l'absence de manipulation pour la lecture (diminution des risques de contamination post-PCR), la PCR quantitative en temps réel avec la technologie TaqMan® permet d'associer spécificité et quantification. Après cette dernière étape de validation en condition réelle, les techniques de PCR quantitative en temps réel seront utilisées pour décrire la cinétique d'excrétion de *Campylobacter* en élevage porcin.

Cette étude expérimentale permettait également d'étudier la variabilité génétique des souches de *Campylobacter* chez le porc et de valider les méthodes de typage moléculaire en conditions contrôlées. Ces méthodes de typage sont présentées dans le chapitre qui suit. Elles permettront l'étude de populations d'agents pathogènes à plasticité importante tout en traçant les communautés d'origine des souches.

CHAPITRE IV :

DESCRIPTION

DE LA VARIABILITE GENETIQUE

DES SOUCHES

DE *CAMPYLOBACTER*

1. CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE

Une meilleure connaissance de l'épidémiologie de l'infection à *Campylobacter* en élevage porcin nécessite la connaissance du portage et de la cinétique d'excrétion. En outre, la capacité de décrire précisément les souches bactériennes rencontrées est indispensable afin de tracer ces souches et de déterminer les sources et les modalités de transmission de *Campylobacter* en élevage et à l'abattoir.

En ce qui concerne la caractérisation génotypique de *Campylobacter*, les résultats des différentes études font apparaître une grande variabilité génomique entre souches isolées d'animaux différents mais également entre souches isolées sur un même porc au cours du temps (Weijtens *et al.*, 1997 ; Weijtens *et al.*, 1999 ; Hume *et al.*, 2002). Guévremont *et al.* (2004) ont souligné la coexistence de plusieurs profils génétiques PFGE chez un même animal. Ces observations sont compatibles avec une caractéristique des *Campylobacter* qui présentent une importante capacité à modifier leur matériel génétique via l'intégration d'ADN exogène et de réarrangements au sein de leur propre ADN (Wang et Taylor, 1990 ; Mills *et al.*, 1991). Différentes hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer la variabilité décrite chez un même animal à un instant donné et/ou au cours du temps. Celle-ci peut être le reflet de la co-existence de souches différentes chez l'animal provenant de pluri-infections simultanées ou successives, éventuellement à partir de sources différentes et à différents stades de l'élevage. Cette variabilité peut également être potentiellement générée dans le tube digestif des animaux par la plasticité génomique intrinsèque de *Campylobacter*. Cette plasticité peut de plus être augmentée en cas de co-infections en lien avec un échange de matériel génétique entre souches.

Il semble donc intéressant de renseigner les différentes composantes possibles de cette hétérogénéité, en particulier en caractérisant la variabilité génomique intrinsèque de *Campylobacter*, *in vitro* (après repiquages successifs d'une même souche) et *in vivo* en conditions d'infections contrôlées (infections expérimentales). Ainsi, l'infection expérimentale de porcs EOPS indemnes de *Campylobacter* nous a permis de décrire la variabilité génomique générée *in vivo* au cours du temps, en contexte d'infection par une ou plusieurs souches/espèces de *Campylobacter*. Ces résultats permettront la calibration de ces méthodes de typage et l'évaluation de la variabilité, des points essentiels afin de générer des données fondamentales pour pouvoir interpréter les données relevées sur le terrain.

2. LE TYPAGE MOLECULAIRE : DIFFERENTES METHODES

La caractérisation, ou typage, des micro-organismes permet l'identification d'un isolat à un niveau inférieur à l'espèce. Un système de typage est donc caractérisé par des marqueurs phénotypiques et/ou génotypiques qui permettent d'attribuer un type à un isolat donné au sein d'une espèce bactérienne. Un isolat unique ou un groupe d'isolats ayant des traits phénotypiques et/ou génotypiques semblables mais distincts de ceux des isolats de la même espèce seront alors désignés par le terme de souche. Nous allons dans un premier temps introduire les objectifs et les critères d'évaluation d'un système de typage, puis les différentes méthodes de caractérisation appliquées à *Campylobacter* seront abordées. Nous évoquerons les méthodes phénotypiques détaillées précédemment dans le Chapitre I (Paragraphe 1.3.) et nous insisterons uniquement sur les méthodes génotypiques, méthodes qui nous intéressent particulièrement dans le cadre du travail de recherche réalisé au cours de cette thèse.

2.1. GENERALITES SUR LA CARACTERISATION BACTERIENNE

2.1.1. OBJECTIFS DE LA CARACTERISATION BACTERIENNE

Tout d'abord, la détermination de marqueurs phénotypiques et génotypiques apportent des informations sur le genre bactérien étudié et permet donc d'accroître nos connaissances sur la bactérie. De plus, la caractérisation bactérienne permet de mettre en évidence d'éventuels liens de parentés entre les souches et de définir des lignées clonales (Struelens, 1996). Enfin, le fait de définir des types au sein d'une espèce bactérienne permet une meilleure compréhension de la dissémination, des réservoirs naturels et des voies de transmission de cette espèce. Herbert John Webber est le premier à utiliser le terme de clone en 1903 (cité par Orskov et Orskov, 1983) pour désigner une population dont les membres dérivent par multiplication asexuée d'un ancêtre unique. Il a été redéfini en 1982 lors d'une conférence intitulée « *The clone concept in epidemiology, taxonomy and evolution of Enterobacteriaceae and other bacteria* » (Orskov et Orskov, 1983) pour décrire des isolats bactériens collectés indépendamment, de différentes sources, dans différents lieux et à des moments différents, présentant des caractères phénotypiques et génotypiques identiques tels que l'explication la plus probable soit qu'ils aient une origine commune.

La clonalité est donc un concept d'application pratique à utiliser de façon relative puisque l'existence ou non d'une clonalité sera déterminée en fonction du système de typage utilisé et de son interprétation (Eisenstein, 1990 ; Smith *et al.*, 1993). En épidémiologie, la détermination d'un lien de parenté est capitale et permet d'identifier des épidémies, de déterminer leurs origines et de mettre en œuvre des mesures préventives et thérapeutiques.

2.1.2. PARAMETRES D'EVALUATION DES METHODES DE TYPAGE

La valeur d'un système de typage dépend non seulement des conditions dans lesquelles il est appliqué mais également des objectifs de l'étude pour laquelle il est utilisé. Néanmoins, certains critères décrits par Struelens en 1996 restent valables dans tous les cas : la typabilité, la reproductibilité, le pouvoir discriminant et la stabilité d'une méthode de caractérisation.

2.1.2.1. La typabilité

La typabilité est la capacité à obtenir un résultat positif, non ambigu pour chaque souche ; les souches non typables étant celles dont le typage ne donne pas de résultat ou un résultat ininterprétable. Elle correspond donc à la proportion d'isolats qui peuvent être typés en utilisant la méthode en question et est exprimée par la formule suivante : $T=N_t/N$ où N_t est le nombre d'isolats affectés à un type et N le nombre d'isolats testés. T doit ainsi être le plus proche possible de 1.

2.1.2.2. La reproductibilité

La reproductibilité représente la capacité d'un système de typage à classer un isolat dans le même type lors d'essais indépendants, séparés dans le temps et l'espace. Trois concepts sont donc sous-jacents : la reproductibilité « intra » correspond à la proportion de souches typées avec le même résultat à chaque répétition ; la reproductibilité « inter » lors d'essais multiples, et la reproductibilité entre les laboratoires ou les centres d'études. La reproductibilité est exprimée par la formule suivante : $R=N_r/N$ où N_r est le nombre d'isolats

classés dans un même type, lors d'essais indépendants et séparés, et N le nombre d'isolats testés. Idéalement, la reproductibilité d'un système de typage doit être supérieure à 0,95.

2.1.2.3. Le pouvoir discriminant

Le pouvoir discriminant ou spécificité est la capacité à différencier des souches non apparentées. Il est donc défini comme la probabilité que deux souches, choisies au hasard dans une population bactérienne ou deux souches indépendantes, seront distinguées par la méthode de typage employée. Plusieurs indices sont utilisés pour quantifier ce pouvoir discriminant. En général, deux souches appartenant à des types différents peuvent raisonnablement être considérées comme non apparentées. Cependant la conclusion que deux souches du même type sont identiques ou appartiennent au même clone dépend du pouvoir discriminant de la méthode utilisée et de la diversité génétique de la population des souches examinées. Il faut être attentif au fait que des méthodes ayant un pouvoir discriminant élevé peuvent devenir si sensibles qu'elles détecteront des différences qui n'ont qu'un faible intérêt épidémiologique tel que des mutations spontanées.

2.1.2.4. La stabilité

La stabilité (ou sensibilité) des marqueurs épidémiologiques conditionne la capacité d'un système de typage à reconnaître le lien de parenté clonale de souches dérivées, *in vivo* ou *in vitro*, d'une souche commune. En effet, lors du stockage au laboratoire, lors des repiquages ou lors de la dissémination de la souche bactérienne dans la nature, des variations génotypiques ou phénotypiques peuvent se produire du fait de mutations, de recombinaisons intra et/ou inter-espèces (intégration de plasmides, de phages ou d'ADN exogène par transformation). La stabilité *in vitro* peut être évaluée en comparant les souches testées avant et après stockage sur une période de temps donnée et/ou après des passages successifs sur des milieux de culture spécifiques. La stabilité *in vivo* peut être estimée en comparant (i) des souches testées avant et après passage dans un modèle animal approprié, (ii) des isolats collectés au niveau de différents sites anatomiques chez le même patient, ou (iii) des isolats collectés au cours d'épidémies bien renseignées.

Un système de typage intéressant présente donc un équilibre « optimal » entre stabilité et spécificité correspondant à une constance des marqueurs épidémiologiques pour la souche et à leur diversité pour l'espèce.

De nombreux systèmes de typage existent comme nous l'avons rapidement évoqué dans la première partie bibliographique et il est nécessaire de comparer et d'associer des résultats provenant de plusieurs d'entre eux pour augmenter la fiabilité de nos résultats et éventuellement pouvoir mettre en évidence une lignée clonale. La concordance des systèmes de typage (isolats classés de façon équivalente par deux systèmes distincts) et la méthode d'analyse des résultats obtenus sont donc des critères très importants.

2.3. ANALYSE DES RESULTATS OBTENUS PAR LE SYSTEME DE TYPAGE

Cette analyse se fait en trois grandes étapes : lecture des résultats, codification des profils et définition des types. Pour chacune de ces étapes, différentes méthodes peuvent être utilisées (lecture visuelle ou avec analyseur d'images, codification quantitative ou qualitative des profils, définition qualitative ou numérique des types) et les différents choix influenceront la fiabilité du système en privilégiant la spécificité ou la sensibilité.

La lecture des résultats avec un analyseur d'images peut augmenter de façon significative le polymorphisme du caractère étudié du fait d'un haut pouvoir de résolution alors que la lecture visuelle peut, quant à elle, diminuer à la fois la spécificité et la sensibilité de la méthode. Il semble donc important d'envisager le compromis suivant : lecture par un analyseur d'images suivie d'une correction visuelle.

La codification des profils est en général qualitative (réaction biochimique positive ou négative, sensibilité ou résistance à un antibiotique, présence ou non d'un fragment d'ADN). Ainsi, certains auteurs admettent des seuils de tolérance dans la correspondance des fragments pour les techniques de macrorestriction ou d'amplification d'ADN pour lesquelles les profils sont en général considérés de même type lorsque tous les fragments sont identiques (Tenover *et al.*, 1995). On peut éventuellement prendre en compte l'intensité de la réponse (intensité des réactions chimiques colorées, diamètre de sensibilité à un antibiotique, intensité des bandes d'ADN obtenues après électrophorèse) pour avoir une codification quantitative ou semi-quantitative et par conséquent augmenter le polymorphisme du marqueur étudié. Néanmoins, ceci est rarement utilisé et est généralement réservé aux systèmes de typage avec un faible pouvoir discriminant.

Il est également possible de définir des indices d'affinité numériques traduisant la distance ou la similitude entre deux souches. La distance euclidienne d^2 est l'indice habituellement utilisé pour les méthodes de biotypage, de sérotypage et de composition en acides gras. Pour les profils de restriction ou d'amplification de l'ADN, on utilise habituellement l'indice de Dice ou parfois l'indice de Jaccard.

Indice de Dice

$$S_D = \frac{2n_{ab}}{n_a + n_b}$$

Indice de Jaccard

$$S_J = \frac{n_{ab}}{n_a + n_b - n_{ab}}$$

Avec : n_{ab} : nombre de fragments présents sur les deux profils A et B

n_a : nombre de fragments présents sur le profil A

n_b : nombre de fragments présents sur le profil B

L'indice de Dice convient particulièrement lorsque le polymorphisme est élevé, ce qui est souvent le cas dans les méthodes de typage moléculaire. Une fois les différents types définis, on utilise des méthodes dites d'agrégation pour les comparer comme celles du diamètre moyen (UPGMA = Unweighted Pair Group Method of Average linkage) qui regroupe les souches en fonction de leurs similitudes. Des dendrogrammes illustrant la hiérarchie entre les souches et leur degré de similarité peuvent ainsi être construits et discutés. Actuellement, certaines méthodes disponibles sont capables de détecter les plus petites variations génétiques pouvant survenir au cours d'une épidémie ou d'une infection. Ces observations bouleversent le concept de clone et suggèrent qu'il est plus utile de considérer la clonalité comme un phénomène relatif plutôt qu'un concept absolu. Ce problème de classification des souches « similaires » est implicitement reconnu par la désignation de types et de sous-types dans l'interprétation des résultats obtenus par beaucoup de méthodes de typage. Des souches qui diffèrent peu d'un type donné sont considérées comme appartenant à un même sous-type. Cette calibration de la méthode est un des points qui nous paraît essentiel

d'autant plus que la souche étudiée présente une variabilité génomique intrinsèque importante. Il est donc nécessaire de considérer les données épidémiologiques pour pouvoir discuter des liens « réels » existant entre les souches et fixer un seuil à partir duquel les isolats doivent être considérés comme appartenant à un même type.

2.2. CARACTERISATION FONDEE SUR DES CARACTERES PHENOTYPIQUES

Les méthodes traditionnelles pour la différenciation des souches sont fondées sur l'expression des caractères phénotypiques comme par exemple le biotypage, le sérotypage, le lysotypage et l'antibiotypage. Ces techniques sont fréquemment utilisées (en particulier dans les centres nationaux de référence ou dans des centres spécialisés) et conduisent ainsi à l'établissement de différents profils : profils biochimiques (biotypes), profils sérologiques (sérotypes), profils de sensibilité aux phages (lysotypes) et profils de sensibilité aux antibiotiques (antibiotypes). L'avantage de ces techniques est qu'elles sont relativement faciles à effectuer (biotypage et antibiotypage) et que, pour certains germes, elles sont standardisées au niveau international ce qui permet une comparaison directe des résultats provenant de différents laboratoires (sérotypie, lysotypie). Cependant, la limitation de ces systèmes est inhérente à la capacité qu'ont les bactéries à altérer de façon imprévisible l'expression des caractères étudiés (mauvaise reproductibilité). De plus, le pouvoir discriminant de ces méthodes est souvent faible et pour certaines d'entre elles, une proportion non négligeable de souches donnent des résultats nuls (faible typabilité).

Pour surmonter les limites des méthodes de typage phénotypique (problèmes de typabilité, de reproductibilité et de pouvoir discriminant), les microbiologistes ont développé des méthodes moléculaires basées sur la détection de polymorphisme au niveau du matériel génétique des bactéries.

2.3. CARACTERISATION FONDEE SUR DES CARACTERES GENOTYPIQUES

Actuellement, les méthodes génotypiques sont les plus prisées car considérées comme susceptibles d'apporter les informations les plus pertinentes à des fins épidémiologiques. Néanmoins, le coût et la complexité de ces techniques de typage réservent encore leur utilisation à des travaux de recherche. La typabilité de ces méthodes moléculaires est de 100%

(sauf pour le ribotypage quand il n'est pas automatisé). Le séquençage de l'ADN est la technique la plus fiable et la plus informative pour comparer les génomes de deux isolats, étudier le polymorphisme de leurs séquences d'ADN et évaluer leur degré de similitude. Cependant, cette technique longue et laborieuse ne peut être utilisée en routine. Depuis quelques années, des méthodes génotypiques permettant d'étudier le polymorphisme de l'ADN total ou d'une région génomique se sont développées et constituent une alternative au séquençage.

Vanechoutte (1996) a classé les différentes techniques de caractérisation moléculaire répertoriées en fonction du type d'ADN utilisé (ADN plasmidique, ADN chromosomique ou seulement un gène ou une partie d'un gène) et de la technique de révélation du polymorphisme qui est appliquée (électrophorèse, restriction, amplification).

Parmi les différentes techniques de typage moléculaire, certaines sont plus fréquemment utilisées pour caractériser et constituer des groupes en fonction du degré d'identité du génome des différentes souches de *Campylobacter*.

2.3.1. MARQUEURS LIÉS À L'ADN PLASMIDIQUE

La caractérisation du profil plasmidique d'une souche bactérienne consiste en l'analyse du nombre et de la taille des plasmides qu'elle contient par électrophorèse. On peut augmenter le pouvoir discriminant de cette méthode en étudiant le polymorphisme de restriction des plasmides isolés mais elle reste de toute façon limitée à l'étude d'évènements ponctuels en raison du caractère dynamique de la présence des plasmides dans les bactéries.

Les plasmides sont en général acquis par la bactérie lors de transferts horizontaux, parfois entre des isolats appartenant à des espèces différentes. Par conséquent, leur caractérisation ne permet pas la mise en évidence de liens clonaux entre les différentes souches étudiées (Tenover *et al.*, 1995), contrairement à l'étude du chromosome, transmis de façon verticale entre les générations. De plus, la valeur des plasmides comme marqueurs épidémiologiques est limitée étant donné les variations importantes de la présence et du nombre de plasmides d'une espèce à l'autre (Tenover *et al.*, 1985b ; Sagara *et al.*, 1987). Par exemple, dans une étude de Cabrita *et al.* (1992) seuls 12,7 % des isolats de *C. jejuni* étaient porteurs de plasmides (contre 48,5% pour les isolats de *C. coli*). Ces auteurs ont également souligné que la présence et le nombre de plasmides variaient en fonction de l'animal hôte

(taux de présence de plasmides de 53,8 %, 45,5 % et 22 % pour des isolats issus respectivement de porcs, rats et poulets). Cette variation en fonction de l'animal hôte contaminé par *Campylobacter* a également été observée par Lekowska-Kochaniak *et al.*, en 1996. L'utilisation des profils plasmidiques ne semble pas donner de résultats satisfaisants pour différencier des isolats de différentes origines impliqués dans des épidémies (Patton *et al.*, 1991) ou pour établir une relation entre la présence ou la taille des plasmides et le sérotype de la souche (Lind, 1989). Les *Campylobacter*, naturellement compétents, peuvent ainsi acquérir de l'ADN plasmidique homologue ou non homologue, souvent porteur de caractéristiques particulières (Richardson et Park, 1997 ; Wassenaar, 2000). Plusieurs auteurs ont établi un lien entre la présence de plasmides et l'acquisition d'une résistance à certains antibiotiques : Taylor *et al.* (1983), Cabrita *et al.* (1992), Prasad *et al.* (1994) ont par exemple mis en évidence que la tétracycline était portée par des plasmides. Vraisemblablement, l'analyse des profils plasmidiques semble importante lors de l'étude de clones résistants aux antibiotiques ou à d'autres molécules et pour la compréhension des mécanismes de virulence chez certains *Campylobacter* pathogènes (Bacon, 2000 ; Bacon, 2002). Dans ce cas, cette analyse devrait alors inclure une étude plus détaillée de la cartographie génétique de plasmide tels que la détermination des transposons ou des gènes portés par les plasmides par exemple.

2.3.2. MARQUEURS LIES A L'ADN CHROMOSOMIQUE

Le polymorphisme de l'ADN est utilisé comme marqueur génétique d'identification des individus dans de nombreux domaines. Au sein d'une population, le polymorphisme, défini comme la résultante de variations dans la séquence d'ADN, se traduit soit par l'apparition de différents phénotypes, soit par des modifications des profils de restriction. Au sein du génome, différents phénomènes sont responsables du polymorphisme :

- des mutations dues à un remplacement d'une ou plusieurs bases par d'autres sans changement dans la longueur de l'ADN,
- des insertions ou des délétions correspondant respectivement à l'ajout ou à la disparition de bases dans la séquence d'ADN,
- des réarrangements chromosomiques dus à des recombinaisons génétiques ou à l'insertion de transposons.

2.3.2.1. Polymorphisme révélé par restriction

✓ Analyse de restriction classique :

♦ **Analyse RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Le principe repose sur la comparaison de profils de coupure par les enzymes de restriction suite à l'existence d'un polymorphisme dans la séquence d'une molécule d'ADN par rapport à une autre. Dans les premières études réalisées sur le chromosome bactérien, des enzymes de restriction, endonucléases coupant l'ADN bicaténaire au niveau de sites spécifiques de 4 à 6 nucléotides (site de restriction), ont été utilisées pour générer différents fragments d'ADN. Pour un génome bactérien, cette technique produit un grand nombre de fragments de restriction (supérieur ou égal à 1000) séparés ensuite par une électrophorèse horizontale classique sur gel d'agarose ou sur gel d'acrylamide en présence d'un marqueur de poids moléculaire. La variation de la taille des fragments obtenus traduit alors le polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP). Généralement, ce polymorphisme peut provenir de la variation de certaines bases se traduisant par l'absence ou la présence de sites de restriction dans le génome, d'insertions, de délétions ou de réarrangements de l'ADN dans la région comprise entre deux sites de restriction constants.

Cette technique a été utilisée pour typer des isolats de *Campylobacter* dans des études épidémiologiques, malgré les difficultés rencontrées pour interpréter les profils de restriction. Kakoyiannis *et al.*, en 1984 puis en 1988, ont confirmé l'intérêt de cette technique pour l'étude de *Campylobacter*. Ils ont montré la stabilité de la technique en mettant en évidence la stabilité des profils de restriction obtenus après 23 repiquages sur gélose pour 4 isolats sur une période de 45 jours (Kakoyiannis *et al.*, en 1984). Par ailleurs, ils ont mis en évidence la typabilité et le pouvoir discriminant de cette technique puisque dans leur seconde étude, parmi les 60 profils de restriction obtenus à partir du typage de 316 isolats d'origine humaine, 11 étaient identiques à des profils obtenus à partir d'isolats d'origine aviaire (Kakoyiannis *et al.*, 1988). Dans cette technique, le pouvoir discriminant est lié au choix de l'enzyme de restriction utilisée, *HindIII*, utilisée dans les deux études précédemment citées, et *HaeIII* (Owen *et al.*, 1990) sont deux des plus discriminantes pour les souches étudiées mais d'autres enzymes telles que *XhoI*, *BglIII*, *PvuII*, *PstI*, *ClaI*, *CfoI* ont permis également de différencier les *Campylobacter* au niveau de l'espèce et au sein de l'espèce (Owen *et al.*, 1989 ; Moureau *et al.*, 1989 ; Patton *et al.*, 1991 ; Korolik *et al.*, 1995).

L'analyse de restriction du chromosome bactérien est une technique fiable pour typer les bactéries. Cependant, en raison de la complexité des profils obtenus et des difficultés d'interprétation, de nouvelles méthodes d'analyse de restriction permettant de diminuer le nombre de fragments ont été développées.

✓ Techniques de restriction diminuant le nombre de fragments de restriction

♦ **Macrorestriction suivie d'une électrophorèse en champ pulsé PFGE**
(Pulse Field Gel Electrophoresis)

Cette analyse porte également sur la totalité du génome bactérien et l'utilisation d'enzymes de restriction avec des sites de coupures relativement rares permet de diminuer le nombre de fragments de restriction. Une électrophorèse en champ pulsé permettant la séparation des fragments de grande taille (entre 50 et 1000 kb) avec une bonne résolution est ensuite mise en œuvre (Schwartz *et al.*, 1983). Les profils d'électrophorèse obtenus sont alors caractéristiques pour chacune des souches. Cette technique d'électrophorèse consiste en l'application de deux champs électriques alternatifs d'orientation différente (de 90° à 180° selon les systèmes) à l'aide d'un pulseur pendant un temps déterminé appelé temps d'inversion ou temps de pulsation. Le principe de séparation est basé sur la vitesse différentielle de réorientation des molécules au moment de l'alternance des deux champs électriques. Ainsi, les grandes molécules d'ADN mettront plus de temps à s'orienter selon la direction du second champ électrique que celles de plus petite taille. L'accumulation du retard à chaque alternance aboutit à la séparation des molécules en fin de migration. Différents paramètres comme le pourcentage en agarose, la tension appliquée ou encore la température vont permettre d'optimiser la résolution mais le paramètre principal est le temps de pulsation (temps d'application du champ électrique dans chaque orientation).

Parmi les techniques existantes, la plus utilisée est la technique CCHEF (Contour Clamped Homogeneous Electric Field) où les champs alternatifs parfaitement homogènes sont orientés soit à 90° par l'intermédiaire de 16 électrodes en carré autour du gel, soit à 120° grâce à 24 électrodes en hexagone autour du gel. Cette dernière configuration donne les meilleurs résultats avec des trajectoires de migration parfaitement rectilignes et indépendantes de la position de l'échantillon dans le gel.

Cette technique est actuellement considérée comme une des plus performantes pour la caractérisation des souches de *Campylobacter* en raison de son fort pouvoir discriminant et de sa reproductibilité (notamment la macrorestriction de l'ADN avec *SmaI* et *KpnI*). Les applications sont multiples puisqu'elle a d'abord été utilisée pour déterminer la taille et la cartographie du chromosome bactérien, notamment pour *C. jejuni* (Chang *et al.*, 1990 ; Kim *et al.*, 1992), *C. coli* (Taylor *et al.*, 1992), *C. fetus* (Salama *et al.*, 1992 ; Salama *et al.*, 1995), *C. lari* (Matsumoto *et al.*, 1992) ou encore *C. upsaliensis* (Bourke *et al.*, 1995). Ensuite, Yan *et al.*, en 1991, ont montré sa fiabilité (avec l'enzyme *SmaI*) pour différencier les espèces de *Campylobacter* et pour typer des souches au sein de l'espèce. Ces résultats ont été confirmés par de nombreuses études (Suzuki *et al.*, 1994 ; Gibson *et al.*, 1995 ; Slater *et al.*, 1998 ; Broman *et al.*, 2004 ; Guévremont *et al.*, 2004 ; Denis *et al.*, 2008a) et cette technique est ainsi souvent employée pour déterminer les voies de transmission des pathogènes dans le cadre d'investigations épidémiologiques (Hänninen *et al.*, 1998 ; Hume *et al.*, 2002 ; Rivoal *et al.*, 2005 ; Soutos et Madden, 2007 ; Denis *et al.*, 2008b). Cependant, l'utilisation de plusieurs enzymes de restriction (les plus courantes : *SalI*, *SmaI*, *KpnI*, *SacII*) est nécessaire pour améliorer le pouvoir discriminant de cette technique et permettre la détermination des sources et des voies de contamination lors d'épidémies ou de cas sporadiques de campylobactérioses (Imai *et al.*, 1994 ; Gibson *et al.*, 1997 ; Hänninen *et al.*, 1998 ; On *et al.*, 1998 ; Rivoal *et al.*, 2005).

De plus, la macrorestriction associée à d'autres marqueurs phénotypiques ou génotypiques a également permis la mise en évidence de lignées clonales au sein des espèces de *Campylobacter* (Gibson *et al.*, 1997 ; On *et al.*, 1998 ; Harrington *et al.*, 1999 ; Laturus *et al.*, 2005 ; Rivoal *et al.*, 2005).

La technique de macrorestriction de l'ADN chromosomique avec deux enzymes suivie d'une PFGE est donc une technique de référence dans les systèmes de typage bactérien. En revanche, elle nécessite un investissement en équipement plus onéreux que les deux autres méthodes précédemment décrites.

Cependant la stabilité de la macrorestriction comme marqueur de clonalité a récemment été remise en cause et doit donc être utilisée avec précaution. En effet, des variations de profils de restriction ont été observées par On en 1998 lors de l'étude de six souches de *C. coli* repiquées 50 fois *in vitro* sur une période de 6 mois et semblent résulter de réarrangements génomiques intramoléculaires de faible importance. De plus, Wassenaar *et*

al., en 1998, ont obtenu des profils de macrorestriction relativement similaires, mais pas identiques, parmi des isolats issus d'un même lot de viande de volailles et qui, par ailleurs avaient des caractères génotypiques (*flaA* type) et phénotypiques (sérotypage, biotype, lysotype) identiques. Ces isolats ont ainsi été considérés comme ayant une origine clonale malgré les variations observées dans leur profil de macrorestriction. L'origine de ces variations dans les profils est attribuée à des réarrangements génomiques dont les mécanismes ne sont pas élucidés mais peuvent également cacher des modifications génomiques plus complexes (Boerlin *et al.*, 1996). En 1999, Hänninen *et al.* ont montré l'instabilité génomique de deux souches sur 12 souches de *C. jejuni* d'origine humaine et aviaire étudiées par macrorestriction (3 enzymes), ribotypage et sérotypage après passage dans des intestins de poussins.

♦ **Amplification sélective de fragments de restriction**

Deux principales méthodes ont été développées pour réduire le nombre observable de fragments de restriction de l'ADN chromosomique par amplification sélective, l'AFLP™ (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Zabeau et Vos, 1993 ; Vos *et al.*, 1995) et l'IRS-PCR (Infrequent Restriction Site – Polymerase Chain Reaction) (Mazurek *et al.*, 1996). Ces approches ont en commun une étape de ligation d'oligonucléotides double brin, appelés adaptateurs, aux fragments de restriction. Ces adaptateurs possèdent une extrémité simple brin complémentaire de façon partielle ou totale avec les séquences des sites de restriction des enzymes utilisées. Cette étape nécessaire permet ainsi une amplification sélective de seulement quelques fragments de restriction.

Pour l'AFLP™, la première étape consiste en la digestion des ADN par deux enzymes de restriction coupant respectivement au niveau d'un site rare et d'un site fréquent suivie de la ligation des adaptateurs aux extrémités des fragments de restriction obtenus. Les amorces utilisées pour l'amplification possèdent donc une séquence complémentaire de l'adaptateur, du site de restriction et d'une extension sélective dans le fragment de restriction (ces amorces portent sur leur extrémité 3'OH des extensions aléatoires de 1 à 3 bases permettant l'amplification sélective d'une partie seulement des fragments de restriction). Lors de l'amplification, troisième étape, seuls les fragments possédant cette extension bordant le site de restriction sont amplifiés. Les produits d'amplification sélective sont ensuite séparés sur un gel de polyacrylamide dénaturant. La détection des fragments amplifiés est obtenue soit par coloration des gels à l'argent, soit par autoradiographie ou émission de fluorescence. Dans ce

cas, une des amorces d'AFLP™ (généralement celle correspondant au site de restriction rare) est marquée soit radioactivement, soit par un fluorochrome (dans le cas d'une analyse à l'aide d'un séquenceur automatique).

Le pouvoir discriminant de cette technique dépend du choix des enzymes, avec un protocole de base combinant une enzyme de restriction avec une fréquence de sites de reconnaissance moyenne à une enzyme à sites de coupure fréquents. Néanmoins, des versions simplifiées avec une seule endonucléase ont été développées (Valsangiacomo *et al.*, 1995). Une autre stratégie est l'IRS-PCR qui utilise une enzyme à site de coupure rare et une enzyme à site de coupure fréquent pour digérer l'ADN génomique. La sélectivité de l'amplification est basée sur une différence dans les adaptateurs (Mazurek *et al.*, 1996).

Ces techniques d'amplification sélective de fragments de restriction présentent un grand intérêt en taxonomie bactérienne puisqu'elles permettent d'étudier l'intégralité du génome bactérien sans connaissance préalable sur la séquence. En 1996, Janssen *et al.* ont mis en évidence une similarité des résultats entre la technique AFLP™ et les techniques traditionnellement utilisées en taxonomie (hybridation ADN-ADN, analyse des acides gras). Ces auteurs ont également souligné un pouvoir discriminant et des qualités techniques supérieures pour la technique AFLP™, notamment une grande reproductibilité.

L'application de la technique d'AFLP™ au typage bactérien est relativement récente (Kokotovic et On, 1999). Duim *et al.* (1999) ont utilisé cette technique avec les enzymes *Hind*III et *Hha*I pour typer des souches de *C. jejuni* et de *C. coli* d'origine humaine et aviaire. Une différenciation inter- et intra-espèce conjuguée à la mise en évidence de lignées clonales est ainsi possible avec cette technique (Duum *et al.*, 1999 ; Siemer *et al.*, 2005 ; Wittwer *et al.*, 2005 ; Fang *et al.*, 2006).

♦ **Restriction classique suivie d'une hybridation sélective**

L'application la plus répandue de cette technique est la ribotypie qui utilise l'ADN codant pour les ARN ribosomiques. Pour le ribotypage, la totalité de l'ADN bactérien est digérée par une enzyme de restriction avant séparation par électrophorèse et révélation des fragments grâce à des sondes correspondant à des ARNr 16S et 23S (Stanley *et al.*, 1995). Cette technique, stable et reproductible, permet de réaliser des études taxonomiques et phylogénétiques et de typer de nombreuses bactéries. Son pouvoir discriminant dépend là

encore de l'enzyme de restriction et de la sonde choisies et semble être amélioré par l'emploi combiné de deux enzymes de restriction (Owen *et al.*, 1990). La plupart des analyses sont basées sur la digestion de l'ADN génomique par les enzymes *Hae*III (Owen *et al.*, 1990), *Pvu*II et *Pst*I (Patton *et al.*, 1991). Les sondes utilisées correspondent à des fragments d'ADN contenant les opérons ARNr *16S* et *23S* d'*Escherichia coli* ou de *C. jejuni* NCTC 11168 (Owen *et al.*, 1993 ; Kielhbauch *et al.*, 1994). Cependant, étant donné que les espèces de *Campylobacter* ne possèdent que trois copies du gène *16S* ARNr, la discrimination entre les isolats est souvent insuffisante (Gibson *et al.*, 1995).

2.3.2.2. Polymorphisme révélé par amplification

✓ **La RAPD** (Random Amplified Polymorphic DNA) : polymorphisme d'ADN par amplification aléatoire

L'analyse RAPD est fondée sur l'utilisation pour l'amplification par PCR d'une seule amorce oligonucléotidique de courte taille (en général 10 nucléotides) dont la séquence est choisie de façon aléatoire (Fayos *et al.*, 1993). Une telle amorce, dans des conditions PCR non stringentes, peut alors s'hybrider en de multiples sites sur les deux brins d'ADN. Lorsque cette amorce s'hybride sur des brins opposés avec des extrémités 3' et à une distance appropriée, le fragment situé entre les deux sites d'hybridation est amplifié. Cette technique permet donc d'amplifier de multiples fragments de différentes tailles séparés ensuite par électrophorèse classique sur gel d'agarose. Cette technique est une technique simple, rapide et discriminante pour le typage de nombreuses espèces bactériennes. Cependant, en raison notamment des conditions PCR non stringentes, elle est extrêmement sensible aux conditions expérimentales et ses qualités de répétabilité et de reproductibilité s'en trouvent affectées (Struelens *et al.*, 1996). De nombreux facteurs tels que la concentration des amorces, les conditions d'amplification, la concentration en MgCl₂, la qualité et la quantité d'ADN de l'échantillon ou de l'enzyme utilisée ainsi que la qualité du thermocycleur peuvent influencer, de façon significative, la reproductibilité de la réaction (Meunier et Grimont, 1993). De plus, la lecture des profils est subjective en raison d'une amplification non homogène des fragments produisant des variations d'intensité sur les profils ADN (Burr *et al.*, 1997).

Toutefois, cette technique a été largement appliquée au typage des *Campylobacter* pour déterminer les sources et les voies de transmission des campylobactérioses. Mazurier *et*

al., en 1992, ont testé trois amorces différentes sur des isolats de *C. jejuni* de sérotypes différents. Parmi les 26 souches étudiées, ils ont obtenu respectivement trois, neuf et dix profils RAPD distincts avec les trois enzymes et ils ont mis en évidence des différences entre des souches de sérotypes différents mais également entre des souches de même sérotype. Dans une étude réalisée par Fayos *et al.*, en 1993, l'analyse RAPD a fourni des résultats similaires à ceux obtenus par ribotypie pour différencier 26 souches de *C. jejuni* mais elle s'est révélée moins reproductible. Hernandez *et al.* (1995) ont utilisé la même amorce OPA-11 sur un grand nombre d'isolats de *Campylobacter* (au total 208). Dans cette étude, l'analyse RAPD a permis de typer 178 isolats sur les 208 (l'explication la plus probable pour cette absence d'amplification est la production d'une désoxyribonucléase par ces isolats) et a révélé 118 profils distincts répartis en trois clusters principaux permettant de différencier trois espèces, *C. coli*, *C. jejuni* et *C. lari* (résultats confirmés par les mêmes auteurs en 1996). Dans l'étude réalisée par Madden *et al.* en 1996, l'analyse RAPD s'est révélée être moins performante que la ribotypie pour différencier 32 souches de *Campylobacter spp.*, mais plus discriminante que la technique de typage visant un gène flagellaire (décrite par la suite dans ce chapitre) pour le typage des *Campylobacter*. L'utilisation d'une amorce spécifique de séquence 5'-CCT GTT AGC C-3' leur a permis de mettre en évidence un profil identique pour des isolats de *C. jejuni* provenant d'une épidémie (Madden *et al.*, 1996). Cette amorce a donc ensuite été utilisée avec succès par ces mêmes auteurs en 1998 pour étudier la fréquence et la diversité génomique de *Campylobacter spp.* dans la viande rouge et dans la viande de volaille en Irlande du Nord (Madden *et al.*, 1998). Cette technique présente donc un intérêt pour les études épidémiologiques ponctuelles, limitées dans le temps et l'espace (Hernandez *et al.*, 1995 ; Madden *et al.*, 1996 ; Madden *et al.*, 1998).

✓ **ERIC-PCR** : Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus

Des séquences d'ADN répétitives présentes sur le génome en position intergénique (le nombre de répétitions étant plus ou moins caractéristique d'une souche) sont amplifiées par PCR. Une électrophorèse des fragments obtenus permet de visualiser les différentes portions d'ADN et les profils peuvent alors être comparés (Weijtens *et al.*, 1997). Outre les séquences en position intergénique (ERIC), des séquences répétées conservées appelées REP (Repetitive Extragenic Palindromic) ont également été décrites (Versalovic *et al.*, 1991).

Cette technique a été relativement peu appliquée à la caractérisation des *Campylobacter* (Versalovic *et al.*, 1991 ; Endtz *et al.*, 1993 ; Van Belkum *et al.*, 1993) et les auteurs préconisent l'emploi de plusieurs techniques pour conclure à la définition d'une parenté clonale entre différents isolats. En 1997, Weijtens *et al.* ont montré que cette technique pouvait être utilisée pour déterminer une parenté clonale entre des isolats provenant d'un même lieu et dans un espace de temps limité, mais que son utilisation pour étudier des isolats provenant d'endroits différents, à des moments différents, devait être évitée et pouvait conduire à des conclusions erronées. Ces résultats sont confirmés par une autre étude de Weijtens *et al.*, en 1999, sur la diversité génomique de *Campylobacter* chez le porc. Lentzsch *et al.*, en 2004, ont utilisé cette méthode pour génotyper des souches de *C. upsaliensis* d'origines géographiques différentes. Cette étude révèle l'existence de deux groupes génotypiquement différents qui représentent respectivement les souches d'origine allemande et les souches non européennes.

2.3.3. MARQUEURS LIÉS À DES GÈNES OU À DES PARTIES DE GÈNES

Avec l'avènement des techniques d'amplification par PCR, il est devenu possible d'étudier le polymorphisme d'un gène ou d'une partie d'un gène, que celui-ci soit codé par un plasmide ou par un chromosome. L'amplification par PCR permet alors d'isoler et de purifier le gène, dont le polymorphisme est ensuite révélé par restriction ou par amplification.

2.3.3.1. Polymorphisme révélé par restriction

✓ PCR-RFLP

On appelle polymorphisme de restriction, des variations de la séquence d'ADN révélées par des modifications de la carte de restriction qui traduisent un polymorphisme génotypique. Cette technique consiste en la comparaison des fragments d'ADN obtenus après digestion par des enzymes de restriction des produits de PCR, PCR ciblée sur un ou plusieurs gènes relativement conservés. Cette application, sur les gènes codant pour l'ARNr par exemple, apporte des informations phylogénétiques et taxonomiques sur l'espèce étudiée. Elle peut également être utilisée pour le typage en ciblant des gènes possédant une variabilité au sein de l'espèce, sur les gènes codant pour les protéines par exemple.

Pour *Campylobacter*, l'analyse du polymorphisme de restriction des gènes codant pour les unités 23S des ARNr chez 47 souches cliniques de *C. jejuni* a confirmé la conservation de ces gènes au sein de l'espèce puisque la majorité des souches (39/47) appartenaient à un même type parmi les 7 types différents déterminés suite à la combinaison des profils obtenus par trois enzymes de restriction (*HpaII*, *AluI* et *DdeI*). Cette étude confirme donc la pertinence du choix de ce gène comme cible PCR pour la détection et l'identification de *Campylobacter* et à l'inverse son inutilité dans des études de traçabilité de *Campylobacter* du fait d'un faible pouvoir discriminant.

La restriction appliquée à des gènes codant pour des protéines s'est au contraire révélée dans de nombreux cas très utile pour des études de traçabilité et de typage de *Campylobacter*. Deux systèmes ont principalement été développés pour le typage des *Campylobacter*.

Le premier est basé sur le polymorphisme des gènes *flaA* et *flaB* codant pour les deux unités protéiques composant le flagelle de *Campylobacter spp.*. L'étude de Alm *et al.* (1993c) a mis en évidence un polymorphisme de restriction au sein des gènes *flaA* et *flaB* en développant un système d'amorces permettant d'amplifier séparément le gène *flaA* (amorces pg50 et RAA19, amplicon de 1448 pb) et le gène *flaB* (amorces RAA9 et RAA19, amplicon de 1459 pb). Les deux produits PCR sont alors digérés par deux endonucléases (*PstI* et *EcoRI*) et les fragments obtenus séparés par une électrophorèse classique sur gel d'agarose. Cette étude a confirmé l'homologie de séquence entre les deux gènes et l'intérêt du polymorphisme du gène *flaA* pour typer les *Campylobacter*. Les auteurs ont en effet mis en évidence pour ce gène *flaA* 12 profils de restriction différents parmi les 41 souches de *Campylobacter* appartenant à 13 sérogroupes de Lior distincts. Mohran *et al.*, en 1996, ont appliqué cette méthode à une étude épidémiologique dans laquelle ils ont mis en évidence 14 *flaA* profils et 11 *flaB* profils parmi 59 isolats cliniques. Lors de ce travail, 12 des 14 profils *flaA* étaient identiques à ceux obtenus par Alm *et al.* (1993c) mais contrairement aux résultats de cette étude, Mohran *et al.* ont observé l'existence d'un polymorphisme du gène *flaA* au sein d'un même séro groupe de Lior. Certains auteurs ont augmenté le pouvoir discriminant de cette technique en utilisant d'autres enzymes de restriction, principalement *DdeI* ou *HindII*. Les résultats de différentes études montrent que la technique PCR-RFLP sur le gène *flaA* est moins discriminante que la macrorestriction suivie d'une électrophorèse en champ pulsé (Santesban *et al.*, 1996 ; Slater *et al.*, 1998).

En 1993, Nachamkin *et al.* ont également développé un système de typage basé sur le polymorphisme du gène *flaA* en utilisant un couple d'amorces différent conduisant à un produit PCR de 1700 pb digéré ensuite par l'enzyme *DdeI*. Dans cette étude, 18 *flaA* profils différents ont été obtenus parmi 43 souches de *Campylobacter* isolées de cas sporadiques aux Etats-Unis appartenant à six sérotypes de Penner distincts. En 1996, elle a été appliquée à un nombre plus important d'isolats de *C. jejuni* et de *C. coli* et a mis en évidence 83 *flaA* profils différents parmi les 404 isolats étudiés (Nachamkin *et al.*, 1996). Par la suite, de nombreuses études épidémiologiques ont utilisé ce système d'amorces (Chuma *et al.*, 1997 ; Stern *et al.*, 1997 ; Owen et Leeton, 1999 ; Nielsen *et al.*, 2000 ; Petersen *et al.*, 2001 ; Harrington *et al.*, 2003 ; Laturus *et al.*, 2005 ; Rivoal *et al.*, 2005).

Plusieurs autres systèmes ont été développés avec un jeu d'amorces différents et/ou des enzymes de restriction différentes (Koenraad *et al.*, 1995 ; Ayling *et al.*, 1996 ; Thomas *et al.*, 1997 ; Studer *et al.*, 1999). Toutefois, la stabilité du polymorphisme du gène *flaA*, comme marqueur épidémiologique, a été remise en question par Harrington *et al.* en 1997. En effet, les auteurs ont mis en évidence dans cette étude l'existence de recombinaisons entre les gènes *flaA* et *flaB* d'une même souche (intra-génomique) et entre les gènes *flaA* de différentes souches (inter-génomique). Cette étude remet donc partiellement en cause l'utilisation de ce système de typage pour étudier des isolats lors de longues études épidémiologiques et souligne, dans tous les cas, l'importance de nuancer l'interprétation des résultats.

Le second système de caractérisation, spécifique de l'espèce *C. jejuni*, a été développé par Ragimbeau *et al.*, en 1998. Il est basé d'une part sur la restriction du gène codant pour la sous unité A de la gyrase (*gyrA*) (Wang *et al.*, 1993) et d'autre part sur la restriction du gène impliqué dans le mécanisme d'invasion des cellules eucaryotes (*pflA*) (Yao *et al.*, 1994). L'amplification des deux gènes se fait simultanément par une PCR multiplex et les deux produits PCR (1681 pb pour *gyrA* et 2026 pb pour *pflA*) sont ensuite digérés simultanément par quatre enzymes (*HhaI*, *HinfI*, *HindIII* et *DdeI*). Les auteurs ont observé 12 profils différents parmi les 18 souches de *Campylobacter* testées. De plus, cette technique associée à la PCR-RFLP basée sur le polymorphisme du gène *flaA* (Alm *et al.*, 1993c) permet d'obtenir une discrimination équivalente à la macrorestriction avec *SmaI* et *KpnI* (Ragimbeau *et al.*, 1998).

De nouveaux systèmes de typage basés sur le polymorphisme de gènes codant pour différents constituants des bactéries, faciles à mettre en œuvre, ont été développés. Fry *et al.* (1999), Shi Feng *et al.* (2002) ainsi que Klena *et al.* (2004) ont travaillé sur un groupe de gènes codant pour le lipopolysaccharide (LPS), Nakari *et al.* (2004) ont amplifié un fragment du gène codant pour le lipooligosaccharide (LOS). Plus récemment, Miller *et al.*, en 2007, ont utilisé un gène codant pour la nitrate réductase.

Ces techniques de typage permettent (i) d'obtenir une discrimination intéressante entre les souches, et (ii) de mettre en évidence une parenté clonale entre différents isolats. Cependant, elles portent sur une partie restreinte du génome et il est ainsi souvent nécessaire de les combiner avec une technique étudiant la totalité du génome ou encore d'étudier le polymorphisme de plusieurs gènes ou parties de gènes.

✓ La technique MLST (Multi Locus Sequence Typing)

Le principe de la technique est d'amplifier puis de séquencer plusieurs gènes conservés au sein de l'espèce (en général sept) et d'en définir les différents allèles présents pour chaque souche : on obtient ainsi une séquence-type, spécifique d'une souche (Dingle *et al.*, 2001). Ces gènes sont des gènes dits « de ménage » (« housekeeping genes » : *aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkl* et *uncA*) et codent pour des enzymes du métabolisme intermédiaire. Cette méthode permet une forte discrimination des isolats ainsi qu'une analyse précise de la structure génétique des populations et des mécanismes d'évolution de la bactérie (Schouls *et al.*, 2003). Une base de données spécialisée (<http://pubmlst.org/Campylobacter/>) est disponible pour la centralisation des résultats et l'analyse globale de la population. Cette technique est très intéressante du fait de la reproductibilité des données du séquençage d'un laboratoire à un autre, de l'accessibilité à des bases de données et de son fort pouvoir discriminant. Néanmoins, elle est peu utilisée en routine du fait de son coût, de la charge supplémentaire en travail et de la nécessité d'un investissement matériel conséquent pour le séquençage.

Il a cependant été démontré par Sails *et al.* (2003b) que même si la technique MLST présente différents avantages (reproductibilité, standardisation, contribution à la centralisation des données), il est nécessaire de la coupler à une autre méthode pour obtenir un niveau de discrimination équivalent à celui obtenu par la macrorestriction suivie d'une PFGE.

2.3.3.2. Polymorphisme révélé par amplification : Cas de la ribotypie par PCR

En 1993, Jensen *et al.* ont montré pour les bactéries possédant plusieurs copies des gènes codant pour les ARN ribosomiques (trois dans le cas de *Campylobacter*), qu'il existe, outre les variations inter-géniques des gènes ARNr *16S* et *23S* entre les espèces d'un même genre et au sein d'une espèce, des variations en longueur et en séquence de ces régions au sein du génome.

L'amplification de ces espaces inter-géniques *16S-23S* génère ainsi des fragments de différentes tailles observables sur gel d'agarose classique. Cependant, cette technique, utilisée pour le typage de *Salmonella* (Nastasi *et al.*, 1997), n'a pas été appliquée pour le typage de *Campylobacter* mais pour différencier *C. coli* et *C. jejuni* (Christensen *et al.*, 1999).

Néanmoins, Payne *et al.* (1999) ont utilisé cette technique basée sur le polymorphisme de longueur d'un gène hautement conservé en amplifiant le gène codant pour l'unité *23S* des ARNr d'isolats de *C. jejuni* dans une étude épidémiologique sur le rôle de la litière dans la transmission de la bactérie aux poulets. Ils ont ainsi mis en évidence une parenté clonale pour ces isolats de *C. jejuni* et les différences observées par la technique RAPD avec l'amorce OPA 11 semblent ainsi être dues à des réarrangements génomiques chez ces isolats clonalement liés. Eyers *et al.*, dans une étude plus ancienne datant de 1993, avait également utilisé l'amplification de ce gène avec des amorces spécifiques pour différencier les espèces de *Campylobacter* thermotolérants.

Les techniques de typage permettent une identification précise des souches et peuvent apporter des informations sur les relations phylogénétiques entre celles-ci, ce qui en fait des outils intéressants en épidémiologie (Dingle *et al.*, 2005 ; Thakur et Gebreyes, 2005). Ces méthodes de caractérisation épidémiologique des souches de *Campylobacter* apparaissent comme informatives ponctuellement mais sont spécifiques à l'étude, ce qui rend difficile la comparaison des résultats obtenus dans différents travaux. De plus, elles ont été, jusqu'à présent, relativement peu utilisées pour la description épidémiologique des souches en élevage porcin et en abattoir. Etant donné le peu de recul concernant l'exploitation des données obtenues par ces méthodes, leur intérêt pour identifier l'origine des contaminations et les modalités de transmission n'est pas connu.

2.4. CONCLUSION ET CHOIX DES METHODES DE TYPAGE MOLECULAIRE

Au départ, la caractérisation de *Campylobacter* était basée sur des caractères phénotypiques, en particulier biochimiques et sérologiques. Avec l'avènement de la biologie moléculaire, de nouvelles techniques ont alors vu le jour, fondées sur l'étude des caractères génotypiques des organismes. Ces méthodes ont permis non seulement de développer nos connaissances sur les sources et les voies de transmission des bactéries mais également de définir l'existence d'une parenté clonale entre différentes souches de *Campylobacter*.

La plupart des techniques dont nous disposons sont comparatives : elles permettent de tester des groupes d'isolats distincts et de les comparer pour différencier les isolats étroitement reliés de ceux plus éloignés d'un point de vue génomique. Outre leur utilité (i) pour mener des enquêtes relatives à une épidémie ou à des cas sporadiques, et (ii) pour incriminer une source alimentaire ou éventuellement environnementale, ces techniques de typage permettent également de déterminer la dissémination clonale dans un environnement (élevage ou usine de production par exemple) et d'identifier l'origine des contaminations. Cette approche comparative requiert des méthodes spécifiques différentes de celles des systèmes de surveillance qui exercent le suivi de la dissémination et de la prédominance de lignées clonales sur de très longues périodes de temps. En effet, les approches phylogéniques ou des systèmes de surveillance nécessitent le recours à des systèmes de typage stables (par conséquent peu sensibles à l'instabilité génétique propre à *Campylobacter*), de classement, standardisés et utilisant une nomenclature harmonisée, ce qui n'est pas le cas des approches comparatives.

Le génome de *Campylobacter*, naturellement transformable, présente une grande hétérogénéité génétique due à des mécanismes de recombinaisons importants. La particularité de ce génome, dit « génome mosaïque », fait qu'il est très difficile de trouver un système de typage adapté à cette bactérie très peu clonale. Il est donc important de pouvoir caractériser la bactérie tout en favorisant la mise en évidence de liens de parenté susceptibles d'être masqués par ces phénomènes de réarrangements génomiques. Pour arriver à ce résultat, il est nécessaire de combiner plusieurs techniques de typage, aux particularités propres. En effet, une étude de Wittwer *et al.* (2005) montre que les conclusions sont différentes si on se base uniquement sur les résultats obtenus par *flaA* PCR-RFLP ou si on les combine à ceux obtenus par AFLP™.

Par conséquent, le choix de la technique de typage est fondamental et dépend de conditions de l'étude et de ses objectifs. Dans le cas d'une étude sur le long terme, des méthodes moins sensibles aux variations génomiques de *Campylobacter* telles que l'AFLP™ ou la MLST seront plus adaptées alors que pour des études restreintes dans le temps et l'espace (localisées au sein d'un élevage par exemple), l'utilisation de techniques plus rapides et moins coûteuses telle que la macrorestriction suivie d'une PFGE, la RAPD ou la PCR-RFLP peut être envisagée malgré leur sensibilité à l'instabilité génomique de *Campylobacter*.

Dans notre travail, nous avons choisi une stratégie associant une méthode avec un fort pouvoir discriminant étudiant la globalité du génome, à savoir la macrorestriction avec deux enzymes suivie d'une électrophorèse en champ pulsé (Rivoal *et al.*, 2005), à une étude PCR-RFLP du polymorphisme de restriction du gène *flaA* (Nachamkin *et al.*, 1993). La première technique est connue pour mettre en évidence la diversité génétique et la seconde permet de souligner l'existence de lignées clonales. Dans un premier temps, il s'agit de mettre en évidence la variabilité intrinsèque « spontanée » de différentes souches de *Campylobacter in vitro*. Ensuite, il s'agira de valider et de « calibrer » ces méthodes de typages en observant la variabilité propre *in vivo* de ces mêmes souches inoculées seules ou en association à des porcs EOPS lors d'une infection expérimentale (Chapitre III). L'étude de la variabilité génomique de *Campylobacter in vitro* par repiquages successifs puis *in vivo* dans l'animal (porc EOPS) en conditions contrôlées (porcherie expérimentale protégée de l'AFSSA à Ploufragan) permettra de caractériser une éventuelle variabilité propre à *Campylobacter in vitro* et/ou *in vivo*. Cette première étape est un préliminaire indispensable afin d'évaluer les méthodes de typage et de les valider avant de les appliquer à une situation en conditions réelles, donc non contrôlées, sur des prélèvements réalisés au cours d'enquêtes en élevage porcin conventionnel.

Les deux méthodes choisies sont à la fois (i) adaptées à des études restreintes dans le temps et dans l'espace, en l'occurrence ici au sein d'un élevage, et (ii) relativement sensibles à l'instabilité génétique présente chez *Campylobacter* et pour laquelle plusieurs mécanismes sont possibles (recombinaisons entre les gènes doubles *flaA* et *flaB*, prise d'ADN extracellulaire et transformation, recombinaison programmée de l'ADN ou recombinaison aléatoire sur une échelle génomique) (Wassenaar, 2000). Ces deux méthodes seront ainsi validées en tant que méthode de typage pour une utilisation en élevage conventionnel porcin.

**3. ARTICLE 4 : ETUDE DE LA VARIABILITE GENOMIQUE DE
CAMPYLOBACTER IN VIVO
LORS D'UNE INFECTION EXPERIMENTALE DE PORCS EOPS**

Evaluation of genomic variability of *Campylobacter spp.* strains during *in vitro* and *in vivo* passage in pigs

Mily Leblanc Maridor^{a,*}, Martine Denis^b, Albert Rossero^c, Michel Federighi^c, Henri Seegers^a,
Catherine Belloc^a

^a*INRA, Veterinary School, Research group on Bio-aggression, Epidemiology and Risk Analysis in Animal Health, UMR 1300, BP 40706, 44307 Nantes Cedex 03, France*

^b*AFSSA, French Agency for Food Safety, Pig and Poultry Veterinary Research laboratory, Hygiene and Quality of poultry and Swine Products Research Unit, BP53, 22440 Ploufragan, France*

^c*INRA, Veterinary School, Unit of Food Safety, UMR 1014 SECALIM ENVN/ENITIAA, BP 40706, 44307 Nantes Cedex 03, France*

Manuscrit en cours d'écriture

INTRODUCTION

The genetic description of bacterial strains is a powerful tool for epidemiological studies. *Campylobacter* strains obtained either from different hosts or from a given animal at different sampling times have been shown to exhibit genomic variability (Weijtens *et al.*, 1997; Weijtens *et al.*, 1999 ; Hume *et al.*, 2002; Guévremont *et al.*, 2004). This is in accordance with the previously reported capability of genomic variability of these bacteria (Wang and Taylor, 1990 ; Mills *et al.*, 1991). This variability can be related to several mechanisms. First it can be explained by the simultaneous co-infection of animals by several bacterial strains, all of them having a specific genetic pattern. Secondly, the observed variability can result from the bacterial spontaneous genomic changes generated by the intrinsic genomic instability of *Campylobacter*. This genomic instability can be exacerbated when animals are infected by several strains since genetic material exchanges can occur.

Previous studies have investigated the genetic stability of *Campylobacter* both *in vitro* and *in vivo* leading to discrepant results. Nielsen *et al.* (2001) as well as Ritmeester *et al.* (2003) reported the *in vitro* genetic stability of *C. jejuni*. On the contrary, *C. coli* porcine isolates were shown to vary after 50 subcultures (On *et al.*, 1998). Additionally, investigations carried out by *in vivo* passage in chickens demonstrated either genomic instability (Wassenaar *et al.*, 1998) or stability (Hänninen *et al.*, 1999) of *C. jejuni* strains. To our knowledge, no investigation has been carried out in pigs.

However the typing methods used in these studies were all different, which could in part explain these contrasting observations. Indeed, for epidemiological purposes, links have to be established between strains and typing methods have to exhibit typeability, discriminatory power and stability. The stability implies that it can recognise clonal relatedness despite variation that may occur during laboratory storage and culturing or during clonal dissemination in nature. This capacity to identify clones is important for *Campylobacter* since these bacteria are considered to have high frequency of genotypic changes.

Macrorestriction combined with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and PCR RFLP based on the *flaA* gene are the most frequently used methods. PFGE which is based on the whole genome is considered to exhibit a high discriminatory power all the more as two enzymes or more are used in combination (Gibson *et al.*, 1997, Hänninen *et al.*, 1998). By establishing links between strains PCR RFLP is an interesting complementary method.

Our study aimed at investigating the genotypic variability of *Campylobacter* generated either *in vitro* by subculturing or after *in vivo* passage on *Campylobacter*-free SPF pigs. The genotypic variability was investigated using both (i) macrorestriction combined with PFGE analysis and (ii) analysis of the restriction fragment length polymorphism (RFLP) after PCR amplification of the *flaA* gene. Several strains were investigated: one *C. jejuni* and two *C. coli* strains, the latter originated from poultry (one strain) and pig faeces (the other strains). Bacterial strains were inoculated either alone or in a mix of the three. A second objective of our study was to increase the number of isolates tested per sampling in order to improve the probability of detection of the variability.

MATERIALS AND METHODS

Strains

Three *Campylobacter* field strains from the AFSSA collection comprising one *C. coli* strain isolated from faeces of pigs collected in a French slaughterhouse, one *C. coli* and one *C. jejuni* strains obtained from caeca of commercial broilers from two different French slaughterhouses. These three field strains, stored at -80°C in glycerol peptone broth, will be thereafter referred to as “porcine *C. coli*”, “poultry *C. coli*” and *C. jejuni*, respectively. The strains investigated in this study were selected on the basis of absence of epidemiology linkage and subtype difference by using PFGE as the preliminary criteria (distinct *Sma* I-*Kpn* I PFGE patterns) and were inoculated alone or in a mix to Specific pathogen-free (SPF) 7-week-old Large White piglets in the experimental infection described by Leblanc Maridor *et al.* (2008). Moreover, two reference strains, namely *C. jejuni* NCTC 11168 and *C. coli* CIP 7081 were used as controls to assess the repeatability of the genotype methods.

In vitro passage

The three field strains were subcultured every forty eight hours during one month (twenty times) in duplicate on Karmali agar (AES Laboratory, Rennes, France), *i.e.* one colony from each original culture was subcultured (designated A, B and C). A single colony was picked for subculture each time. The Karmali plates were incubated 2-4 days at 41.5°C in a micro-aerophilic atmosphere (5% O_2 , 10% CO_2 , 85% N_2). The original strains and the ten passages were kept at -80°C in glycerol peptone broth before the analysis by molecular typing methods. All isolates of the last passage (passage no 20) were subtyped by PFGE and *flaA* PCR-RFLP.

Moreover, 10 isolates were taken at the first subculture and at the passage no 20. The two molecular typing methods were performed on the 20 isolates to appreciate an eventual effect of the number of samples taken to see the variability.

***In vivo* passage in pigs : experimental infection of SPF pigs and samples collection**

All isolates used in this study originated from an experimental infection of SPF pigs at the high-security barn of the French Agency of Food Safety at Ploufragan, between 26 april and 26 july 2006 (Leblanc Maridor *et al.*, 2008).

A total of 21 pigs were distributed into seven groups of three animals in three units (two groups by unit), three animals were inoculated by oral way with each *Campylobacter* strain alone and with the three strains simultaneously (5×10^7 CFU/strain). Non inoculated pigs were housed in adjacent pens and one group of three piglets was kept as negative controls. Faecal samples of pigs, were collected individually once a week between 26 april and 3 july 2006 and were cultured within 4h after sampling. After the pig slaughtering, caecal and rectal content of each animal were collected separately for bacteriological analyses. Details of sampling procedure and primary isolation of bacteria have been presented elsewhere (Leblanc Maridor *et al.*, 2008).

Bacteriological Analysis and collection of *Campylobacter* isolates

Isolation of *Campylobacter spp.* was carried out on the day of sample collection. *Campylobacter* were cultured at 41.5°C in a micro-aerophilic atmosphere (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂). Ten grams of fresh faeces were added to 90 mL of Preston broth (Oxoid, Dardilly,

France) with a Preston antibiotic supplement (AES Laboratory, Rennes, France) and incubated for 24 h. Streaking on Karmali plates (AES Laboratory, Rennes, France)) was carried out before, and 24 h after broth enrichment of the samples. After 48h of incubation (72h for direct streaking) of the agar plates, from each positive sample corresponding to one pig, 10 *Campylobacter* colonies taken at random were sub-cultured on blood agar (Mueller-Hinton agar base [Merck] supplemented with 5% defibrinated horse blood [AES Laboratory]), for 48h at 41.5°C. Moreover, for the last sampling, where caecal and rectal content of each animal were collected separately for biological analyses, 10 colonies for each kind of positive sample were isolated (so 20 colonies in total for one pig). Colonies were preferentially selected from Karmali plates prepared before the enrichment step, to avoid an effect of the enrichment broth on *Campylobacter* species and genotypes.

Before storage of the bacterial culture in glycerol peptone broth at –80°C, some colonies were suspended in 100µL TE buffer (10 mmol Tris-HCl, 1 mmol EDTA, pH 7.6) for analysis by PCR.

DNA extraction from isolates and species identification by PCR

For species identification, DNA extraction was performed by heating at 95°C for 10min the suspended bacteria in TE buffer. After a low speed centrifugation at 5000 x rpm for 2min, 3µL of the supernatant was used for species identification by PCR. *C. jejuni* and *C. coli* were identified using the multiplex PCR as described by Denis *et al.* (1999). The three inoculated strains were used as positive controls in the PCR.

DNA extraction for quantification of *C. coli* and *C. jejuni* in faeces by real-time PCR

Moreover, all the faecal samples were examined by our real-time quantitative PCR methods to quantify and discriminate *C. coli* and *C. jejuni* (Leblanc Maridor *et al.*, 2008).

DNA extraction for PFGE analysis and PFGE conditions

DNA preparation, restriction endonuclease digestion and PFGE conditions Deoxyribonucleic acid preparation, restriction endonuclease digestions, and PFGE were performed as described above. Two profiles corresponding to *KpnI* and *SmaI* restriction endonucleases were obtained for each isolate.

Bacteria were suspended by adding 2.5 ml of a Tris-NaCl solution (10mmol Tris-HCl, 1mol NaCl, pH 7.6) as described by Rivoal *et al.* (2005). Cells were centrifugated at 8000g for 3min and washed twice with 1ml of the Tris-NaCl solution. Bacteria were then suspended in 1ml of the Tris-NaCl solution and 20 μ L of the bacteria suspension was diluted in 980 μ L of the same solution and adjusted to an optical density at 600 nm of 1.5. Agarose plugs were prepared as described by Ragimbeau *et al.* (1998).

Plugs were formed by mixing 180 μ L of bacteria suspension with 180 μ L of 1% agarose and this mixture was then pipetted into plug molds and allowed to solidify at 4°C for 10min. Each plug was then incubated 40h in 1ml of Lyse buffer (0.5 M EDTA, pH 9.0, 1% N-lauryol-sarcosine, 1mg/ml of proteinase K) at 50°C. Then, plugs were washed five times for half-hour at room temperature in 5ml of TE (10mM Tris-Hcl, pH 7.06, 1 mM EDTA). Each plug was then cut into four thin slices and stored in TE buffer at 4°C prior to use/until use.

One-quarter of a plug was used for restriction endonuclease digestion in each separate reaction using 40 U of either *SmaI* or *KpnI* (New England Biolabs, Ozyme, France) under the conditions recommended by the manufacturer in a 100 μ L (final volume) mixture with incubation for 5 h at the appropriate temperature (25°C and 37°C, respectively). Electrophoresis was performed on a Bio-Rad CHEF-DRIII system (Bio-Rad Laboratories, Mundolsheim, France), at 14°C by using 1% pulse-field-certified agarose with 2 liters of 0.5X TBE (45 mM Tris-HCl, 45 mM boric acid, and 1 mM EDTA). Electrophoresis conditions used for *KpnI* were as follows: ramped pulse times from 2 to 25 s for 23 h at 220 V. Fragments generated by *SmaI* digestion were separated by electrophoresis for 24 h at 200 V and 14°C with ramped pulse times from 15 to 45 s for the first 22 h and from 2 to 8 s for the last 2 h.

DNA extraction from isolates for *flaA* PCR-RFLP analysis

For the *flaA* PCR, bacteria were suspended in 1mL of sterile water, vortexed and heated for 10 min in a boiling water bath. The bacteria were sedimented by centrifugation in a microcentrifuge at 8000 rpm for 5 min, and the supernatant was removed for testing. Finally, the DNA preparations were quantified by measuring the optical density at 260nm and the purity was assessed by the examination of 260/280nm optical density ratios. All DNA samples classified as pure, as defined by having a 260/280 nm optical density ratio between 1,8 and 2 were adjusted to 20ng μ L⁻¹ in sterile water and stored at 4°C prior to use.

A 9 μ L aliquot of the DNA bacterial extract was used as template for PCR. PCR was performed using the two primers previously described by Nachamkin *et al.* (1993). These two primers were synthesized by Eurobio (Les Ulis, Courtaboeuf, France) and generate a 1700 bp amplified product. All reaction mixes were set up in a room separate from that used to extract

DNA and the amplification and post-PCR room in order to minimize contamination. Dedicated PCR pipettes and precautions were taken to avoid contamination with exogenous DNA during the PCR amplification stage.

Reaction mixtures (50 μ L) were set up as follows: 1mM Standard *Taq* Reaction Buffer (containing 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl and 1.5 mM MgCl₂) (New England Biolabs, Ozyme, France), 1 μ M of each primers, 200 μ M of deoxynucleoside triphosphates mix (Eurobio, France) and Taq DNA polymerase (New England Biolabs, Ozyme, France).

The PCR was conducted with I-cycler thermal cycler (Biorad, Mundolsheim, France) under the following thermal cycle protocol : 94°C for 4 min and then 35 cycles of 94°C for 1min, 54°C for 1min, and a 72°C for 1min 45s. The reaction was completed by a final extension of 10 min at 72°C. All reactions were carried out alongside a non template control containing all reagents except DNA and positive controls containing DNA from reference strains *C. jejuni* and *C. coli*. Following PCR amplification, 20 μ L of the reaction mixture was first checked for the presence of the amplicon on a 2% agarose gel (agarose standard, Eurobio, France).

To study polymorphism of the *flaA* gene, 20 μ L of PCR product was digested in 25 μ L (total volume) mixture with 2U of restriction enzyme *DdeI* (New England Biolabs, Ozyme, France). Digestion was performed with buffer 3 (New England Biolabs, Ozyme, France) at 37°C for one night according to the manufacturer's instructions. 20 μ L of digests were separated in a 2.5% agarose gel (agarose resophor, Eurobio, France) in TBE 1X buffer. Electrophoresis was performed at 110 volts during 180min.

Analysis of the patterns.

The agarose gels were stained with ethidium bromide, and the images were captured using UV illumination with a video system (Gel DOC 1000 system; Bio-Rad). Electrophoretic patterns were compared using Bio-Numerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Similarities between profiles, based on band positions, were derived by using the Dice correlation coefficient with a maximum position tolerance of 1%.

A dendrogram of the combined *KpnI*- and *SmaI*-digested DNA and a dendrogram of the *flaA* PCR-RFLP profiles were constructed separately to reflect the similarities between the strains according to the typing method used.

RESULTS

***In vitro* passage : Genotypic stability**

At the beginning and after 20 passages *in vitro* and with a number of isolates quite high (20 isolates per date), no changes in any DNA profiles were identified among these strains with both employed typing methods. During culturing, PFGE patterns (with both *KpnI* and *SmaI* restriction enzymes) and *flaA* profiles from the three strains did not change after 20 passages (six weeks). Results for *SmaI* PFGE pattern for the three strains were shown in Figure 1.

Shedding of *Campylobacter* by experimentally infected pigs

Environmental and feed samples as well as faecal samples from the negative control non-inoculated pigs were negative after bacteriological analysis.

Seven groups of SPF piglets were employed for colonization experiments. None of the pigs excreted *Campylobacter* two days before inoculation and no *Campylobacter* was detected in the environment (wall and floor swabs, feed and air samples). Two days after inoculation, all the pigs inoculated with porcine *C. coli* or with a mix of the three strains excreted *Campylobacter* from 10^3 to 10^7 CFU/g of faeces and a slight decrease is observed at the end of the trial. Animals inoculated with poultry *C. coli* or *C. jejuni* strain excreted a lower quantity and some of them stopped excreting before the end of the trial. At the beginning and at the end of the trial, only *C. coli* was detected in the faeces of pigs inoculated simultaneously with the three bacteria. Both results of the conventional PCR on the isolates and of the real time PCR on DNA extracted from faecal material underline this absence of *C.*

jejuni excretion from two days after inoculation until the end of the trial. Moreover, the transmission of *Campylobacter* was noticed between pens for the two *C. coli* strains and all the neighbouring animals became shedders with a level of excretion similar to the inoculated pigs. These pigs in the adjacent pens shedded *Campylobacter* 21 days after inoculation. The PFGE was in fact used to identify the animal origin of the *C. coli* isolates of the pigs inoculated with the three strains and the sham inoculated pigs.

Evidence of genotypic variability by PFGE and *flaA* PCR-RFLP

Genotypic analysis was carried out on a total of 420 porcine *C. coli* isolates, 212 poultry *C. coli* isolates and 106 poultry *C. jejuni* obtained at four sampling times : (i) at the beginning of the shedding process for inoculated animal, (ii) when the sham-inoculated excreted *Campylobacter* (at 35 days post inoculation), (iii) at 49 days post inoculation, and (iiii) at the end of the trial (80 days post inoculation). The subtypes of the poultry *C. coli* and *C. jejuni* strains were stable throughout all the *in vivo* experiment with the two applied typing methods. For all the pigs with a mix of the three strains, when poultry *C. coli* were isolated, they exhibited no variability by the two molecular methods comparatively to the reference patterns. On the contrary, genotypic variability was observed for the porcine *C. coli* strain both for inoculated and sham inoculated pigs in the two experimental units (corresponding to pigs inoculated with the porcine *C. coli* alone or with the mix of the three strains) with the *flaA* PCR-RFLP method and with the PFGE method (Table 1).

A different *flaA* genotype was observed for 25 isolates on the 410 tested, among them only three *flaA* genotypes are characterized and designated as D2, D3 and D4 compared to the *flaA* genotype D1 of the original porcine *C. coli* strain (Figure 2). The dendogram underlined the presence of two groups closely related D1 with D2 and D3 with D4 (Figure 3)

PFGE analysis

PFGE profile differences were observed for 13 isolates. In total, 4 different but closely related *SmaI*-digested PFGE genotype patterns, designated as genotypes S2, S3, S4 and S5, were recognized compared to the genotype S1 of the original porcine *C. coli* strain inoculated (Figure 4). The PFGE analysis was repeated with an other enzyme to determine if the diversity in genotypes of *C. coli* strain was specific for *SmaI* digestion. Likewise, 4 different but closely related *KpnI*-digested PFGE genotype patterns, designated as genotypes K2, K3, K4 and K5, were recognized compared to the genotype K1 of the original porcine *C. coli* strain inoculated (Figure 5). The combined *SmaI-KpnI* genotypes were presented on the dendrograms (Figure 6) underline 6 different banding associated patterns for 13 isolates on the 420 tested.

Only one isolate of the pig 7 inoculated with the mix of the three strains (underlined in Table 1) have shown variability with the two typing methods.

Discussion

Results obtained with both methods were similar although we can consider that PFGE exhibited a slightly higher discriminatory power than PCR-RFLP since more patterns were observed (6 *versus* 3). This is in accordance with previous reports on the high discriminatory power of PFGE when two or more restriction enzymes are used (Matsuda *et al.*, 1995; Hänninen *et al.*, 1998 ; Hume *et al.*, 2002 ; Guévremont *et al.*, 2004). However, for epidemiological purposes, the capacity to demonstrate clonal relatedness between isolates is a key issue and PCR RFLP could then prove interesting under field conditions where genomic variability is frequent.

Contrasting results between *in vitro* and *in vivo* experiments suggest an influence of the digestive tract of pigs on the capability to vary. The study of Nielsen *et al.* (2001) have not shown genomic variability of three *C. jejuni* strains after colonizing mice for up to 26 days. Nevertheless, Hänninen *et al.* (1998) underlined the impact of the “*in vivo*” on the genomic stability of *Campylobacter*. Genomic instability was shown by analysis of their PFGE patterns after passage through newly hatched chick’s intestines. Two strains on 12 isolates vary and these study suggests that during intestinal colonization, genomic rearrangement, as demonstrated by changed PFGE and ribopatterns, may occur.

Homogeneous results between pigs: 2 days post infection only the reference pattern is found. Afterwards, a first variation is evidenced 35 days post inoculation and the frequency of variation increases. However these SPF pigs are probably more homogenous than pigs in commercial herds. They are fed *ad libitum*, stocking densities are low, they do not experiment health disorders and the hygienic status of the herd is very high. Nevertheless, due to the high prevalence of *Campylobacter* carriage in commercial herds (Weijtens *et al.*, 1993 ; Weijtens

et al., 1999 ; Oporto *et al.*, 2007 ; Wehebrink *et al.*, 2008) it would be impossible to carry out such a trial in more realistic conditions.

Variability was evidenced only in pigs inoculated with *C. coli* of porcine origin, either alone (pigs 1 to 3) or in the mix (pigs 7 to 9) or in sham inoculated pigs neighboring the latter. Is there a relationship between genetic variability and colonization capacity since the porcine *C. coli* strains was both (i) the more effective in colonizing the pig digestive tract and (ii) the more variable one. Or (second hypothesis) the observed variability resulted from a higher multiplication rate in the digestive tract resulting in a higher shedding

The detectability of the method is influenced by the number of isolates investigated. Although the number of isolates tested had been increased only one to three on 20 varied. That means that when we select only one to three isolates the variability is underestimated. These observations are in accordance with the study of Hänninen *et al.* (1998), which underlined the influence of the number of tested isolates. In fact, detection of genomic instability depends on the number of samples taken and the methods used.

A discrimination threshold of 65 and 80% was established with the *flaA* PCR-RFLP and the PFGE typing methods respectively. Under these values, it is difficult to know if we have two different strains of different origin or if it just due to the genomic instability of *Campylobacter*.

A limitation of our study was the duration of the study (80 days post inoculation) which is lower than the rearing duration under field conditions (pigs are slaughtered at around 170 days of age). We probably underestimated the variability since this study demonstrated that it takes time to occur.

Table 1

SmaI and *KpnI*-digested PFGE genotypes and *flaA* PCR-RFLP genotypes for isolates taken from pigs of the experimental infection. Pigs are inoculated either with porcine *C. coli* alone or in a mix with the three strain. Both inoculated and sham inoculated pigs, infected by transmission of *Campylobacter* at distance presented variable genotypes compare to the original strain. The *SmaI* and *KpnI*-digested PFGE profile of the original porcine *C. coli* strain is S1 K1, the variable profiles are called S2, S3, S4 , S5 for *SmaI* and K1, K2, K3, K4 for *KpnI*. The *flaA* PCR-RFLP profile of the original porcine *C. coli* strain is D1, the others variable profiles are called D2, D3 and D4. The number of isolates is indicated for each molecular method and for the four sampling times in days post inoculation (days p.i.).

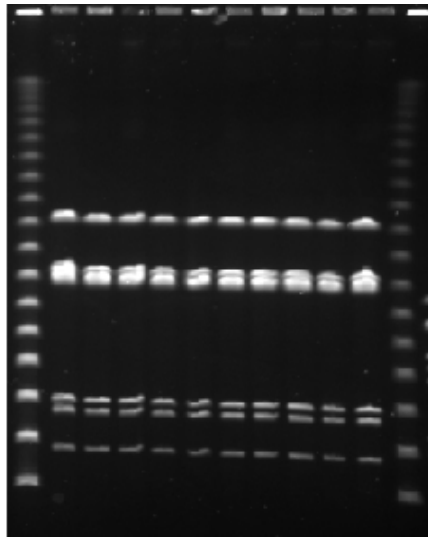
a : For the Unit 3, pigs inoculated with the mix of the three strains,

b : For the Unit 1, pigs inoculated with porcine *C. coli* strain alone

Unit	Animals	Sampling times	Number of isolates	<i>SmaI</i> -PFGE profiles	<i>KpnI</i> -PFGE profiles	Number of isolates	<i>flaA</i> profiles		
Unit 3	Inoculated pigs	Pig 7	2 days p.i	10	S1	K1	10	D1	
			35 days p.i	8	S1	K1	7	D1	
					1	S2	K2	2	D2
					1	S4	K1	1	D4
			49 days p.i.	10	S1	K1	10	D1	
			80 days p.i.	20	S1	K1	20	D1	
	Inoculation with the mix of 3 strains	Pig 8	2 days p.i	10	S1	K1	10	D1	
			35 days p.i	8	S1	K1	8	D1	
					2	S6	K6	2	D5
			49 days p.i	7	S1	K1	7	D1	
					3	S6	K6	3	D5
			80 days p.i.	14	S1	K1	15	D1	
			1	S3	K3				
			5	S6	K6	5	D5		
Pig 9		2 days p.i	10	S1	K1	10	D1		
		35 days p.i	7	S1	K1	7	D1		
				3	S6	K6	3	D5	
		49 days p.i	7	S1	K1	7	D1		
			3	S6	K6	3	D5		
	80 days p.i.	15	S1	K1	15	D1			
		5	S6	K6	5	D5			
Sham-inoculated pigs	Pig 10	49 days p.i	2	S1	K1	2	D1		
			8	S6	K6	8	D5		
		80 days p.i.	12	S1	K1	12	D1		
			8	S6	K6	8	D5		
	Pig 11	49 days p.i	10	S6	K6	10	D5		
		80 days p.i.	12	S1	K1	12	D1		
			4	S6	K6	4	D5		
	Pig12	49 days p.i	10	S6	K6	10	D5		
		80 days p.i.	18	S6	K6	18	D5		

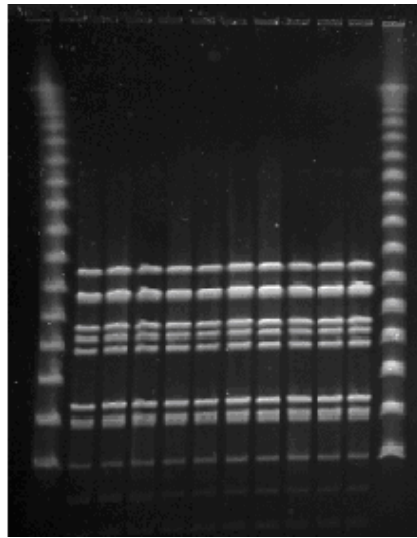
b

Unit	Animals	Sampling times	Number of isolates	<i>SmaI</i> -PFGE profiles	<i>KpnI</i> -PFGE profiles	Number of isolates	<i>flaA</i> profiles		
Unit 1	Inoculated pigs	Pig 1	2 days p.i.	10	S1	K1	10	D1	
			35 days p.i.	10	S1	K1	10	D1	
			49 days p.i.	10	S1	K1	10	D1	
			80 days p.i.	18	S1	K1	18	D1	
				1	S4	K4	2	D2	
		1	S2	K2					
	Inoculation with porcine <i>C. coli</i> strain alone	Pig 2		2 days p.i.	10	S1	K1	10	D1
				35 days p.i.	10	S1	K1	10	D1
				49 days p.i.	10	S1	K1	10	D1
				80 days p.i.	19	S1	K1	19	D1
					1	S3	K3	5	D2
		Pig 3		2 days p.i.	10	S1	K1	10	D1
				35 days p.i.	10	S1	K1	10	D1
				49 days p.i.	10	S1	K1	7	D1
								3	D3
80 days p.i.				18	S1	K1	15	D1	
		1	S4	K4	4	D2			
		1	S3	K3	1	D3			
Sham-inoculated pigs		Pig 4		35 days p.i.	10	S1	K1	10	D1
				49 days p.i.	9	S1	K1	10	D1
					1	S4	K3		
	80 days p.i.			18	S1	K1	20	D1	
				1	S4	K1			
		1	S3	K3					
	Pig 5		35 days p.i.	10	S1	K1	10	D1	
			49 days p.i.	9	S1	K1	10	D1	
				1	S4	K4			
			80 days p.i.	19	S1	K1	19	D1	
				1	S5	K1	1	D2	
	Pig 6		35 days p.i.	10	S1	K1	10	D1	
			49 days p.i.	10	S1	K1	10	D1	
			80 days p.i.	20	S1	K1	20	D1	



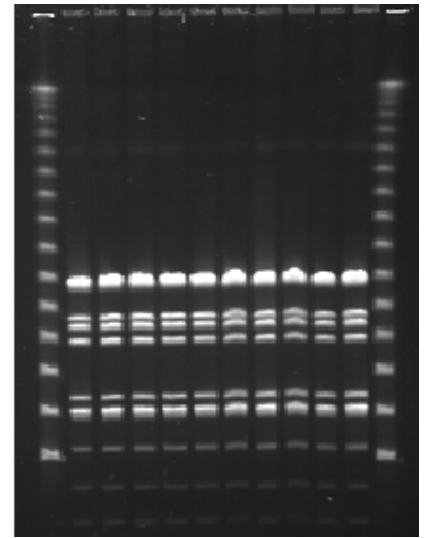
C. jejuni

SmaI-digested PFGE profile



poultry *C. coli*

SmaI-digested PFGE profile



porcine *C. coli*

SmaI-digested PFGE profile

Fig. 1. Representation of the *in vitro* stability of the three field strains : *C. jejuni*, poultry *C. coli* and porcine *C. coli* with the *SmaI*-digested PFGE genotyping method

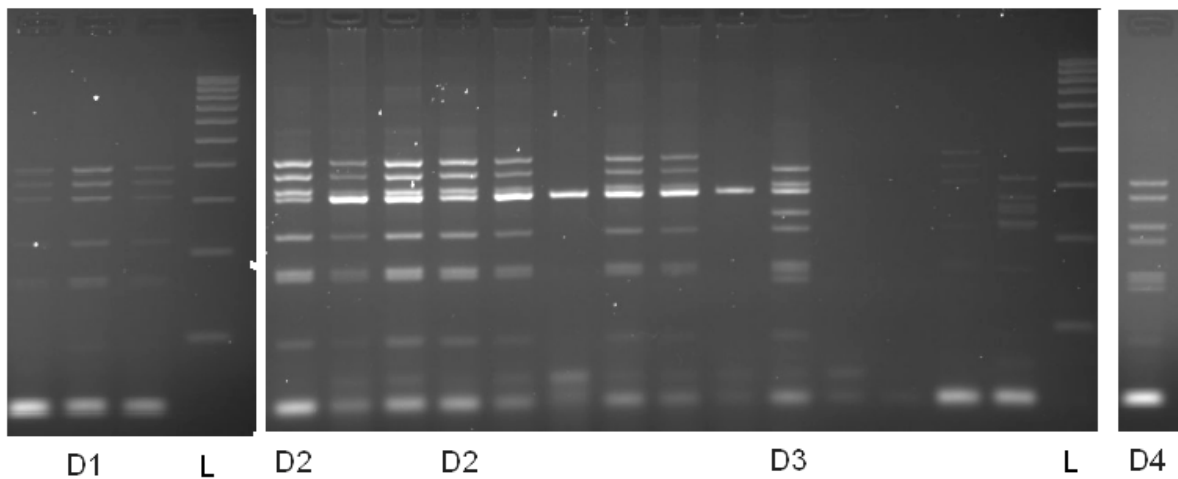


Fig. 2. *flaA* profiles of isolates taken from the unit of inoculated pigs with porcine *C. coli* or with the mix and sham inoculated pigs obtained by PCR-RFLP genotyping method based on the flagellin gene *flaA* with the use of the restriction enzyme *DdeI*.

D1 : *flaA* genotype of the original porcine *C. coli* strain; D2 : a different *flaA* genotype of isolates taken from both inoculated and sham inoculated pigs; D3 : a different *flaA* genotype obtained from isolates of one inoculated pig with porcine *C. coli* alone at two sampling times; D4 : a different *flaA* genotype observed for one isolate of one inoculated pig with the mix of three strains; Lanes L on gels correspond to the 100bp DNA lambda ladder.

Dice (Opt:1.00%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

PCR-RFLP

PCR-RFLP

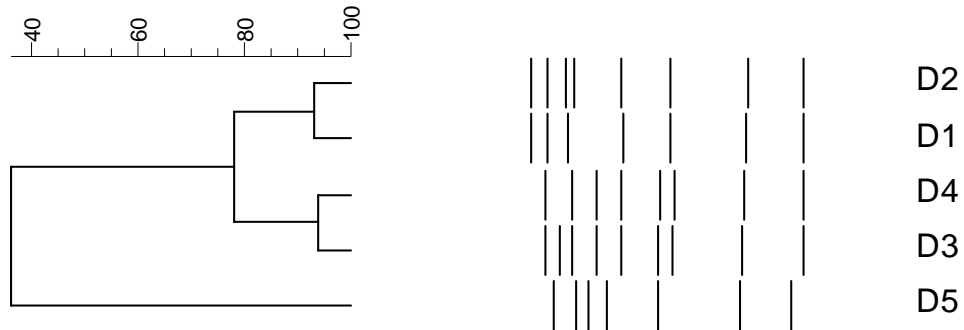


Fig. 3. Dendrogram of the cluster analysis of *flaA* PCR-RFLP profiles of poultry *C. coli* D5, porcine *C. coli* D1 and the different isolates taken at different sampling time from pigs inoculated with porcine *C. coli* strain alone or in a mix. Figures along the horizontal axis indicate % similarities as determined by the Dice coefficient and Ward's clustering. The different variable profiles were indicated from D1 to D5.

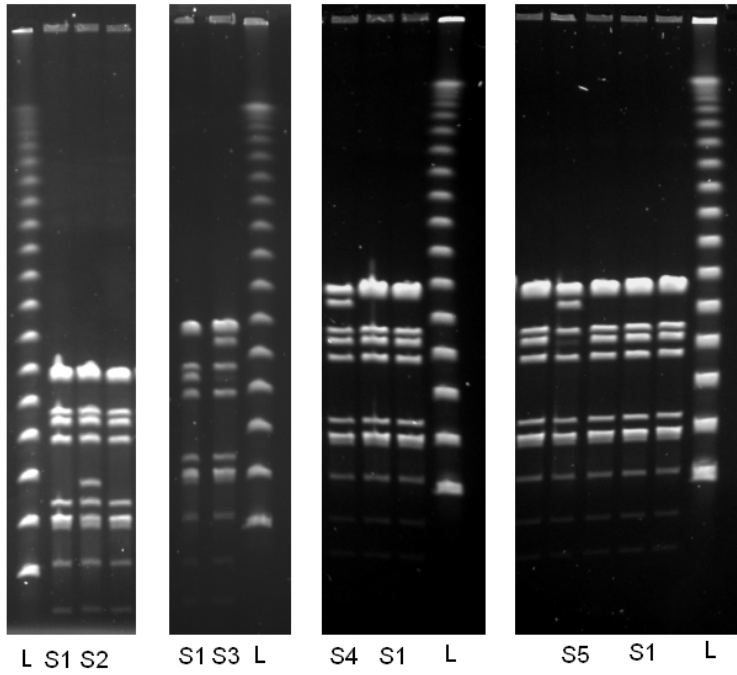


Fig 4. Representative *SmaI*-digested PFGE profiles of 10 isolates taken from pigs inoculated with porcine *C. coli* or with a mix of three strains. S1 profile correspond to the original porcine *C. coli* strain *SmaI*-digested PFGE genotype; S2, S3, S4 and S5 were the four variable *SmaI* profiles observed for 10 isolates taken from inoculated with porcine *C. coli* strain alone or with the mix or sham inoculated pigs; Lanes L on gels correspond to the 1kb lambda ladder

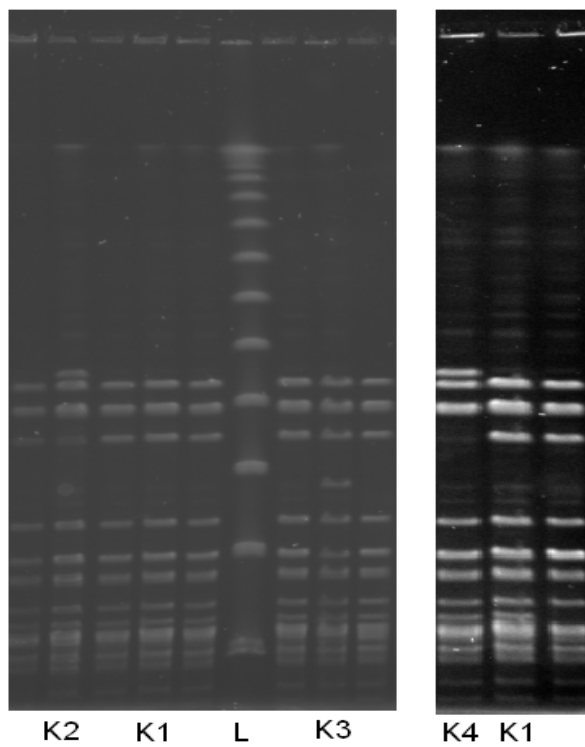


Fig 5. Representative *KpnI*-digested PFGE profiles of 10 isolates taken from pigs inoculated with porcine *C. coli* or with a mix of three strains. K1 profile correspond to the original porcine *C. coli* strain *KpnI*-digested PFGE genotype ; K2, K3 and K4 were the three variable *KpnI* profiles observed for 10 isolates taken from inoculated with porcine *C. coli* strain alone or with the mix or sham inoculated pigs ; Lanes L on gels correspond to the 1kb lambda ladder

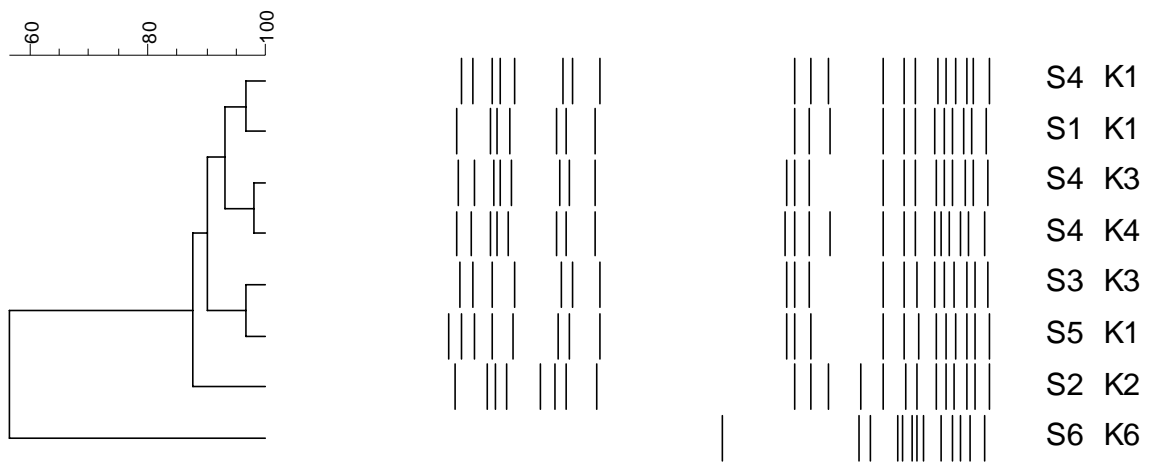


Fig. 6. Dendrogram of the cluster analysis of *SmaI-KpnI*-digested PFGE profiles of poultry *C. coli* S6 K6, porcine *C. coli* S1 K1 and the different variable isolates taken at different sampling time from pigs inoculated with porcine *C. coli* strain alone or in a mix. Figures along the horizontal axis indicate % similarities as determined by the Dice coefficient and Ward's clustering. The different variable profiles were indicated from S1 to S6 for *SmaI*-digested PFGE and from K1 to K6 for *KpnI*-digested PFGE profiles.

4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

De nombreuses études soulignent une très grande variabilité génomique observée sur le terrain en conditions d'élevage. Une première étude *in vitro* permettait d'apprécier la variabilité spontanée intrinsèque de la souche étudiée. Lors de l'expérimentation *in vitro* par repiquages successifs des trois souches de terrain utilisées dans l'expérimentation animale, aucune variabilité n'a été mise en évidence. Plusieurs études présentent des résultats similaires en soulignant une stabilité génotypique de certaines souches de *C. jejuni* notamment (Manning *et al.*, 2001 ; Ritmeester *et al.*, 2003). Nielsen *et al.*, en 2001, ont travaillé sur trois souches de *C. jejuni* en utilisant différentes méthodes de génotypage : le ribotypage automatisé, l'analyse RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) et la technique de macrorestriction génomique suivie d'une PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) avec trois enzymes de restriction (*SmaI*, *SalI* et *KpnI*). Après 50 repiquages *in vitro* dans des conditions de culture classiques, aucun changement dans les profils ADN n'a été observé. De plus, les travaux de Nielsen *et al.*, en 2001, ont également mis en évidence une absence de variabilité génomique *in vivo* après colonisation de souris pendant plus de 26 jours. De même, Ritmeester *et al.* (2003) rapportent la stabilité *in vitro* du génotype de deux souches de *C. jejuni* (isolats issus de volailles) après 150 générations. Les repiquages ont été réalisés dans des conditions de culture classiques et trois techniques différentes ont été utilisées pour le typage moléculaire : la macrorestriction génomique suivie d'une PFGE avec *SmaI*, la technique AFLP™ (Amplified Fragment Length Polymorphism) et la technique MLST (Multi Locus Sequence Typing).

Ces deux études permettent d'indiquer que (i) ces méthodes génotypiques sont fiables, applicables pour le typage d'isolats de *Campylobacter* provenant de différentes sources ou pour le typage d'isolats apparentés à une même source (profils identiques) (Nielsen *et al.*, 2000), et que (ii) certaines souches de *C. jejuni* sont génétiquement stables lorsqu'elles sont testées par ces méthodes.

Cependant, de nombreux travaux ont souligné l'instabilité génomique de *Campylobacter* (Mills *et al.*, 1991 ; Wassenaar *et al.*, 1998). Ainsi, l'étude de On *et al.* (1998) apporte des éléments de réponse concernant la stabilité génomique *in vitro* de *C. coli* après repiquages successifs dans des conditions de culture classiques. Ces travaux montrent l'existence d'une variabilité génotypique pour six souches de *C. coli* (isolats prélevés chez des porcs) après 50 repiquages *in vitro* réalisés sur une période de plus de six mois (utilisation de la technique de macrorestriction génomique suivie d'une PFGE avec trois enzymes de restriction différentes : *Sma*I, *Sal*I et *Bam*HI). Wassenaar *et al.*, en 1995 et en 1998, soulignent l'instabilité génomique de *Campylobacter* vis à vis du gène codant pour la flagelline et ce avec différentes méthodes de typage (macrorestriction génomique suivie d'une électrophorèse en champ pulsé, PCR-RFLP, biotypage et sérotypage). De même Hänninen *et al.*, en 1999, mettent en évidence une variation de profils PFGE de deux souches de *C. jejuni* sur 12 testées après passage dans l'intestin de jeunes poussins fraîchement éclos. Pendant la colonisation intestinale, des réarrangements génomiques peuvent se produire et la détection d'une instabilité génomique dépendrait donc de la méthode utilisée et du nombre d'échantillons prélevés.

Ces résultats sont concordants avec ceux de l'étude *in vivo* de la variabilité génomique des souches « intra animal ». L'effet du nombre de souches testées semble indéniable au vu de nos résultats puisque souvent une variabilité était observée pour 1 à 3 isolats sur 20 testés. De ce fait, comme le souligne Weijtens *et al.* (1999), une analyse génotypique réalisée sur un nombre restreint de colonies diminue les chances de mettre en évidence des profils variés.

Les deux techniques choisies sont complémentaires et adaptées à l'étude de la variabilité des souches excrétées dans une unité de lieu, à savoir un élevage porcin, et sur une durée limitée, au cours d'un cycle de production (environ 6 mois).

Beaucoup d'études mettent en avant un pouvoir discriminant supérieur de la macrorestriction génomique suivie d'une PFGE par rapport à la PCR-RFLP. Néanmoins, certaines études soulignent la stabilité des profils PFGE (Steinbrueckner *et al.*, 1998) alors que d'autres travaux ont mis en évidence une recombinaison intra- et inter-loci pour le gène de la flagelline (Harrington *et al.*, 1997 ; Petersen et On, 2000). Une étude antérieure de Wassenaar *et al.* (1995) soulignait l'existence de recombinaisons au sein du locus mais également avec de l'ADN exogène. Des recombinaisons inter- et intra-génomiques entre les gènes *flaA* et *flaB* suggèrent également l'instabilité de cette région chez *C. jejuni*.

Les résultats concernant les deux méthodes de typage employées sont similaires et permettent d'établir un seuil au-delà duquel il est difficile de faire la part entre la variabilité génomique intrinsèque de la souche et la variabilité observée due à la présence de souches d'origines différentes. La validation et la calibration des méthodes dans une perspective d'utilisation en contexte épidémiologique sont des données essentielles pour pouvoir « tracer » les souches et établir un lien en élevage. Néanmoins, ces deux méthodes ont été calibrées et validées dans le cadre de notre étude en élevage porcin et il s'avère qu'il est également important de prendre en compte l'effet souche. Lors de cette expérimentation animale, seule *C. coli* d'origine porcine a varié et un effet souche a donc été remarqué. Certaines études suggèrent que la plasticité génomique de *Campylobacter* serait souche ou/et serotype dépendant (Nachamkin *et al.*, 2000 ; Misawa *et al.*, 1998).

CHAPITRE V :

INFECTION DES PORCS

ET CONTAMINATION

DE LEUR ENVIRONNEMENT

PAR *CAMPYLOBACTER* EN ELEVAGE

NAISSEUR-ENGRAISSEUR

1. CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE

De précédentes études ont établi la fréquence élevée du portage asymptomatique de *Campylobacter* dans les élevages porcins qui concerne selon les pays entre 25 et 85% des élevages (EFSA, 2007), la contamination très précoce des animaux et l'importance des quantités excrétées (Weijtens *et al.*, 1993 ; Moore et Madden, 1998 ; Weijtens *et al.*, 1993 ; Harvey *et al.*, 2000). D'une manière générale, *C. coli* semble prédominer chez le porc (Weijtens *et al.*, 1993 ; Payot *et al.*, 2004 ; Varela *et al.*, 2007) et *C. jejuni* peut être isolé plus ou moins fréquemment chez les porcs selon leur environnement, mais généralement en proportion moindre que *C. coli* (Jensen *et al.*, 2006 : 29% des porcs de plein-air de l'étude sont porteurs de *C. jejuni*). Néanmoins, deux études américaines décrivent un élevage où *C. jejuni* est prédominant (Young *et al.*, 2000 ; Harvey *et al.*, 1999).

De plus, peu d'études ont décrit la variation quantitative de l'excrétion des animaux de la naissance à l'abattage. Si la mère semble jouer un rôle primordial dans la contamination des porcelets, d'autres sources de contamination peuvent être suspectées. L'investigation de l'environnement (peu étudié jusqu'à présent) est notamment un point essentiel à prendre en compte afin d'évaluer les modalités de contamination des animaux et son rôle éventuel dans la transmission de *Campylobacter* en élevage porcine conventionnel. Enfin, des incertitudes subsistent quant aux raisons de la grande diversité des souches de *C. coli* isolées chez les porcs (contamination à partir de sources multiples et/ou variabilité génomique élevée intrinsèque ?). L'épidémiologie de ces bactéries chez le porc est donc insuffisamment documentée, alors que la compréhension de celle-ci est un préalable indispensable à la mise en place de mesures de lutte.

L'objectif de notre étude est donc de préciser, en complément de l'approche expérimentale antérieure, les sources et les modalités de contamination des porcs et de décrire l'excrétion des animaux en élevage conventionnel. Dans ce but, nous avons réalisé un suivi individuel de la contamination de 30 porcelets et de leur mère tout au long d'un cycle de production en quantifiant dans le même temps la présence de *Campylobacter* dans leur environnement et leur alimentation pour deux élevages.

Si la réalisation des prélèvements, le dénombrement effectué et l'échantillonnage réalisé (suivi de cinq truies et de six porcelets par truie soit 35 animaux) sont comparables à

ceux de la plupart des études se proposant de quantifier et de suivre précisément l'excrétion fécale de *Campylobacter* chez le porc (Weijtens *et al.* 1999 ; Harvey *et al.*, 2000), l'originalité de cette étude est le suivi individuel des mêmes animaux sur une durée de six mois. En effet, dans les autres études, les comparaisons de prévalence et de niveau d'excrétion entre porcs à différents stades s'effectuent sur des animaux différents (Young *et al.*, 2000) ou de manière groupée (Alter *et al.*, 2005).

Les objectifs détaillés de cette étude en élevage conventionnel porcin sont donc :

- d'identifier la cinétique d'excrétion de *Campylobacter* dans les matières fécales des animaux
- de décrire la durée de l'excrétion
- d'évaluer l'existence éventuelle d'une intermittence de l'excrétion
- de caractériser quantitativement et qualitativement cette excrétion (quantités excrétées et espèces excrétées)
- de décrire la contamination de l'environnement (eau, aliments, sols, parois des cases) et d'évaluer son influence sur la transmission, la contamination et/ou l'excrétion de *Campylobacter* pour les animaux
- de décrire au niveau moléculaire la variabilité des souches excrétées et des souches isolées dans l'environnement pour les « tracer » et établir un lien épidémiologique afin de formuler des hypothèses sur les modalités de contamination et de transmission de *Campylobacter* en élevage porcin.

2. MATERIELS ET METHODES

Cette étude s'est appuyée sur le suivi longitudinal individuel de l'excrétion fécale de 30 porcelets et de leurs mères par élevage tout au long d'un cycle de production en quantifiant dans le même temps la présence de *Campylobacter* dans leur environnement et leur alimentation pour deux élevages conventionnels naisseurs-engraisseurs.

Deux types d'analyses ont été mises en œuvre pour le premier élevage, d'une part une analyse bactériologique permettant la détection, la quantification et l'isolement des *Campylobacter* afin de conserver des isolats pour le typage génétique des souches, d'autre part, une analyse moléculaire en utilisant les techniques de PCR quantitatives en temps réel mises au point préalablement (Chapitre II).

Ces méthodes ont été validées en conditions « réelles » avec, entre autre, l'étude de ce premier élevage ; la méthode bactériologique étant considérée comme le « gold standard ». En parallèle, la PCR quantitative en temps réel permettant de différencier *C. coli* et *C. jejuni* a également été validée avec les prélèvements de ce premier élevage en comparant les résultats obtenus sur matières fécales avec l'identification des espèces réalisée par PCR conventionnelle à partir des isolats de *Campylobacter*. Ces méthodes étant validées, pour l'étude du second élevage, seule une analyse génétique a été réalisée avec les PCR quantitatives en temps réel mises au point et validées

2.1. CHOIX DES ELEVAGES ET SUIVI DES ANIMAUX

Les animaux inclus dans l'étude provenaient de deux élevages en claustration sélectionnés parmi ceux proposés par le groupement de production sur différents critères :

- le volontariat de l'éleveur
- un système naisseur-engraisseur
- une rotation sur trois semaines avec un sevrage à 28 jours (conduite la plus fréquente en France en production porcine)

- la disponibilité des données GTTT¹ et des données GTE²
- des performances dans la moyenne des élevages porcins français
- une certaine proximité géographique avec l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes

Pour chacun des élevages, cinq truies, de rangs de portée différents, issues d'une même bande, ont été suivies pendant deux semaines avant la mise-bas puis tout au long d'un cycle de production. Les truies étaient identifiées avec une lettre de A à E et dès la mise-bas, six porcelets par truie ont été identifiés individuellement à l'aide d'une boucle auriculaire numérotée de 1 à 6 et portant la lettre indicative de leur mère (A1, A2, A3 jusqu'à A6 pour les porcelets de la truie A par exemple). Les animaux ont alors été suivis de la première semaine de vie au départ à l'abattoir.

Un questionnaire d'enquête a été renseigné sur chacune des exploitations au cours d'un entretien avec le responsable d'élevage afin de recueillir les données concernant l'organisation de l'exploitation et la conduite de l'élevage de porcs.

Outre cette collecte d'information concernant les modalités d'élevage, il était nécessaire d'identifier le parcours individuel de chacun des animaux suivis dans l'étude.

La localisation des animaux dans les différentes salles a été relevée au fur et à mesure des visites (emplacement des animaux, contacts éventuels avec d'autres porcs, mélanges) et des fiches de suivi individuel des animaux ont été confiées à l'éleveur pour renseigner les troubles de santé et les traitements administrés (en particulier, les traitements antibiotiques).

La connaissance de ces traitements était particulièrement importante pour l'interprétation des résultats du dénombrement. Par ailleurs, l'aspect des matières fécales (« normales » ou « liquides »), la présence éventuelle de diarrhées et l'état clinique des animaux ont été évalués lors de chaque visite.

¹ GTTT : La Gestion Technique des Troupeaux de Truie sert à mesurer et à analyser les composantes de la productivité numérique des reproducteurs

² GTE : La Gestion Technico-Economique des ateliers porcins a pour objectif de calculer le produit de l'atelier, le coût alimentaire et la marge sur coût et renouvellement

2.2. REALISATION ET ORGANISATION DES PRELEVEMENTS

2.2.1. PLANIFICATION DES PRELEVEMENTS (FIGURE 1)

Dans un premier temps, les prélèvements ont eu lieu toutes les semaines : les 2 premières semaines avant la mise-bas pour les truies puis les 5 semaines suivant la mise-bas pour les truies et les porcelets. Ils se sont ensuite espacés pour le premier élevage (élevage I) à un prélèvement toutes les 3 semaines pour les porcelets jusqu'à l'abattage, et à un prélèvement en 8^e, 11^e et 17^e semaine après la mise bas pour les truies (Figure 1a).

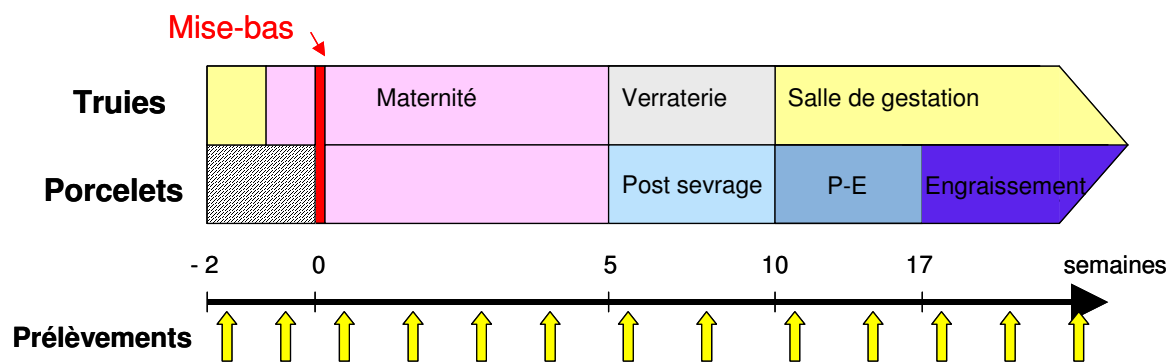


Figure 1a : Planification des prélèvements (élevage I)

Pour le second élevage (élevage II), ce protocole a été modifié et les animaux ont été prélevés de manière plus fréquente en fin de production, à savoir pour les truies et les porcs en engraissement, une fois en 8^e, 11^e, 13^e, 14^e, 17^e semaine puis une fois par semaine pendant la fin de la période d'engraissement (de la 17^e à la 23^e semaine, dernier prélèvement avant le départ à l'abattoir des animaux) (Figure 1b) (Annexes 1 et 2).

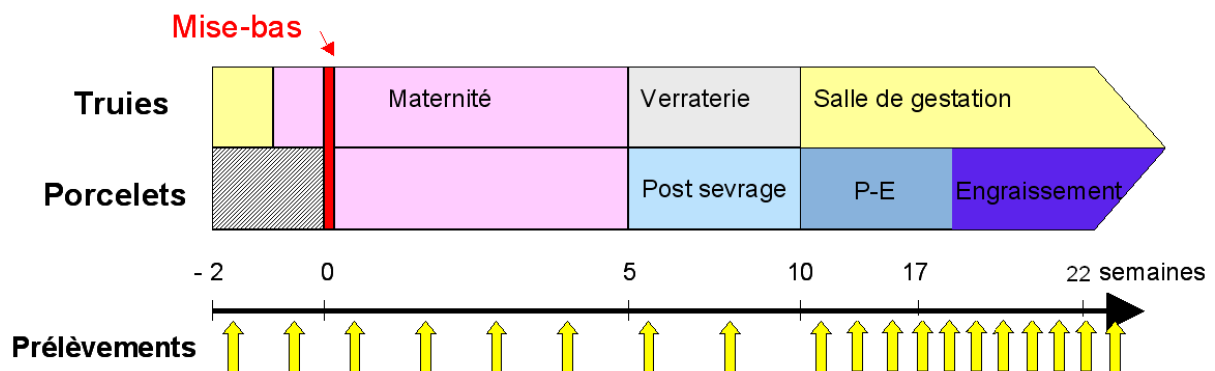


Figure 1b : Planification des prélèvements (élevage II)

2.2.2. PRELEVEMENTS INDIVIDUELS DE MATIERES FECALES

Les prélèvements individuels de matières fécales ont été réalisés directement après stimulation manuelle du rectum ou éventuellement à l'aide d'un écouvillon (technique mise en œuvre essentiellement pour les prélèvements des porcelets en début de maternité). Les matières fécales étaient alors immédiatement placées dans des pots stériles identifiés par le code de l'animal prélevé et la date, les gants et les écouvillons éventuels étant changés pour chaque prélèvement. La quantité prélevée a été systématiquement pesée au laboratoire afin de pouvoir réaliser une quantification des *Campylobacter* par gramme de matières fécales.

2.2.3. PRELEVEMENTS ENVIRONNEMENTAUX

L'environnement a fait l'objet de prélèvements en présence des animaux : l'ensemble de la surface au sol et la paroi de la case dans laquelle ceux-ci se situaient a systématiquement été chiffonnée sur tout le périmètre de la case. Chaque prélèvement environnemental était alors replacé dans un sachet stérile, identifié et daté. Lors de la réalisation de ces prélèvements, les amas de matières fécales fraîches ont été évités.

De plus, pour chacune des salles et dans toutes les cases que les animaux étaient amenés à occuper au cours du cycle de production, l'environnement a été prélevé de la même manière à la fin du vide sanitaire, après le cycle nettoyage / désinfection et avant l'arrivée dans la salle des animaux de la bande étudiée. Les surfaces prélevées ont été mesurées afin de quantifier le nombre de *Campylobacter* par unité de surface.

2.2.4. PRELEVEMENTS DES ALIMENTS, DE L'EAU ET AUTRES PRELEVEMENTS EVENTUELS

Deux types de prélèvements d'aliments ont été effectués : (i) dans les sacs ou en silo avant leur distribution aux animaux et (ii) dans l'auge des animaux, en présence de ces derniers. Les aliments prélevés en silo étaient identifiés par rapport à la catégorie d'animaux à laquelle ils étaient destinés. Les prélèvements d'aliments dans l'auge ont été identifiés par rapport aux animaux se trouvant dans la case l'aliment était distribué.

L'eau a été prélevée une fois pour le bloc verraterie / salle gestante, une fois pour le bloc maternité et une fois pour le bloc post-sevrage / engraissement au niveau d'un robinet en

amont du réseau de distribution aux salles.

Durant toute la durée du suivi, nous sommes restés attentifs à la présence d'autres animaux vivants ou morts dans les bâtiments d'élevage (chats, chiens, rongeurs, oiseaux), qui auraient pu faire l'objet d'une recherche de *Campylobacter*.

2.3. ANALYSES

2.3.1. ANALYSE BACTERIOLOGIQUE (ELEVAGE I)

Tous les prélèvements ont été conservés sous couvert du froid positif et mis en culture dans un délai de cinq heures. Les échantillons ont alors fait l'objet d'un isolement direct pour dénombrer les bactéries présentes et d'un isolement après enrichissement si le dénombrement se révélait négatif (Figure 2).

Cinq grammes de matières fécales ont été diluées au dixième dans 45 mL de bouillon Preston dans un sac stomacher (Composition des milieux en Annexe 3). Le nombre d'Unité Formant Colonie de *Campylobacter* par gramme de matières fécales (UFC/g MF) a été déterminé sur gélose Karmali par étalement au rateau de 100 µL de la suspension mère et par étalement au spiral (ensemenceur spiral EddyJet®) de deux dilutions décimales dans de l'eau peptonnée (dilutions 10^{-2} et 10^{-4} de la solution mère). Le comptage des colonies a été réalisé après incubation des géloses 48h à 42°C en atmosphère microaérophile. En parallèle, un isolement après une phase d'enrichissement du bouillon Preston pendant 24h à 42°C est réalisé sur gélose Karmali si le dénombrement se révèle négatif.

Pour les chiffonnettes utilisées lors des prélèvements environnementaux et pour les aliments, la réalisation de la solution mère a consisté à ajouter dans leur sachet stérile 45mL de bouillon Preston. Après un stomachage de 30 secondes, des dilutions décimales dans de l'eau peptonnée ont été réalisées en vue de l'isolement direct (identique à celui réalisé pour les matières fécales et les aliments) et le reste du prélèvement est enrichi dans le bouillon Preston pendant 24h à 42°C. Si le dénombrement se révèle négatif, un isolement après cette phase d'enrichissement est réalisé sur gélose Karmali.

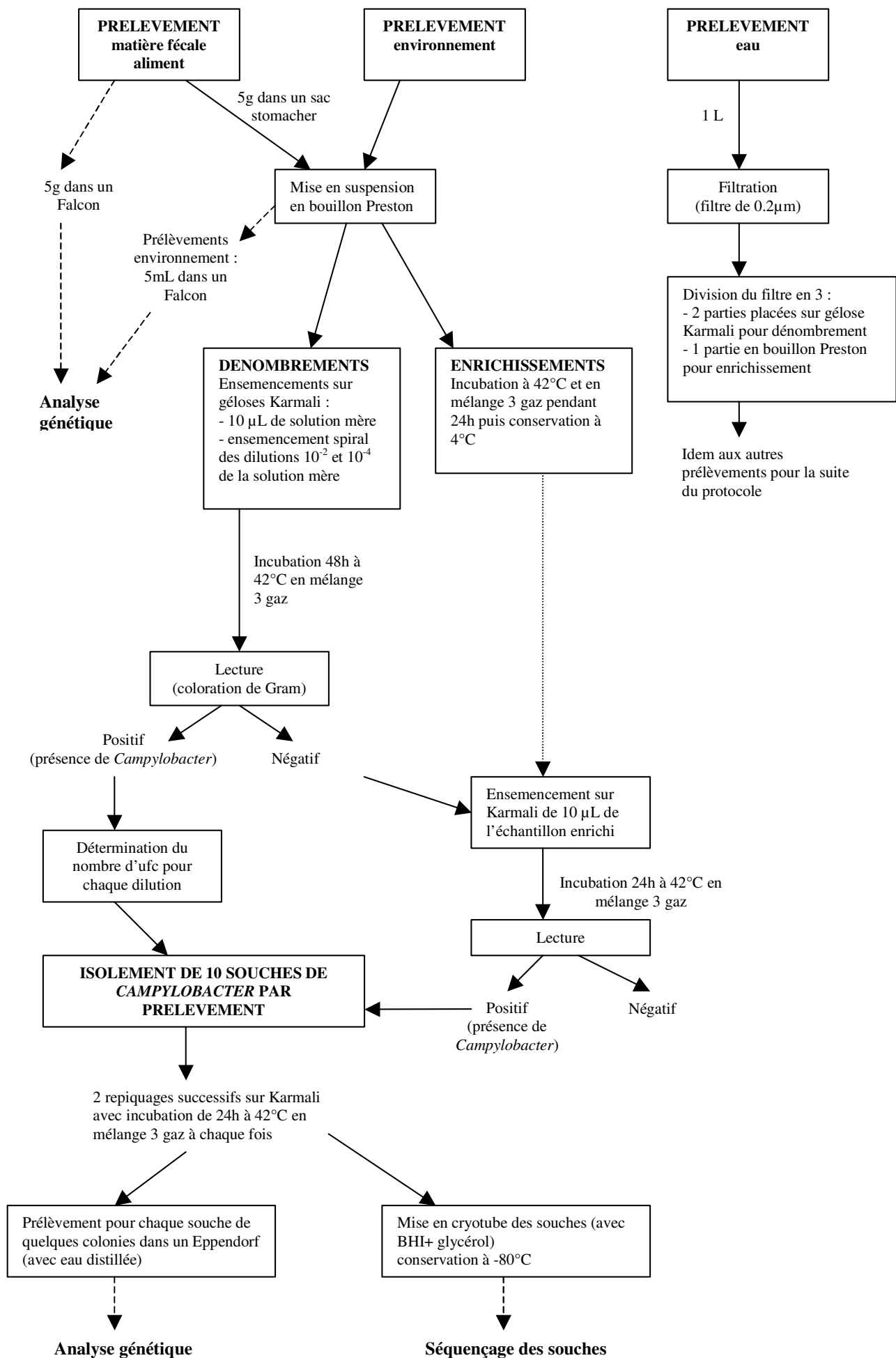


Figure 2 : Représentation schématique du protocole mis en œuvre dans l'analyse des prélèvements.

Enfin, pour chacun des prélèvements d'eau, un litre a été filtré à l'aide d'une pompe à vide au travers d'une membrane possédant des pores de 0.2 µm de diamètre (cellulose nitrate filter, Sartorius®). La membrane a ensuite été découpée en trois morceaux, deux étant placés sur des géloses Karmali (ensemencement), le troisième étant placé dans un sac stomacher avec 10 mL de bouillon Preston (enrichissement).

2.3.1.1. Lecture et détection

La lecture des boîtes a été effectuée au bout de 48h d'incubation. Cette lecture consistait en un premier examen visuel permettant avec l'habitude de détecter les colonies de *Campylobacter* les plus caractéristiques (bombées, grises, petites), alors que les colonies suspectes faisaient l'objet d'une coloration de Gram et d'un examen microscopique.

En l'absence de colonies de *Campylobacter*, 10 µL de l'échantillon enrichi était ensemencé sur une gélose Karmali et incubé 24h à 42°C dans une atmosphère microaérophile. Par conséquent, le prélèvement n'était pas déclaré négatif après l'isolement direct puisque qu'un enrichissement était systématiquement pratiqué pour confirmer ou infirmer ce résultat. La limite de détection par cette méthode d'ensemencement direct se situe à 10² UFC par gramme de prélèvement, compte tenu de la dilution du prélèvement réalisé et de la quantité ensemencée.

2.3.1.2. Dénombrement

Toutes les boîtes présentant des colonies suspectées d'être des *Campylobacter* par leurs caractères morphologiques macroscopiques et/ou microscopiques ont fait l'objet d'un dénombrement. Lorsque le nombre de colonies était trop élevé pour être compté directement une à une, une méthode de comptage par extrapolation permise par l'ensemencement spiral a été appliquée aux dilutions 10⁻² et 10⁻⁴, alors que la solution mère était simplement notée I pour indénombrable. Cette méthode particulière de comptage repose sur l'utilisation d'un abaque fourni par le constructeur de l'ensemencement spiral, c'est-à-dire ici d'un disque de comptage (Figure 3). Ce disque transparent, apposé sur le couvercle de la boîte de Pétri, permet de délimiter des secteurs restreints sur la surface de gélose. Le principe est alors de compter un premier secteur, puis éventuellement un deuxième, un troisième, etc., dans un

ordre défini de la périphérie vers le centre, jusqu'à atteindre le nombre de 30 colonies. Un calcul d'extrapolation effectué selon les instructions du fournisseur permet ensuite, à partir du dernier secteur compté et du nombre de colonies trouvé, d'obtenir le nombre total de colonies présentes sur toute la boîte.

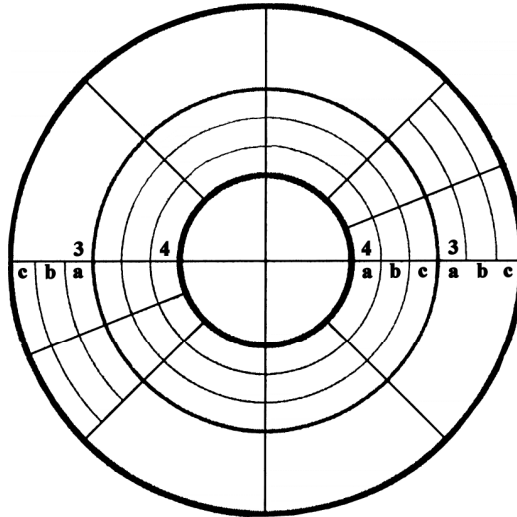


Figure 3 : Disque de comptage utilisé pour les boîtes de Karmaliensemencées en spirale

2.3.1.3. Enrichissement

Tous les prélèvements ont systématiquement fait l'objet d'un enrichissement en plus de leur ensemencement direct. Ces enrichissements sont placés à 4°C, dans l'attente de leur éventuelle utilisation si les ensemencements directs du prélèvement se révèlent négatifs. Dans ce cas, 0,1 ml de la solution d'enrichissement est ensemencé sur gélose Karmali puis incubé pendant 24h en condition microaérophile. Au bout de 24h de cette seconde incubation la boîte de Pétri peut être lue de la même manière que pour les boîtes sans enrichissement préalable, le dénombrement étant bien entendu sans objet. Cette méthode permet de détecter les prélèvements qui contiennent moins de 10^2 UFC de *Campylobacter* par gramme de prélèvement.

L'analyse bactériologique est déclarée négative pour le prélèvement si aucune colonie n'est observée après l'enrichissement.

2.3.1.4. Isolement et conservation

Pour chaque prélèvement positif, 10 colonies ont été isolées par deux repiquages successifs sur Karmali, les repiquages étant séparés par une période d'incubation de 24h à 42°C en atmosphère à 10% de CO₂, 5% de O₂ et 85% de N₂. Les 10 isolats ainsi obtenus ont été mis en suspension dans un milieu de conservation constitué de BHI avec 10% de glycérol et placés en cryotubes à -80°C.

Pour chacun des isolats, un extrait d'ADN a été réalisé afin de réaliser une PCR permettant d'identifier le genre *Campylobacter* et éventuellement de déterminer l'espèce (*C. coli* ou *C. jejuni*). Au départ, la PCR conventionnelle multiplex décrite par Denis *et al.* (1999) a été utilisée puis par la suite, les PCR quantitatives mises au point et validées décrites dans le Chapitre II ont été utilisées. Les isolats sont conservés à -80°C et les ADN extraits sont stockés à -20°C.

2.3.2. ANALYSE MOLECULAIRE PAR PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL

Pour l'analyse génétique, nous avons utilisé les deux méthodes de PCR quantitatives en temps réel mises au point et décrites dans le chapitre II.

Pour l'élevage I, cette analyse a été menée en parallèle de l'analyse bactériologique pour valider la méthode en conditions réelles.

Pour l'élevage II, seule l'analyse par PCR a été réalisée permettant de quantifier et d'identifier les *Campylobacter* éventuellement présents : *C. jejuni*, *C. coli* ou d'autres espèces de *Campylobacter*.

Pour les matières fécales et les aliments, l'analyse par PCR a été réalisée à partir de 5g d'échantillon. Lorsque le prélèvement était une chiffonnette, l'analyse a été effectuée sur 5mL du liquide obtenu après addition de 45 mL de bouillon Preston et stomachage pendant 30 secondes.

L'ADN a alors été extrait avec le Nucleospin® Tissue mini-kit (Macherey Nagel) après une pré-étape d'ébullition (Annexe 4). Ensuite, les protocoles suivis correspondent aux protocoles décrits dans les articles 1 et 2 du Chapitre II.

2.3.3. EXPLOITATION DES DONNEES

Pour l'élevage I, nous avons tenu compte uniquement de l'analyse bactériologique lors de la définition d'un prélèvement positif ou négatif en *Campylobacter spp.* (Tableau 1). En effet, pour cet élevage, les données obtenues par l'analyse bactériologique, prise comme référence (« gold standard »), ont permis de valider les données des méthodes quantitatives de PCR en temps réel. Néanmoins, il est important de noter que nous ne pouvons pas exclure l'existence de faux positifs dus à des bactéries morphologiquement semblables aux *Campylobacter* lorsque l'on s'appuie uniquement sur l'analyse bactériologique.

Tableau 1 : Présentation des différents résultats possibles après l'analyse bactériologique des prélèvements et de leurs dénominations

Prélèvement	Résultat de l'analyse bactériologique	Interprétation	Dénomination du résultat
Ecouvillon rectal : (quantité de matières fécales insuffisante lors du prélèvement)	Positif	Présence de <i>Campylobacter</i> , sans information quantitative	P (présence)
	Négatif	Absence de <i>Campylobacter</i>	0
Matières fécales en nature, aliment, eau, chiffonnettes environnementales	Ensemencement direct positif	Présence de <i>Campylobacter</i> , information quantitative	Valeur chiffrée obtenue avec le dénombrement
	Ensemencement direct négatif, ensemencement positif après enrichissement	Présence de <i>Campylobacter</i> , concentration inférieure à 10 ² UFC/g	P (présence)
	Ensemencement directs et ensemencement après enrichissement négatifs	Absence de <i>Campylobacter</i>	0

Pour l'élevage II, seule l'analyse par PCR a été réalisée. Avant de lire les résultats de chaque échantillon, les témoin négatifs, les témoins positifs ainsi que les NTC¹ (Non template Control) ont été contrôlés pour valider l'analyse par PCR et vérifier la fiabilité des résultats. Cette analyse est essentielle car elle permet par exemple de déceler d'éventuels problèmes de contamination, une amplification de produits non spécifiques ou au contraire une absence d'amplification. Si tout est conforme, la courbe standard obtenue à partir de la gamme étalon autorise la quantification précise des échantillons (nombre de *Campylobacter* présents dans l'échantillon en UFC/g de matières fécales par exemple).

La validité des résultats est alors ensuite vérifiée par l'analyse des résultats de l'amplification du contrôle interne et l'allure des courbes de fluorescence. Une absence d'amplification du contrôle interne souligne la présence d'inhibiteurs de la PCR dans l'échantillon. Les résultats ne sont alors pas interprétables et les échantillons sont écartés de l'étude.

Pour certains échantillons, on observe pour le contrôle interne un Ct inférieur au Ct attendu. Là encore, ce résultat met en évidence une inhibition de la PCR. Néanmoins, si les résultats quantitatifs ne sont pas interprétables (sous-évaluation possible) mais qu'une amplification est observée pour la cible de la PCR (*Campylobacter spp.*, *C. coli* ou *C. jejuni*), on peut réaliser une analyse qualitative et conclure à la présence de *Campylobacter*.

2.3.4. ANALYSE STATISTIQUE

Nous avons testé par analyse de variance l'existence d'un effet «case» et «date de prélèvement» sur les quantités de *Campylobacter* excrétés dans les matières fécales des porcelets à partir du post-sevrage (au seuil de signification de 5%). Si l'analyse de variance globale indiquait un effet, les résultats obtenus aux différentes dates de prélèvements ont été comparés deux à deux. La corrélation entre le niveau de contamination de l'environnement et le niveau d'excrétion des porcs a également été évaluée. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel Excel.

¹ NTC : Non template Control. Il s'agit des contrôles contenant uniquement le mix réactionnel de PCR et de l'eau (celle utilisée pour réaliser le mix). Ces témoins négatifs sans ADN permettent de valider l'analyse PCR en vérifiant l'absence d'amplification « parasite » ou de contamination lors de la réaction d'amplification.

3. RESULTATS

3.1. CONDUITE D'ELEVAGE ET SUIVI DES ANIMAUX INCLUS DANS L'ETUDE

3.1.1. DESCRIPTION DES ELEVAGES

L'étude a été menée successivement dans deux élevages naisseurs-engraisseurs, situés en Loire Atlantique, entre avril et octobre 2007 pour l'élevage I puis entre janvier et juillet 2008 pour l'élevage II.

Les deux élevages comptent environ 200 truies dont la conduite s'effectue en 7 bandes avec un âge au sevrage de 28 jours. Les femelles sont croisées Largewhite x Landrace et les mâles sont des Piétrains purs ou des croisés Piétrain x Largewhite. Les données GTT et GTE sont disponibles et ces élevages ont des performances dans la moyenne de la région.

Chacun des deux élevages renouvelle quarante à cinquante pour cent du troupeau tous les ans par auto-renouvellement, seules quelques truies Landrace sont achetées à l'extérieur chaque année. Un premier bâtiment est réservé pour la maternité et les truies en gestation. Le post-sevrage et l'engraissement ont lieu dans un deuxième bâtiment et un troisième sert à la fabrication d'aliments.

L'élevage I comprend également un atelier de bovins allaitants. Trois personnes interviennent dans l'élevage porcin, avec des rôles plus ou moins spécialisés mais interchangeables, une seule personne effectuant le travail durant les week-ends et les vacances. L'élevage II est dirigé par une seule personne, aidée par ses parents dans des tâches prédéfinies et par un salarié présent à temps plein.

Pour ces deux élevages, hormis les aliments démarrage, tous les aliments sont fabriqués à la ferme. Les animaux reçoivent des aliments différents selon leur stade décrits dans le Tableau 2. La nourriture des porcelets jusqu'à la période d'engraissement est sèche et l'aliment et l'eau sont distribués à volonté. En phase d'engraissement ainsi que pour les reproducteurs, la nourriture est sous forme de soupe (farine diluée dans de l'eau) et distribuée à heures fixes.

Tableau 2 : Différents types d'aliments donnés aux animaux en fonction de leur stade de croissance ou de leur stade physiologique

	ELEVAGE I	ELEVAGE II
Porcelets Alimentation sèche sous forme de farine	Aliment démarrage Porcelet 1 4-8 jours	Aliment starter 4-10 jours
	Aliment démarrage Porcelet 2 8-28 jours	Mélange aliment starter et aliment 1 ^{er} âge 10-15 jours
		Aliment 1 ^{er} âge
Porcelets post-sevrage Alimentation sèche sous forme de farine puis transition vers la soupe	Aliment 1 ^{er} âge	Aliment 1 ^{er} âge
	Aliment 2 ^{ème} âge	Aliment 2 ^{ème} âge
	Aliment pré-engraissement distribué sous forme de soupe	
Porcs engraissement Alimentation sous forme de soupe (mélange farine/eau)	Aliment engraissement	Aliment engraissement
	Aliment finition	
Reproducteurs Alimentation sous forme de soupe	Période de saillie Soupe	Période de saillie Soupe
	Gestation/maternité Soupe + complément	Gestation/maternité Soupe + complément

3.1.2. PRATIQUES D'ELEVAGE ET HYGIENE

Les élevages de notre étude respectent la plupart des principes de précautions sanitaires : les bâtiments d'élevage sont fermés et les animaux familiers n'y ont pas accès, les porcs introduits dans l'élevage proviennent toujours du même fournisseur et passent par une quarantaine et un vide sanitaire précédé d'un nettoyage-désinfection de la salle est effectué.

Divers éléments et dérives à ces précautions existent cependant et pourraient avoir un rôle épidémiologique dans l'infection des porcs de ces élevages par *Campylobacter*. Ainsi les différents secteurs de l'élevage sont séparés physiquement mais les éleveurs vont d'un bâtiment à un autre sans changer de tenue ni de chaussures.

De plus, les porcs passent tous par les mêmes couloirs et par l'extérieur pour aller d'une salle à une autre entre deux étapes de l'élevage (par exemple du post-sevrage à l'engraissement). Il n'existe pas de pédiluve entre les différentes salles et les lieux de passage des hommes et des porcs entre deux salles ne sont pas nettoyés et désinfectés à chaque passage.

Les différentes bandes de truies sont logées ensemble dans les salles « gestante » et « saillie », où le vide sanitaire n'est jamais réellement respecté puisque, bien que la rangée de cases soumise à la désinfection et au vide sanitaire soit effectivement libre, les autres rangées de la même salle sont occupées par les truies d'autres bandes.

Les truies qui reviennent en chaleur alors que leurs congénères entrent en salle gestante sont d'ailleurs souvent décalées dans la bande suivante. Les porcs charcutiers de bandes différentes sont également susceptibles de se croiser : les animaux les plus chétifs en fin d'engraissement (« queue de bande ») sont regroupés en une case et poursuivent l'engraissement durant trois semaines avec la bande suivante (même salle mais case différente). Ce système peut parfois poser des problèmes pour réaliser un nettoyage complet de la salle avec désinfection et vide sanitaire.

Au sein d'une même bande, les porcelets sont mélangés plusieurs fois : une première fois entre 24h et 48h après la naissance (homogénéisation de la taille des portées, adoption des plus gros porcelets par les plus vieilles truies et des plus petits par les plus jeunes), une deuxième fois à l'entrée en post-sevrage (tri par taille), une troisième fois à l'entrée en pré-engraissement (tri par taille) et éventuellement à l'entrée en engraissement.

Ils peuvent également être mélangés une nouvelle fois en cas de dépassement des capacités de la maternité, les plus gros porcelets de chaque portée étant alors sevrés précocement à une douzaine de jours puis regroupés dans une salle « nounou » jusqu'au début du post-sevrage. La salle « nounou » correspond à une ou deux cases de la salle de post-sevrage et sera utilisée par la suite pour tous les porcelets de la bande (il n'y a dans ce cas pas de nettoyage ni de vide sanitaire entre l'utilisation d'une partie de cette salle en tant que salle nounou et en tant que salle de post-sevrage, seulement l'utilisation éventuelle d'asséchant). Enfin, pour les porcs charcutiers, les différentes salles sont fréquemment surchargées, du post-sevrage à l'engraissement.

3.1.3. SUIVI DES ANIMAUX INCLUS DANS L'ETUDE

3.1.3.1. Description pour l'élevage I

✓ Truies

Cinq truies ont été suivies dans le cadre de notre étude, de 3 semaines avant la mise-bas jusqu'à la mise bas suivante. Le choix des truies s'est effectué en privilégiant l'hétérogénéité des âges et donc des rangs de portée (Tableau 3).

Tableau 3 : Identité et âge des truies de l'élevage I incluses dans l'étude

Dénomination dans l'étude	Numéro d'identification	Rang de portée
Truie A	1768	1 ^{ère} portée
Truie B	1662	3 ^e portée
Truie C	1657	2 ^e portée
Truie D	1692	2 ^e portée
Truie E	1663	3 ^e portée

Les truies C et E ont été réformées avant la fin de notre étude, la truie C juste avant le 9^e prélèvement et la truie E entre le 11^e et le 12^e prélèvement. Leurs positions respectives dans les salles et leurs parcours sont rapportés dans les Figures 4 et 5.

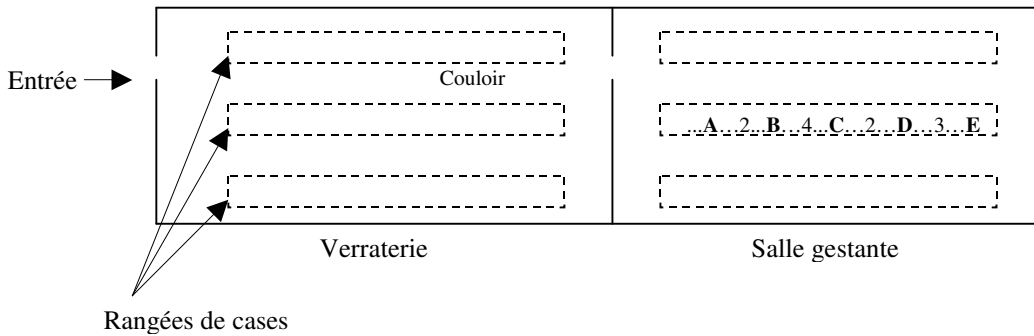
Numéro des visites	1	2	3	mise bas = j 0	4	5	6	7
Date par rapport à j (jour de la mise bas)	j-13	j-10	j-3		j+4	j+11	j+18	j+25 (sevrage à 28j)
Emplacement des truies	Salle gestante			Maternité				
Emplacement des porcelets					Maternité			

Numéro des visites	8	9	10	11	12	13	14	15
Date par rapport à j (jour de la mise bas)	j+4+5sem	j+4+8sem	j+4+9sem	j+4+11sem	j+4+14sem	j+4+17sem	j+4+20sem	j+4+23sem
Emplacement des truies	Verraterie			Salle gestante				
Emplacement des porcelets	Post-sevrage			Engraissement				

Figure 4 : Parcours des truies et des porcelets au cours de l'étude (élevage I)

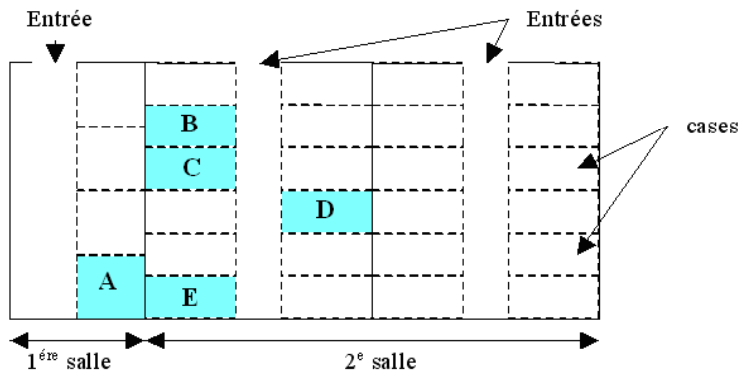
Les cinq truies n'ont pas présenté de troubles de santé particuliers durant la période de l'étude et elles n'ont pas reçu de traitement en dehors de la mise bas (sergotonine et ocytocyne à la mise bas pour chacune, corticoïdes en plus pour la truie A et la truie C qui avaient un œdème mammaire).

Position des truies en salle gestante pour les prélèvements 1 et 2

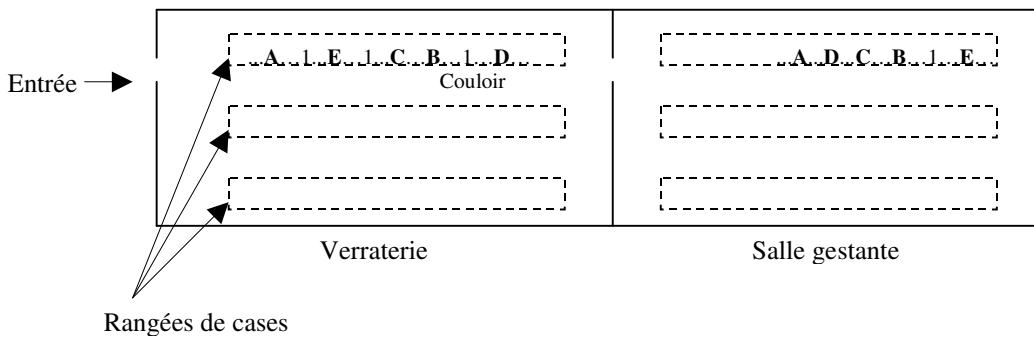


Les truies A, B, C, D et E sont sur la même rangée de cases, les chiffres entre les lettres représentent le nombre de truies qui les séparent.

Position des truies en maternité (prélèvements 2, 3, 4, 5, 6 et 7)



Position des truies en verraterie pour les prélèvements 8, 9 et 10 puis en salle gestante pour les prélèvements suivants



Les truies A, B, C, D et E sont sur la même rangée de cases, les chiffres entre les lettres représentent le nombre de truies qui les séparent. Les positions ne changent pas lorsqu'une truie est réformée (C puis E en salle gestante), sa place est prise par une autre.

Figure 5 : Localisation des truies dans les différentes salles au cours de l'étude (élevage I)

✓ Porcelets

Le parcours (Figure 4) et l'emplacement (Figures 6, 7 et 8) des différents porcelets ont été suivis. Entre le pré-engraissement et l'engraissement, les porcs ont changé de bâtiment mais n'ont pas été re-mélangés entre eux.

En maternité : les porcelets restent dans la case où est leur mère, qu'elle soit biologique ou adoptive (voir Figure 5 – Position des truies en maternité). Dans le cadre de notre étude, les porcelets sélectionnés n'ont pas fait l'objet d'adoption.

En post-sevrage : un premier remaniement des groupes de porcelets est effectué en fonction de leur taille, seules les cases de 1 à 6 sont occupées par les porcelets suivis au cours de cette étude. Chaque case comprend entre 30 et 35 porcelets.

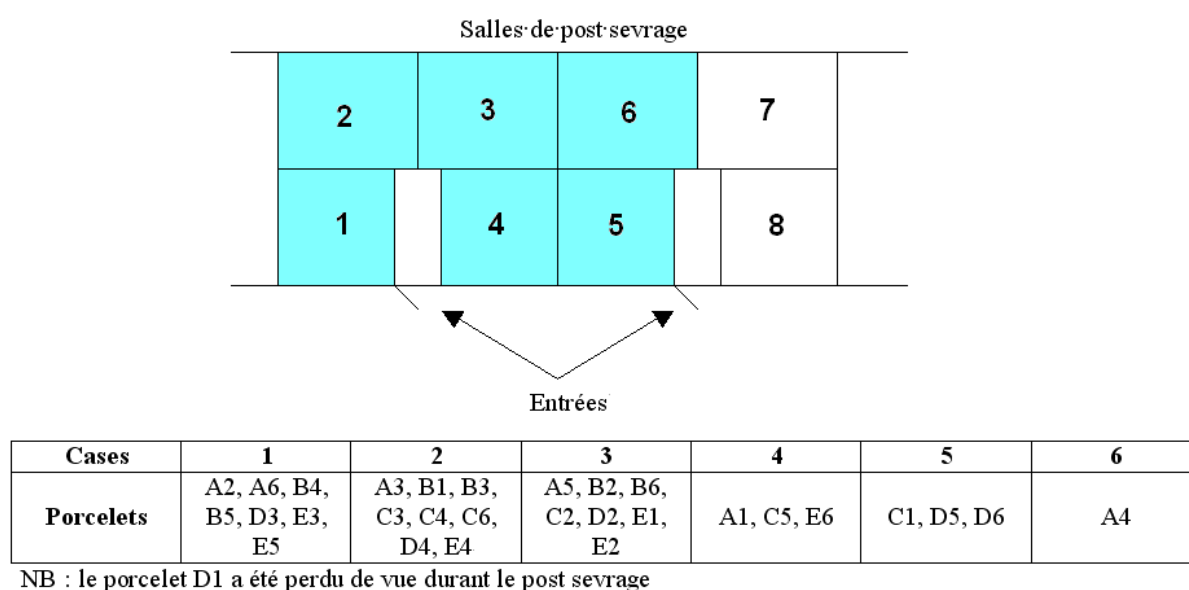


Figure 6 : Emplacement des porcelets en post-sevrage (élevage I)

En pré-engraissement : un deuxième remaniement des groupes de porcs a été fait par les éleveurs afin de regrouper les animaux par taille (tri selon le poids des animaux). Toutes les cases de la première salle contiennent des porcelets suivis au cours de cette étude, dans la deuxième salle, seules les cases 9 et 13 sont occupées (un et deux porcelets respectivement). Les cases occupées comprennent entre 15 et 20 porcs chacune. Deux porcelets (B4 et C1) ont été tués par les éleveurs avant l'entrée en engraissement.

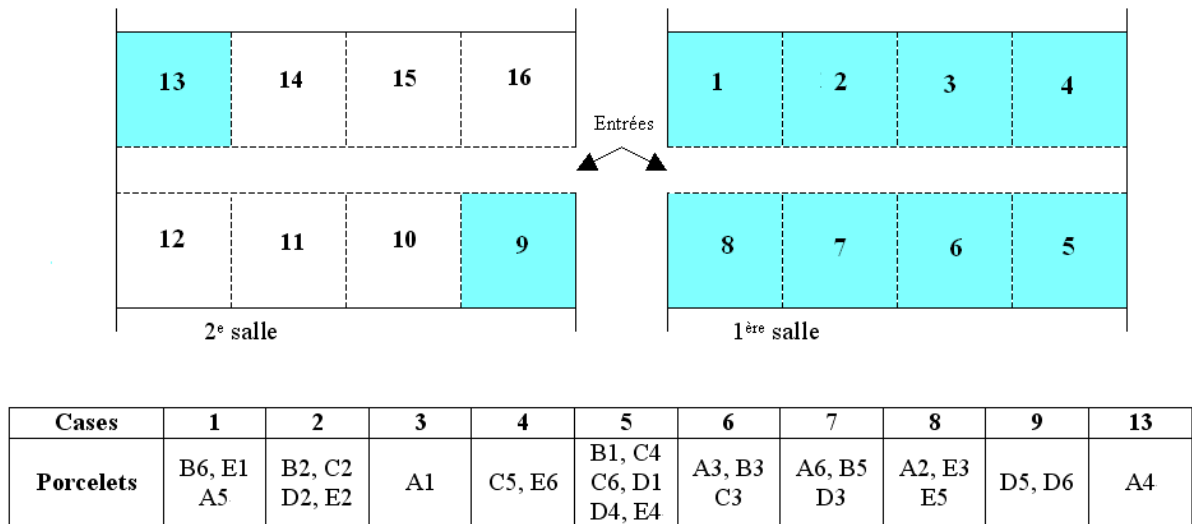


Figure 7 : Emplacement des porcelets en pré-engraissement (élevage I)

Emplacement des porcs en engraissement : Les animaux constituant une case n'ont pas été remélangés au moment du changement de salles. Cependant la localisation des cases occupées par les différents groupes d'animaux a été modifiée. Concernant les cases en elles-mêmes, la disposition est similaire à celle observée pour le pré-engraissement et chacune des cases comprend entre 15 et 20 porcs à l'engrais.

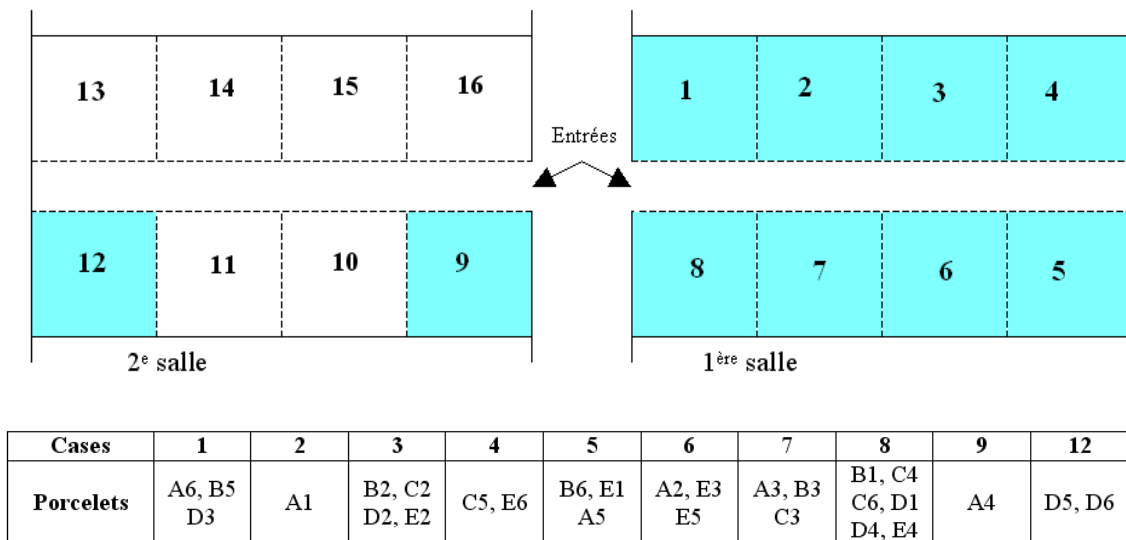


Figure 8 : Emplacement des porcelets en engraissement (élevage I)

Au cours de l'élevage, hormis en maternité où les porcelets des truies B et D ont reçu de la colistine (antibiotique inactif sur les *Campylobacter*) pendant 3 jours pour lutter contre des diarrhées, les porcs charcutiers n'ont pas présenté de troubles de santé nécessitant un traitement.

A chaque prélèvement, la consistance des matières fécales a été appréciée de manière à pouvoir détecter des diarrhées mais peu d'animaux en ont présentées après la maternité. Néanmoins, un seul traitement préventif a été effectué : les éleveurs ont administré de la tylosine (antibiotique actif sur les *Campylobacter*) aux porcelets à l'entrée en post-sevrage (5^e semaine de vie) pendant une semaine.

3.1.3.2. Description pour l'élevage II

✓ Truies

Cinq truies ont été suivies dans le cadre de notre étude, de 3 semaines avant la mise-bas jusqu'à la mise bas suivante. Le choix des truies s'est effectué en privilégiant l'hétérogénéité des âges et donc des rangs de portée (Tableau 4).

Tableau 4 : Identité et âge des truies de l'élevage II incluses dans l'étude

Dénomination dans l'étude	Numéro d'identification	Rang de portée
Truie A	149	2 ^e portée
Truie B	127	3 ^e portée
Truie C	116	3 ^e portée
Truie D	90	4 ^e portée
Truie E	79	4 ^e portée

Aucune des truies n'a été réformée avant la fin de notre étude.

Leur parcours est identique à celui décrit précédemment pour l'élevage I (Figure 4) mais la salle verraterie et la salle gestante sont regroupées en une même salle séparée en deux parties.

Les truies, en cases individuelles, sont ainsi déplacées dans la salle au cours du cycle de production en fonction du stade (attente saillie/insémination et gestation) mais leurs localisations respectives dans la salle (les unes par rapport aux autres) sont conservées (Figure 9).

Localisations des truies avant et après la mise bas

Positions des truies en maternité

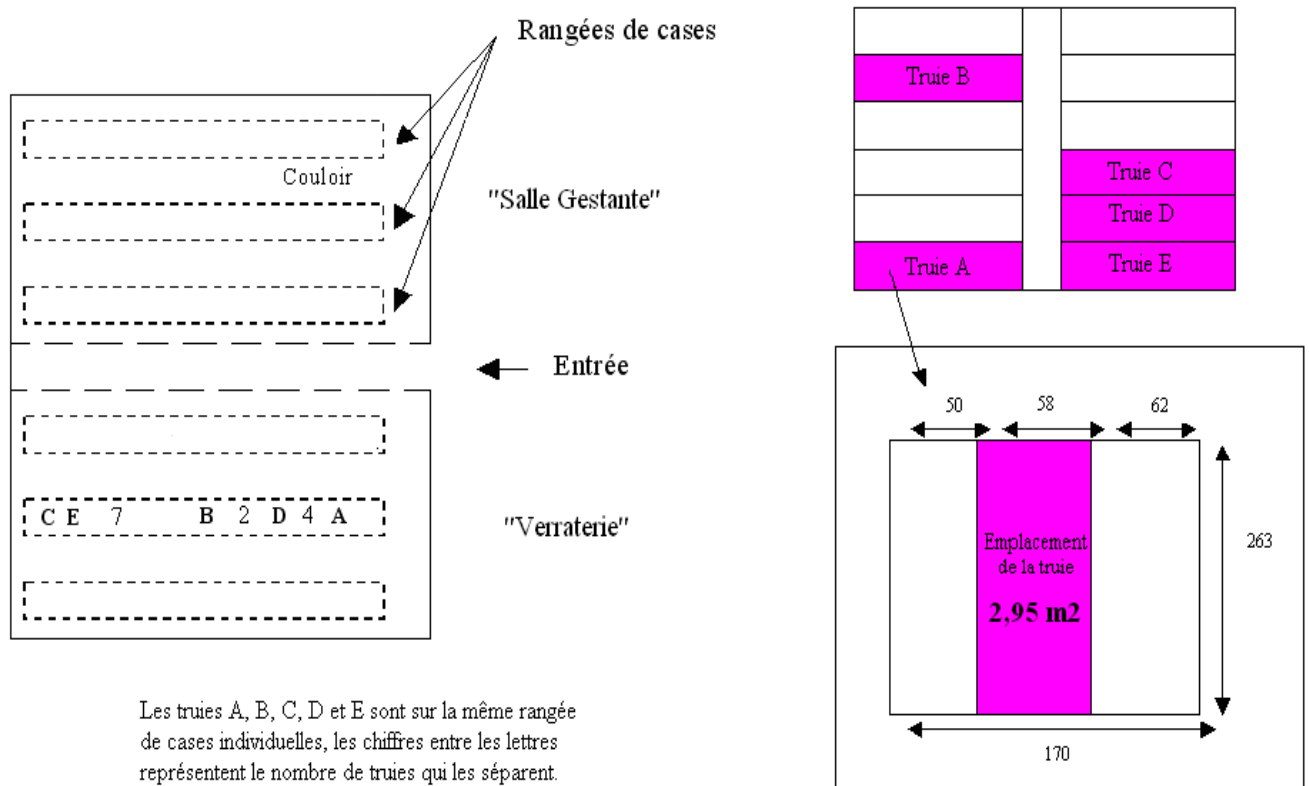


Figure 9 : Localisation des truies dans les différentes salles au cours de l'étude (les mesures indiquées pour les cases en salle maternité sont exprimées en mm) (élevage II)

Hormis la médication habituelle de la mise-bas (sergotonine et ocytocyne), les truies suivies dans l'élevage n'ont pas présenté de trouble de santé particulier durant la période de l'étude et aucun traitement actif contre les *Campylobacter* n'a été distribué aux animaux.

✓ Porcelets

En maternité : les porcelets restent dans la case où est leur mère, qu'elle soit biologique ou adoptive (voir Figure 9 – Position des truies en maternité)

En post-sevrage : un premier remaniement des groupes de porcelets est effectué en fonction de leur taille, seule la moitié des cases (cases numérotées de 1 à 5) est occupée par les porcelets suivis au cours de cette étude. Chaque case comprend entre 30 et 35 porcelets.

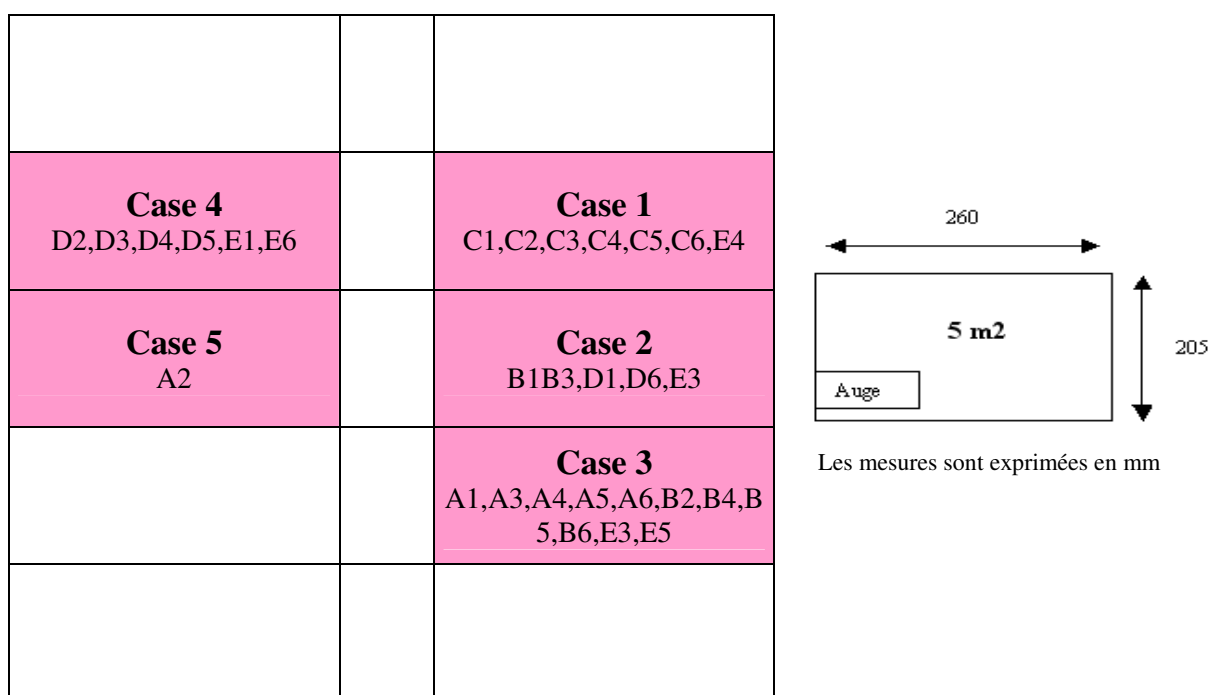


Figure 10 : Emplacement des porcelets lors du post-sevrage (élevage II)

En pré-engraissement (de la 9^{ème} à la 11^{ème} semaine de vie des animaux): un tri selon le poids des animaux a été effectué par l'éleveur pour regrouper ensemble les porcelets de taille homogène. Tous les porcelets ont été regroupés dans la même salle et seulement six cases sur les 10 (entre 15 et 20 porcs par case) sont occupées par les animaux suivis au cours de cette étude (Figure 11).

En engraissement (de la 11^{ème} semaine de vie jusqu'au départ à l'abattoir des porcs charcutiers) : un réallotement est réalisé par l'éleveur lors du transfert des animaux dans la nouvelle salle, parmi les animaux suivis, un seul remaniement a eu lieu : le porcelet E5 est passé de la case 9 à la case 3. La disposition des cases et des animaux suivis au cours de cette étude est donc quasi similaire à celle observée pour le pré-engraissement. Chacune des cases comprend entre 15 et 20 porcs à l'engrais.

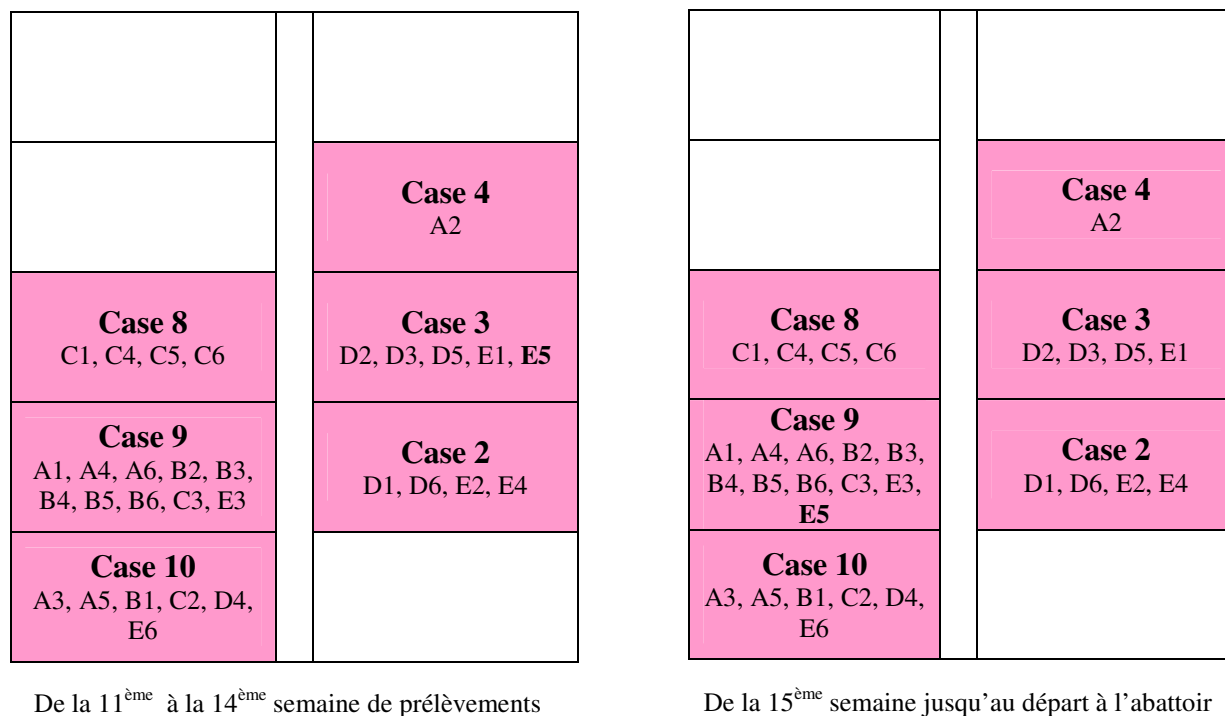


Figure 11 : Emplacement des porcelets en pré-engraissement et en engraissement (élevage II)

Au cours de la croissance des animaux, hormis en maternité où les porcelets ont eu du kaolin pendant quelques jours pour lutter contre des diarrhées, les porcs charcutiers n'ont pas présenté de troubles de santé nécessitant un traitement.

A chaque prélèvement, la consistance des matières fécales a été appréciée de manière à pouvoir détecter des diarrhées mais peu d'animaux en ont présenté après la maternité. Pour cet élevage, aucun traitement préventif à l'entrée du post-sevrage n'a été réalisé.

3.2. DESCRIPTION DE L'EXCRETION DE *CAMPYLOBACTER* CHEZ LES TRUIES

Pour l'élevage I, tous les prélèvements de matières fécales réalisés sur les truies se sont révélés positifs à l'analyse bactériologique et à l'analyse par PCR alors que trois prélèvements d'une truie de l'élevage II étaient négatifs suite à l'analyse moléculaire.

Pour les deux élevages, des variations importantes du niveau d'excrétion ont été observées allant d'une simple détection de *Campylobacter* dans les matières fécales après enrichissement (contamination inférieure à 100 UFC/g MF) à plus de 10⁷ UFC/g MF (Tableau 6). L'excrétion fécale des truies a été suivie tout au long du cycle de production (sur 13 et 17 prélèvements pour l'élevage I et II respectivement) et elle est comprise en moyenne à chaque prélèvement entre 10⁴ et 10⁷ UFC/g MF (Tableau 5).

Tableau 5 : Excrétion fécale de *Campylobacter* par les truies au cours du cycle de production (13 et 17 prélèvements pour l'élevage I et II respectivement)

Excrétion fécale de <i>Campylobacter</i> en log (UFC/g MF) pour les truies des élevages I et II																		
	Prélèvement	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Elevage I	Truie A	6,5	5,6	1,7	-	5,1	7,1	5,6	4,1	4,3	-	4,3	5,8	6,2				
	Truie B	5,8	-	1,7	5,9	7,1	7,4	7,2	6,9	6,9	-	6,5	7,6	7,4				
	Truie C	6,8	-	4,3	5,2	5,0	7,5	7,7	4,3	truie réformée								
	Truie D	6,0	-	6,7	4,8	5,9	7,4	5,6	5,4	5,5	-	7,5	5,1	-				
	Truie E	7,0	7,1	7,2	6,1	7,4	7,2	6,8	6,4	5,6	6,3	truie réformée						
Elevage II	Truie A	7,2	X	5,8	5,7	6,2	4,9	5,8	4,2	5,3	6,6	6,4	7,2	6,9	6,9	5,1	6,9	5,6
	Truie B	5,7	6,3	5,2	4,9	-	6,5	4,0	-	4,7	5,7	5,2	4,8	5,8	5,0	5,5	-	3,7
	Truie C	X	5,0	4,5	X	4,0	5,2	5,9	4,2	4,3	5,0	4,9	3,7	4,4	5,8	6,2	6,1	6,0
	Truie D	4,6	3,8	0,0	3,7	0,0	4,1	3,6	3,7	3,2	0,0	3,8	4,3	5,7	7,3	3,4	4,4	3,1
	Truie E	5,3	5,2	3,0	7,7	6,8	3,4	7,3	7,7	2,7	4,7	5,1	6,5	5,6	7,6	6,4	5,2	4,7

X indique la présence d'inhibiteurs de la réaction

3.3. DESCRIPTION DE L'EXCRETION DE *CAMPYLOBACTER* CHEZ LES PORCELETS

3.3.1. PREVALENCE DE L'INFECTION ET EVOLUTION DE L'EXCRETION AU COURS DU TEMPS

Lors du premier prélèvement des porcelets, entre 3 et 5 jours après la mise bas selon les individus, 84% et 86% d'entre eux étaient excréteurs de *Campylobacter* pour l'élevage I et II respectivement (Figure 12).

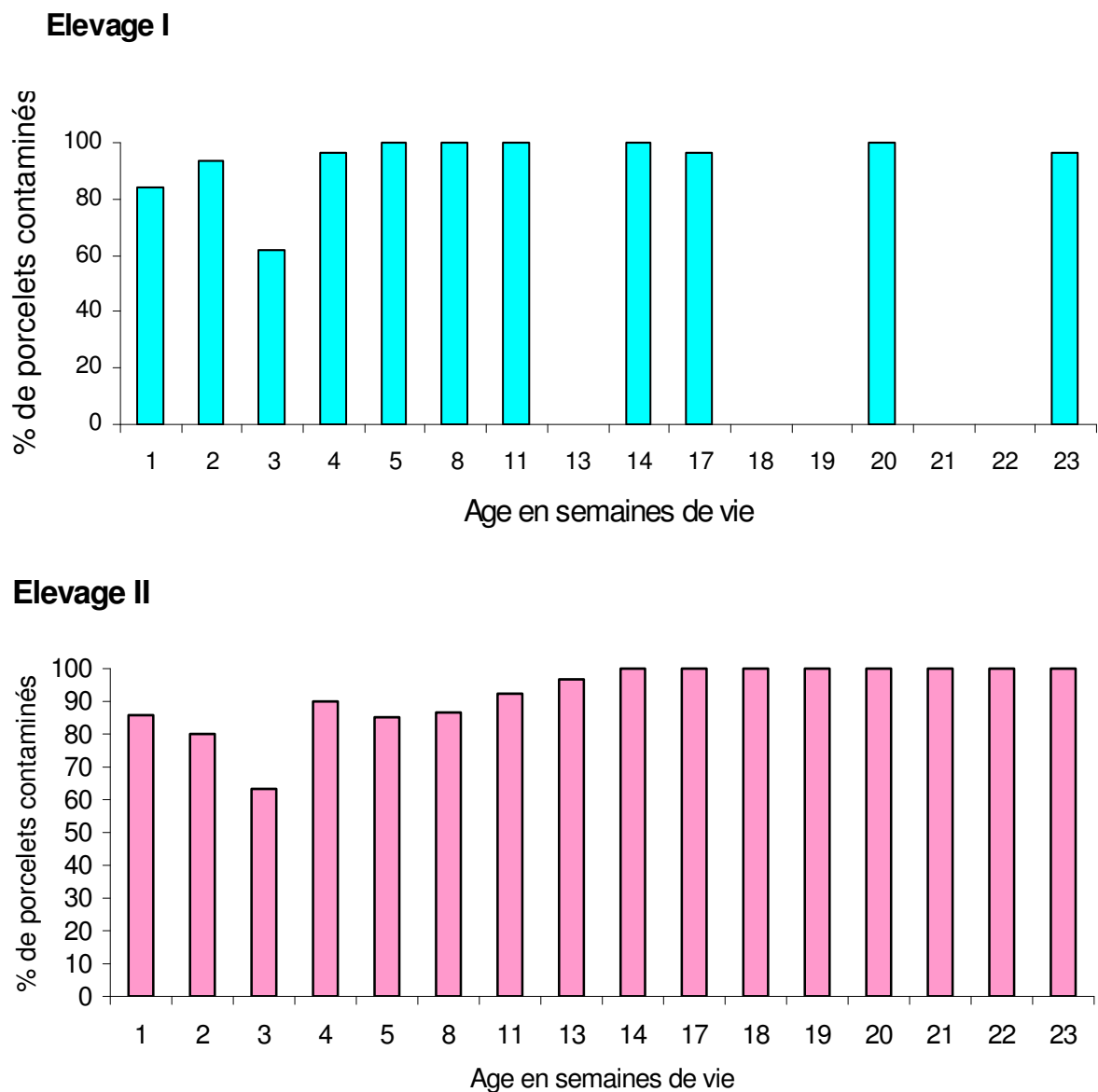


Figure 12 : Evolution du nombre de porcelets contaminés, excréteurs *Campylobacter*, au cours d'un cycle de production (résultats combinés de l'analyse bactériologique et de l'analyse moléculaire pour l'élevage I)

Dans les semaines qui ont suivi la naissance, la quantité de matières fécales récoltée étant souvent insuffisante (écouvillonnage), la quantification de l'excrétion avec l'analyse bactériologique n'a pas été possible pour certains prélèvements pour l'élevage I. L'application de l'analyse moléculaire aux écouvillons, prélèvements avec une faible quantité de matières fécales, a permis de compléter ces résultats. La figure 12 présente donc les résultats combinés des données de l'analyse bactériologique et des données de la PCR quantitative en temps réel. La prévalence d'infection est alors comparable pour les deux élevages avec notamment une diminution du nombre de porcelets contaminés à la troisième semaine. Pour l'élevage I, un porcelet n'excrète plus *Campylobacter* lors du dernier prélèvement.

L'excrétion fécale de *Campylobacter* apparaît continue dès la 5^e semaine de vie pour la majorité des animaux. Néanmoins, certains porcelets présentent des prélèvements négatifs au cours du temps et la quantité de *Campylobacter* excrétée varie dans des proportions importantes d'un prélèvement à l'autre pour un même animal et d'un individu à l'autre à la même date (Figure 13 et Tableau 6).

Pour les deux élevages, des prélèvements négatifs peuvent succéder à des prélèvements positifs (et *vice-versa*) avec des quantités excrétées plus ou moins importantes (Figure 13, Annexes 5 et 6).

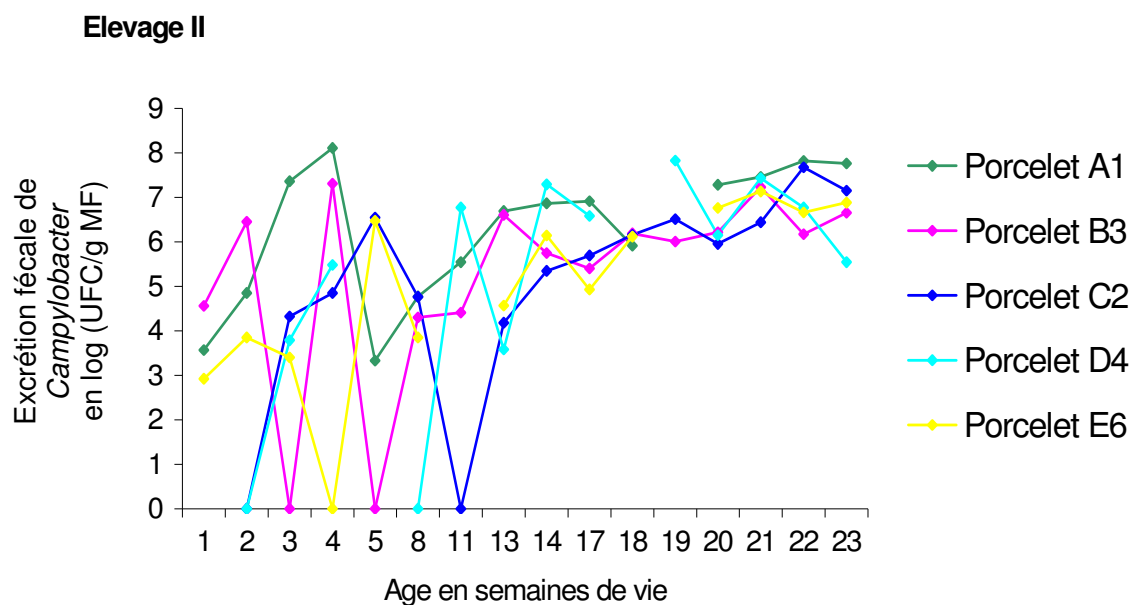


Figure 13 : Représentation graphique de l'excrétion fécale de quelques porcelets (élevage II)

Tableau 6 : Valeurs moyennes d'excrétion, valeurs maximales et minimales pour chaque prélèvement (élevage I)

Elevage	Age en semaines	Moyenne d'excrétion log (ufc/g MF)	Ecart-type	Minimum observé log (ufc/g MF)	Maximum observé log (ufc/g MF)	Effectif
Elevage I	1	8,5	4,2	0,0	9,3	8
	2	7,3	3,9	0,0	8,0	13
	3B	pas de valeur numérique avec l'analyse bactériologique (écouvillons)				
	3M	4,7	3,1	0,0	7,7	17
	4	8,1	4,0	0,0	8,7	21
	5	7,4	3,9	<2	8,3	23
	8	6,9	3,8	<2	7,5	26
	11	6,7	3,7	2,8	7,4	28
	14	5,5	3,4	3,0	6,6	26
	17	6,1	3,6	0,0	7,3	26
	20	5,9	3,2	3,3	7,1	26
	23	5,1	2,6	0,0	5,8	26
Elevage II	1	3,6	1,9	0,0	6,9	21
	2	3,6	1,9	0,0	7,2	30
	2	2,9	1,7	0,0	7,9	30
	4	5,3	2,3	0,0	8,6	30
	5	4,9	2,2	0,0	8,4	27
	8	3,8	2,0	0,0	7,3	30
	11	4,7	2,2	0,0	6,8	26
	13	5,1	2,3	0,0	7,5	30
	14	6,2	2,5	4,8	8,1	29
	17	5,7	2,4	4,7	7,1	26
	18	5,8	2,4	3,5	6,7	24
	19	6,5	2,6	4,1	7,8	27
	20	6,3	2,5	5,4	7,3	28
	21	6,8	2,6	5,5	7,5	30
22	6,4	2,5	4,8	7,8	30	
23	6,3	2,5	4,5	7,8	30	

B : Analyse bactériologique sur écouvillons ⇒ analyse qualitative (absence/présence après enrichissement)

M : Analyse moléculaire PCR en temps réel ⇒ analyse quantitative (possible sur une faible quantité de matières fécales)

En moyenne, les animaux de l'élevage II excrètent quantitativement moins de *Campylobacter* dans leurs matières fécales pendant la maternité, le post-sevrage et le pré-engraissement par rapport à ceux de l'élevage I. En fin de production, pendant la période d'engraissement, les quantités de *Campylobacter* excrétées par les porcs sont semblables pour les deux élevages. Par ailleurs, on remarque que la variabilité inter-individuelle de l'élevage II est moindre par rapport à celle de l'élevage I, ce pour toutes les dates de prélèvements.

3.3.2. EFFET «DATE DE PRELEVEMENT» SUR L'EXCRETION FECALE

Un effet significatif de la date de prélèvement sur les quantités excrétées a été mis en évidence par analyse de variance pour l'ensemble des visites pour les deux élevages et, outre la baisse du nombre de porcelets excréteurs la troisième semaine de vie, on observe une diminution significative de l'excrétion fécale lors de l'entrée en post-sevrage (Figure 14).

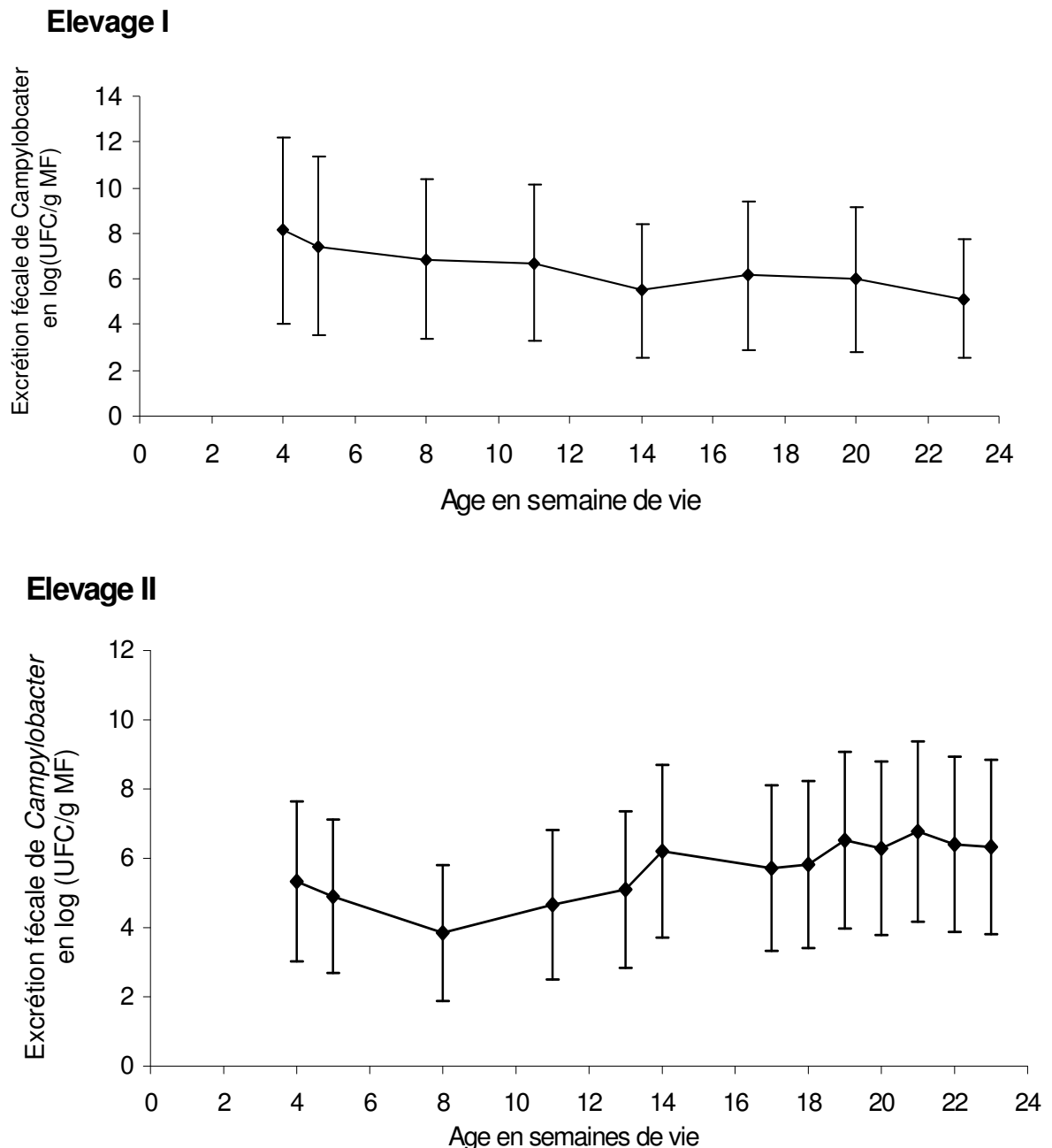


Figure 14 : Evolution de l'excrétion moyenne des porcelets au cours de la production et représentation des quantités excrétées par porcelets

Pour l'élevage I, un effet significatif de la date de prélèvement sur les quantités excrétées est observé à l'entrée en post-sevrage (entre la 4^{ème} et la 5^{ème} semaine de vie des porcelets) avec une diminution des quantités de *Campylobacter* excrétées par les animaux. Cette diminution se poursuit jusqu'au dernier prélèvement et l'effet « date de prélèvement » est significatif entre les deux visites réalisées en pré-engraissement (entre la 11^{ème} et la 14^{ème} semaine de vie).

Pour l'élevage II, on note un effet significatif entre la 3^{ème} et la 4^{ème} semaine de vie des porcelets avec une diminution des quantités de *Campylobacter* excrétées par les animaux. Ensuite, on observe une augmentation de l'excrétion fécale de *Campylobacter* chez les porcs à l'engrais, soit à partir de la 11^{ème} semaine de vie des animaux (ce qui correspond à l'entrée en salle d'engraissement). L'effet « date de prélèvement » sur les quantités excrétées est significatif plusieurs fois au cours de l'engraissement : on observe une augmentation entre la 13^{ème} et la 14^{ème} ainsi que pour la 18^{ème} et la 19^{ème} semaine de vie. On remarque également que l'on a une diminution significative des quantités de *Campylobacter* excrétées par les animaux entre la 19^{ème} et la 20^{ème} semaine de vie. Néanmoins, quand on s'intéresse aux quantités excrétées, la moyenne est comparable pour les deux élevages pendant la période d'engraissement (entre 5,5 et 6,7 UFC/g MF pour l'élevage I *versus* 5,7 et 6,8 UFC/g MF pour l'élevage II) (Tableau 7).

3.3.3. EFFETS «PORTEE» ET «CASE» SUR L'EXCRETION FECALE

Une éventuelle influence de la case dans laquelle se trouvent les animaux sur le niveau d'excrétion de ces mêmes animaux a été recherchée .

Jusqu'à l'entrée des animaux en post-sevrage, la case correspond à la portée d'où l'évaluation d'un éventuel effet « portée ». Ensuite, les animaux des différentes portées sont mélangés et on évaluera un éventuel « effet case » sur l'excrétion fécale des animaux.

Pour l'élevage I, en considérant uniquement l'analyse bactériologique, il est difficile de se prononcer sur l'évolution de l'excrétion fécale avant la 4^{ème} semaine de vie de porcelets car le nombre de prélèvements n'a pas pu être dénombré. L'analyse de la variance n'a donc pas été réalisée.

Par contre, en tenant compte des résultats de l'analyse moléculaire, un effet « portée » est observé pendant le sevrage pour les deux élevages (exemple pour l'élevage II, Tableau 7).

Tableau 7 : Comparaison du niveau d'excrétion des différents groupes d'animaux en maternité à une visite donnée par analyse de variance et mise en évidence d'un « effet portée » au cours du sevrage pour l'élevage II

Age (semaines)	Cases	Nombre de porcelets	Excrétion fécale moyenne log UFC/g MF	Variance	Ecart-type	Probabilité
2	Portée A	6	5,63	1,03	1,02	< 0,001
	Portée B	6	5,93	1,88	1,37	
	Portée C	6	1,79	1,95	1,40	
	Portée D	6	1,45	2,52	1,59	
	Portée E	6	2,97	2,17	1,47	
4	Portée A	6	6,41	1,27	1,13	< 0,001
	Portée B	6	7,51	0,60	0,77	
	Portée C	6	5,89	3,76	1,94	
	Portée D	6	5,05	1,07	1,03	
	Portée E	6	1,81	4,07	2,02	

Par contre, aucun effet « case » statistiquement significatif n'a été mis en évidence pendant le post-sevrage et l'engraissement sur l'excrétion fécale des animaux, ce pour les deux élevages.

3.3.4. SANTE DU PORCELET ET EXCRETION FECALE DE *CAMPYLOBACTER*

Bien que certains porcelets prélevés aient présenté ponctuellement une diarrhée, nous n'avons pas observé d'association entre le niveau d'excrétion et les signes cliniques.

Pour l'élevage I, on observe une diminution statistiquement significative de la quantité de *Campylobacter* excrétée par les porcelets entre la 4^e et la 5^e semaine. Cette observation est peut être liée à l'effet du traitement à base de tylosine administré aux porcelets à l'entrée en post-sevrage (antibiotique actif sur *Campylobacter*).

3.4. CONTAMINATION DE L'ENVIRONNEMENT, DES ALIMENTS ET DE L'EAU

3.4.1. EAU ET ALIMENTS

Pour les deux élevages, les prélèvements d'eau (réalisés au niveau des robinets qui alimentent la maternité, le post-sevrage et/ou l'engraissement et la verraterie et/ou salle de gestation en fonction des élevages) se sont révélés négatifs à l'analyse moléculaire (et à l'analyse bactériologique pour le premier élevage). L'eau provient pour les deux élevages d'un forage et subit différents traitements avant sa distribution aux animaux : chloration, diminution des teneurs en fer et en manganèse.

De même, pour les deux élevages, les aliments pris dans les silos avant leur distribution aux animaux se sont également révélés négatifs à l'analyse moléculaire et bactériologique. Quelques aliments prélevés dans l'auge des animaux ont conduit à une analyse positive et un parallèle a généralement pu être établi avec la présence de matières fécales dans l'auge (Tableau 8).

Tableau 8 : Exemple de prélèvements retrouvés positifs dans l'auge pour l'élevage I

Visite	Aliment contaminé	Quantité de <i>Campylobacter</i> (par g d'aliment)	Hypothèse de contamination de l'aliment
7 ^e	Aliment porcelet de la case E en maternité	5,5 ufc	Présence de fèces dans l'auge
8 ^e	Aliments des truies A, B, D et E en verraterie	≤ 2 ufc	Passage du verrat devant les auges et projection de fèces
9 ^e	Aliment de la truie A en verraterie	≤ 2 ufc	Passage du verrat devant les auges et projection de fèces
13 ^e	Aliment de la truie A en salle de gestation	≤ 2 ufc	Projection de fèces ?
13 ^e	Aliment des porcs en engraissement pour toutes les cases (les auges sont communes à 2 cases adjacentes)	entre 2 et 6,49 ufc	Défécation et déambulation des porcs dans l'auge (observée)

3.4.2. PRELEVEMENTS ENVIRONNEMENTAUX

Tous les prélèvements environnementaux effectués durant le vide sanitaire se sont révélés négatifs bien que divers contaminants (champignons, autres bactéries) se soient développés sur les boîtes de Karmali et que les salles nettoyées montraient souvent encore quelques traces de matières fécales.

Les prélèvements effectués en présence des animaux se sont révélés irrégulièrement positifs en salle de gestation et en verraterie pour les truies de l'élevage I (Tableau 9) ainsi qu'en maternité pour les deux élevages (Tableau 10). Les prélèvements effectués de l'entrée en post-sevrage à la fin de l'engraissement étaient presque toujours positifs pour l'un des deux prélèvements (parois ou sol de la case) (Tableaux 11 et 12). Il s'agit de périodes où le chargement des cases (poids vif des animaux/m²) augmente régulièrement et où les animaux produisent de plus en plus de déjections. Certains prélèvements, bien que réalisés sur des sols ou des murets très sales, ont donné des résultats négatifs. Néanmoins, il faut rappeler que lors de la réalisation de ces prélèvements environnementaux, les amas de fèces fraîches ont été évités afin de ne pas fausser les résultats.

Tableau 9 : Contamination de l'environnement des truies pour l'élevage I en log UFC/ m²

cases		visites																
		1	2	3	4	5	6	7 VS verraterie	8	9	10 VS gestation	11	12	13				
salle de gestation	sol derrière les truies	5,76													0	5,79	3,78	5,67
	couloir central	6,02													0	4,95	0	1,95
	avant de la logette	A													0	0	0	<2,6
		B													0	0	0	0
		C													0	truie réformée		
		D													3,3	0	0	0
E	0	0	0		0													
verraterie (truies)	sol derrière les truies						0	0	4,56									
	couloir central						0	0	2,43									
	avant de la logette						A	0	<2,6					<2,6				
							B	0	2,6					0				
							C	0	0					truie réformée				
							D	0	<2,6					0				
E	0	<2,6	0															

Les valeurs données pour l'auge et l'avant de la case ne sont pas exprimés par mètre carré (surface difficile à définir) mais par prélèvement.

Tableau 10 : Contamination de l'environnement des porcelets et des truies en maternité en log UFC de *Campylobacter* / m²

Elevage I

cases			Visites						
			1	2 VS sauf A	3	4	5	6	7
Maternité (truies et porcelets)	case A	parois		0	0	0	0	3,3	<2,4
		sol		4,9	0	0	0	0	0
	case B	parois		0	2,6	4,4	4,2	0	0
		sol		0	3,5	0	4,9	0	0
	case C	parois		0	3,5	0	0	0	0
		sol		0	3,7	0	4,9	0	0
	case D	parois		0	0	0	4,2	2,6	0
		sol		0	0	6,2	4,9	0	0
	case E	parois		0	<2,4	0	0	<2,4	0
		sol		0	0	0	0	0	0

Elevage II

cases			Visites					
			1 VS	2	3	4	5	6
Maternité (truies et porcelets)	case A	parois	0,0	3,0	2,9	0,0	4,5	0,0
		sol	0,0	3,9	0,0	2,7	4,2	4,3
	case B	parois	0,0	3,2	4,5	3,3	4,3	4,6
		sol	0,0	3,9	4,0	3,1	5,0	5,2
	case C	parois	0,0	3,0	4,0	0,0	0,0	3,7
		sol	0,0	3,2	3,1	3,0	3,8	4,0
	case D	parois	0,0	3,3	2,6	0,0	3,9	3,9
		sol	0,0	3,4	2,7	3,4	3,8	4,5
	case E	parois	0,0	3,8	2,6	0,0	3,2	4,1
		sol	0,0	3,8	4,2	5,1	4,4	4,7

Tableau 11 : Contamination de l'environnement des porcelets en post-sevrage en log UFC de *Campylobacter* /m²

Elevage I

cases			Visites		
			6 VS	7	8
Post-sevrage (porcelets)	case 1	parois	0,0	3,9	<2
		sol	0,0	3,0	2,7
	case 2	parois	0,0	0,0	1,5
		sol	0,0	3,6	3,1
	case 3	parois	0,0	3,6	1,9
		sol	0,0	0,0	3,0
	case 4	parois	0,0	3,2	0,0
		sol	0,0	3,9	3,1
	case 5	parois	0,0	3,4	1,2
		sol	0,0	4,1	0,0

Elevage II

cases			Visites		
			7	8	9
Post-sevrage (porcelets)	case 1	parois	0,0	1,8	<1,8
		sol	0,0	0,0	1,7
	case 2	parois	0,0	5,5	1,5
		sol	0,0	1,7	3,2
	case 3	parois	0,0	3,6	<1,8
		sol	0,0	2,7	1,7
	case 4	parois	0,0	4,0	0,0
		sol	0,0	3,9	3,1
	case 5	parois	0,0	4,0	1,5
		sol	0,0	3,9	4,6
	case 6	parois	0,0	0,0	1,8
		sol	0,0	5,4	3,1

Tableau 12 : Contamination de l'environnement des porcelets en pré-engraissement et en engraissement en log UFC de *Campylobacter* /m²

Elevage I

cases			Visites			
			10	11	12	13
Pré-engraissement Engraissement (porcelets)	case 1	parois	0,0	3,5	2,5	3,0
		sol	0,0	4,2	4,4	5,2
	case 2	parois	0,0	2,4	2,5	3,7
		sol	0,0	2,5	4,1	4,9
	case 3	parois	0,0	4,6	4,5	<1,7
		sol	0,0	5,5	5,8	<1,7
	case 4	parois	0,0	2,5	0,0	3,5
		sol	0,0	5,9	<1,7	4,6
	case 5	parois	0,0	4,0	0,0	<1,7
		sol	0,0	2,5	<1,7	5,4
	case 6	parois	0,0	0,0	0,0	3,6
		sol	0,0	1,8	4,9	4,1
	case 7	parois	0,0	3,0	0,0	2,2
		sol	0,0	2,8	5,6	3,2
	case 8	parois	0,0	2,5	1,7	2,2
		sol	0,0	1,8	2,4	3,8
	case 9	parois	0,0	4,0	3,2	0,0
		sol	0,0	5,6	4,4	5,0
case 13/12	parois	0,0	4,0	1,7	2,2	
	sol	0,0	6,0	2,0	5,1	

Elevage II

Cases			Visites									
			9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Pré-engraissement Engraissement (porcelets)	case 2	parois	0,0	0,0	3,9	3,6	2,8	2,3	2,9	X	3,3	0,0
		sol	0,0	0,0	2,7	X	3,8	3,3	3,2	X	3,2	0,0
	case 3	parois	0,0	0,0	3,2	3,0	2,9	3,7	3,4	X	1,8	0,0
		sol	0,0	0,0	4,3	X	4,2	4,1	4,0	X	3,4	0,0
	case 4	parois	0,0	0,0	3,8	0,0	2,3	0,0	X	X	2,0	0,0
		sol	3,6	4,3	3,9	3,3	2,2	4,2	X	3,9	3,6	4,3
	case 5	parois	0,0	0,0	0,0	3,7	2,3	3,7	0,0	3,4	X	X
		sol	0,0	0,0	3,6	4,3	3,9	3,3	2,2	4,2	X	3,9
	case 8	parois	0,0	0,0	3,7	2,3	3,7	0,0	3,4	X	X	0,0
		sol	0,0	4,5	0,0	2,4	4,3	4,4	X	3,2	0,0	4,5
	case 9	parois	0,0	3,7	2,7	0,0	2,7	0,0	4,5	X	3,8	3,7
		sol	0,0	X	3,4	X	0,0	3,5	4,7	5,0	3,4	X
	case 10	parois	0,0	X	X	2,5	X	2,6	4,1	X	2,0	X
		sol	0,0	X	4,8	X	2,4	4,0	5,3	4,5	4,5	X

Aucune corrélation significative n'a pu être mise en évidence entre les niveaux d'excrétion des porcs et de contamination de l'environnement, que ce soit pour les parois ou le sol des cases pour les deux élevages (Figures 15 et 16).

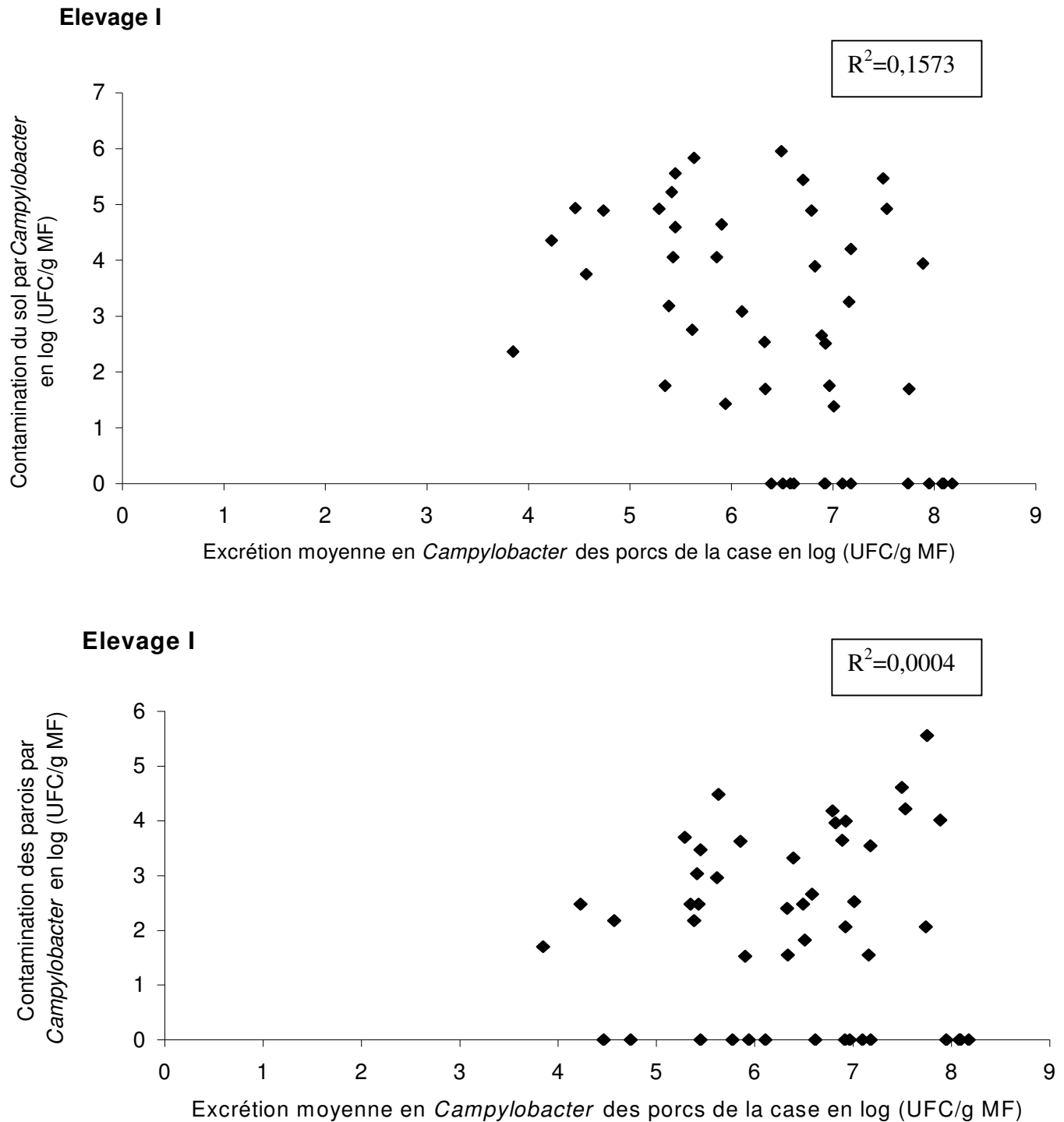


Figure 15 : Contamination des parois et des sols des cases en fonction de l'excrétion moyenne des porcs qui s'y trouvent pour l'élevage I

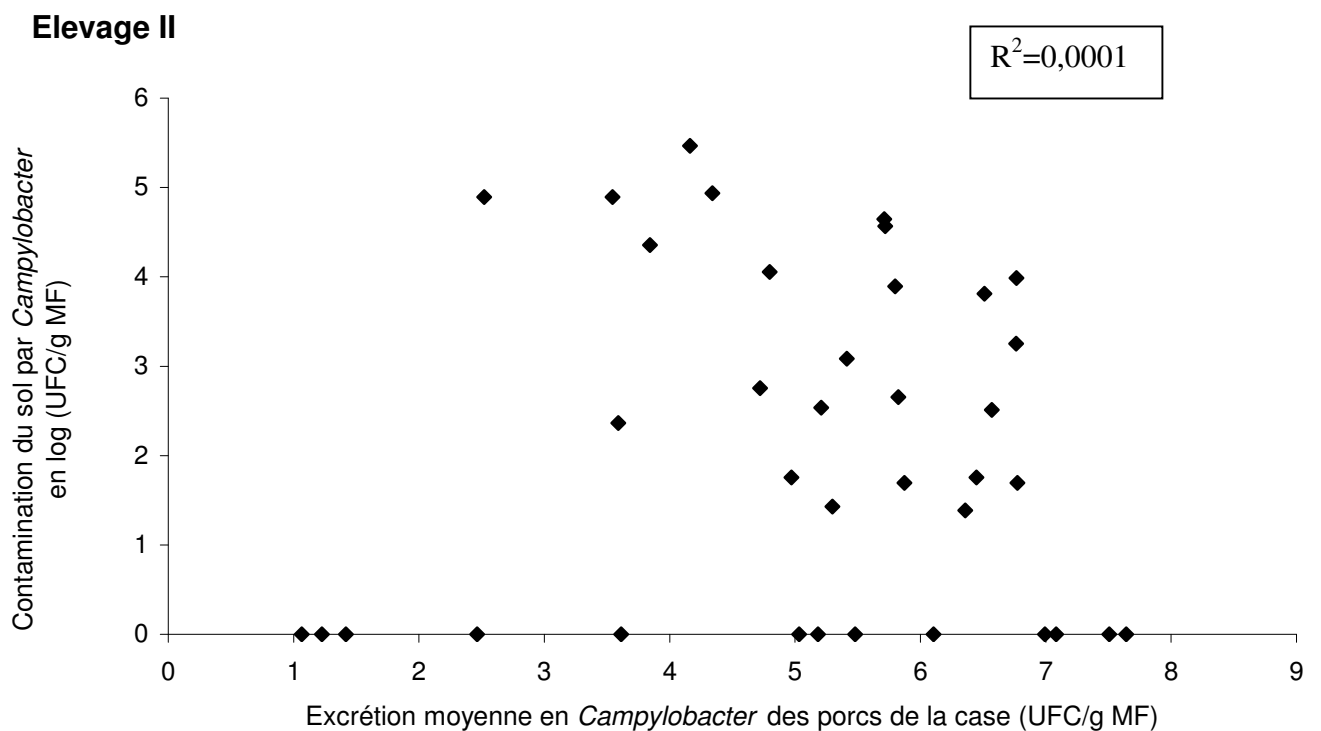
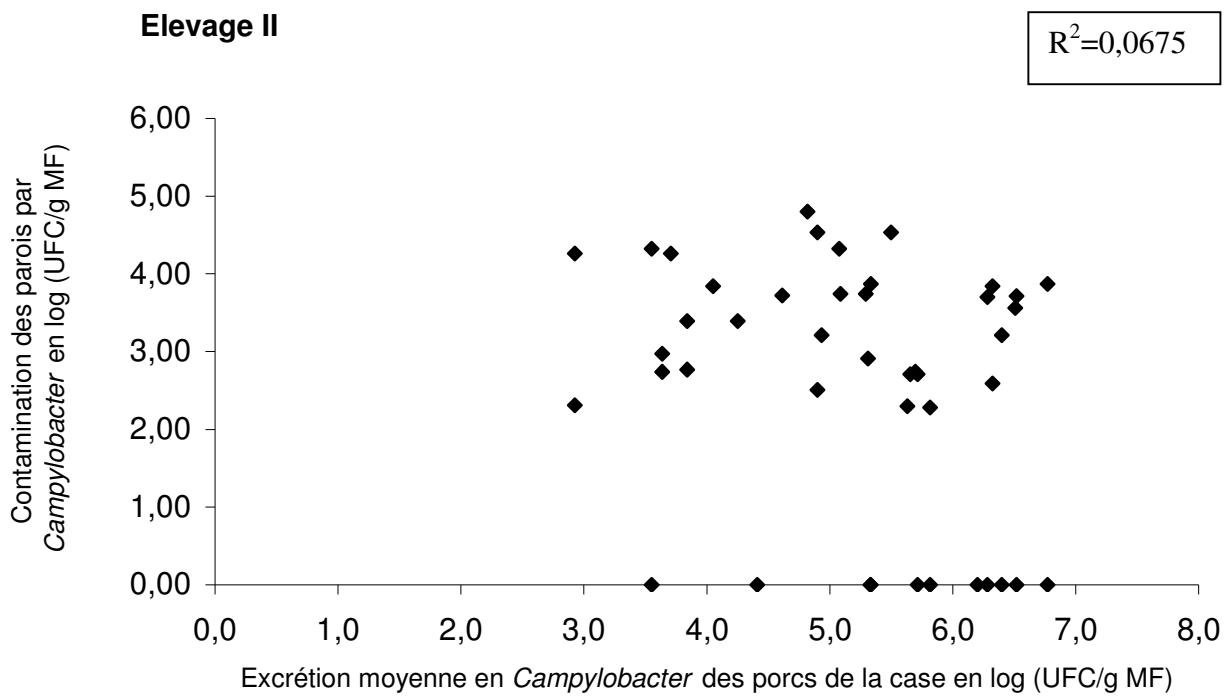


Figure 16 : Contamination des parois et des sols des cases en fonction de l'excrétion moyenne des porcs qui s'y trouvent pour l'élevage II

Concernant les autres types de prélèvements, deux souris mortes ont été trouvées dans la salle où logeaient les animaux en engraissement. L'analyse de leur contenu digestif et l'analyse des matières fécales n'a donné aucun résultat positif.

De même, dans l'élevage I, les deux chiens de l'exploitation, bien que n'ayant pas accès aux bâtiments théoriquement, ont été testés. L'analyse de leurs matières fécales n'a mis en évidence aucun *Campylobacter*.

3.5. IDENTIFICATION DES ESPECES DE *CAMPYLOBACTER* EXCRETEES

Pour les deux élevages, aucun *C. jejuni* n'a été mis en évidence. Les animaux semblent donc excréter principalement *C. coli*. Néanmoins, dans l'élevage I, sur les 10 colonies isolées pour chacun des échantillons à chaque visite, certains isolats semblent correspondre à une autre espèce de *Campylobacter*. L'identification de ces souches sera effectuée ultérieurement et permettra peut être de connaître les autres espèces susceptibles d'être excrétées par les animaux de notre étude.

4. DISCUSSION

Dans cette enquête, la prévalence élevée observée pour les truies tout au long du cycle de production est proche de celle retrouvée dans la littérature (Weijtens *et al.*, 1999 ; Young *et al.*, 2000 ; Magras *et al.*, 2004a). Dernièrement, en 2008, une étude de Wehebrink *et al.* sur 68 truies dans quatre élevages naisseurs conventionnels met en évidence une prévalence plus faible (33,8%). Ce résultat de prévalence pour les truies de notre étude est donc à pondérer compte tenu du faible nombre d'individus prélevés (10 truies au total).

En ce qui concerne les porcelets, environ 80% sont contaminés dès le premier prélèvement, soit 3 à 5 jours après leur naissance. Cette contamination précoce des porcelets concorde avec les résultats décrits dans la littérature (Weijtens *et al.* (1997) : 50% des porcelets contaminés au bout d'une semaine et 85% après 4 semaines ; Weijtens *et al.* (1999) : 7 sur 8 contaminés dans les 10 premiers jours de vie ; Young *et al.* (2000) : contamination dès les premières heures de vie ; Magras *et al.* (2004a) : 39% des porcelets contaminés à 4 jours d'âge et 76% à 25 jours ; Alter *et al.* (2005) : 32,8% des porcelets contaminés à 1 semaine). Par ailleurs, l'augmentation progressive de la prévalence de l'infection chez les porcelets jusqu'à atteindre 100% en post-sevrage est conforme à ce qui est retrouvé dans l'étude de Weijtens *et al.* (1997) ou de Magras *et al.* (2004a). Toutefois, le prélèvement réalisé à la 3^e semaine de vie des porcelets montre une diminution ponctuelle de la prévalence (environ 60% des animaux), ceci pour les deux élevages. Cette observation est originale puisqu'il n'y avait jamais eu de suivi longitudinal des mêmes animaux pendant toute la phase de sevrage. Les facteurs influençant la sensibilité à l'infection par *Campylobacter* n'étant pas connus, il est difficile de formuler des hypothèses concernant l'origine de cette diminution. De plus, il ne semble pas y avoir eu de biais lié à la manipulation lors des analyses puisque les prélèvements des truies, traités en même temps et indifféremment de ceux des porcelets, donnent des résultats semblables à ceux obtenus lors de l'analyse des prélèvements de la visite précédente. Cette diminution est peut être liée à une modification de la flore microbienne intestinale qui aurait lieu à cette date. Les plans d'alimentation sont différents dans les deux élevages et aucune transition alimentaire n'a eu lieu autour des trois semaines de vie des animaux. Dans les deux élevages, les porcelets recevaient un aliment démarrage ou starter en plus du lait maternel dès la première semaine de vie. Toutefois, il est difficile de savoir si les animaux mangent vraiment ce type d'aliment à disposition.

Concernant l'hypothèse d'une modification de la flore intestinale avec la mise en place d'une flore de barrière, il est difficile de se prononcer puisqu'à notre connaissance peu de travaux se sont intéressés à la composition de la flore intestinale chez le porcelet non sevré (Ducluzeau *et al.*, 1983). La diminution de la prévalence à trois semaines ne peut pas être mise en relation avec un événement particulier telle qu'une transition alimentaire ou un traitement antibiotique. Cette observation est à confirmer dans d'autres élevages : comprendre le déterminisme d'une telle diminution si elle s'avère fréquente pourrait en effet contribuer à identifier des méthodes de lutte.

Pour les truies comme pour les porcelets, on observe une excrétion quantitativement irrégulière. Après la 5^e semaine de vie, tous les porcelets sont excréteurs et le restent jusqu'à la fin de l'étude à une exception près pour l'élevage I. Dans l'élevage II, des porcelets se négativent encore pendant le post-sevrage et le pré-engraissement. Néanmoins, une caractéristique commune aux deux élevages est la forte variation des quantités excrétées par un animal d'une visite à l'autre (de 0 à 10⁹ UFC/g MF). Certains animaux peuvent même présenter ponctuellement une absence d'excrétion au cours de l'élevage ou du moins une excrétion non détectable avec les méthodes utilisées, résultats comparables à ceux de Weijtens *et al.* (1999). Dans l'élevage II, une truie de 4^{ème} rang de portée s'est également « négativée » à trois reprises au cours du suivi longitudinal. Par ailleurs, en moyenne, cette truie avait tendance à excréter des quantités inférieures de *Campylobacter*. Les hypothèses concernant les causes de cette irrégularité de l'excrétion sont diverses : élimination puis recontamination des animaux par *Campylobacter* (évoquée par Weijtens *et al.*, 1999), excrétion intermittente (envisagée par Von Altrock *et al.* (2006) et observée par Lee *et al.* (1986) chez la souris). De plus, un portage sans excrétion associée a été observé ponctuellement dans l'étude expérimentale réalisée avec des porcs EOPS et décrite dans le chapitre III : lors de l'abattage, un porc était porteur de *Campylobacter* (contenu caecal positif) alors que le prélèvement du contenu rectal était négatif ce qui soulignait une absence d'excrétion fécale.

Lors de cette étude, les prélèvements de matières fécales des différents animaux ont été analysés à l'aide de la PCR permettant une discrimination des deux principales souches de *Campylobacter* observées en élevage porcin, à savoir *C. coli* et *C. jejuni*. Aucun *C. jejuni* n'a été mis en évidence et *C. coli* semble prédominant dans ces deux élevages, ce qui est comparable aux données décrites dans la littérature (Weijtens *et al.*, 1993 ; Oporto *et al.*,

2007 ; Varela *et al.*, 2007 ; Whright *et al.*, 2008). Néanmoins, lors d'identification des différents isolats pour l'élevage I, quelques souches ont été détectées comme étant des *Campylobacter* mais l'espèce n'a pas pu être déterminée. Il sera intéressant d'identifier ces souches afin de connaître l'espèce isolée chez les animaux de l'élevage I.

Cette étude met également en évidence une diminution progressive, statistiquement significative, des quantités de *Campylobacter* excrétées par les porcelets après le post-sevrage. Cette cinétique d'excrétion se rapproche de celle décrite par Weijtens *et al.* (1993). Certains auteurs émettent l'hypothèse que cette diminution de l'excrétion trouve son explication dans la conduite particulière des animaux, dans le maintien de conditions d'hygiène strictes et qu'une exposition constante des animaux ne s'accompagnerait pas de cette diminution (Alter *et al.*, 2005 ; étude expérimentale décrite dans le chapitre III). Dans notre étude, la diminution de l'excrétion observée en engraissement ne s'accompagne pas de mesures d'hygiène particulières. Cette cinétique, qui a par ailleurs été observée chez le poulet (Achen *et al.*, 1998), pourrait résulter d'une auto-limitation de l'infection liée à une immunité acquise évoquée par Newell et Fearley (2003).

Aucune corrélation significative n'a été mise en évidence dans notre étude entre la contamination de l'environnement et le niveau de contamination des animaux. L'environnement apparaît comme une source possible de contamination indirecte des porcs par *Campylobacter*, d'autant plus que le caractère fouisseur de ces animaux les conduit à avoir des contacts oraux fréquents avec le milieu dans lequel ils vivent. La résistance des *Campylobacter* dans l'environnement des animaux dans un élevage porcin semble néanmoins très limitée comme en témoigne le nombre important de prélèvements environnementaux négatifs réalisés en présence des animaux et dans un milieu apparaissant pourtant souillé. De la même manière, aucun prélèvement environnemental réalisé durant le vide sanitaire ne s'est révélé positif, ce qui suggère que les mesures d'hygiène entre deux bandes (nettoyage, désinfection puis vide sanitaire) suffisent pour éliminer *Campylobacter*. Au final, le rôle épidémiologique de l'environnement dans l'infection des porcs serait vraisemblablement réduit si celui-ci n'était pas en permanence recontaminé par les déjections des porcs. Weijtens *et al.* (2000) ont démontré que l'infection par *Campylobacter* en élevage porcin pouvait être réduite voire éliminée par la mise en place de mesures hygiéniques très strictes associée à un repeuplement par des porcs non porteurs. Parmi les aliments prélevés directement dans l'auge des animaux en leur présence, quelques-uns se sont révélés positifs mais leur contamination

par des fèces a pu être observée ou fortement suspectée. Pour l'élevage II, lors des visites, les auges des porcs à l'engrais étaient systématiquement vides et les animaux présentaient un comportement éliminatoire particulier avec miction et défécation dans les auges et un comportement fouisseur important dû probablement à cette restriction alimentaire. Par ailleurs, les aliments prélevés dans les auges étaient plus souvent contaminés et présentaient des quantités supérieures en UFC de *Campylobacter* par gramme. En parallèle, pour l'élevage II, une augmentation des quantités de *Campylobacter* excrétées est observée en engraissement alors que l'on note plutôt une diminution progressive des quantités de *Campylobacter* excrétées par les porcelets après le post-sevrage se poursuivant pendant l'engraissement pour l'élevage I. Cette constatation est en corrélation avec le rôle de l'environnement, et en l'occurrence ici des aliments, dans le maintien d'une exposition constante des animaux à *Campylobacter*. Les aliments pourraient dans ce cas jouer un rôle de transmission indirecte des *Campylobacter* entre les animaux. Néanmoins, le fait que les prélèvements réalisés dans les silos ou les sacs avant distribution aux animaux soient négatifs suggère que les aliments ou l'eau ne constituent pas des sources majeures d'introduction de *Campylobacter* dans les élevages porcins.

Weijtens *et al.* (1997), Alter *et al.* (2005), Soutos et Madden (2007) font de la mère la première source de contamination des porcelets, une similitude entre les souches isolées de la mère d'une part et de ses porcelets d'autre part ayant été observée. Harvey *et al.* (2000) ont également montré que le sevrage précoce des porcelets diminue le niveau de contamination des porcelets (les porcelets sont séparés de leur mère à 1 jour de vie dans leur expérience), la truie apparaît ainsi comme une source de contamination majeure. Dans notre étude, elle semble également jouer ce rôle puisque à leur entrée en maternité les prélèvements environnementaux, les aliments et l'eau sont tous négatifs en *Campylobacter*. Les truies apparaissent donc comme la source majeure de contamination pour leurs porcelets en maternité, d'autant plus que le niveau d'excrétion de celles-ci est élevé comparé à la dose infectante (quelques centaines de bactéries). Toutefois, des études de typage génétique montrent que la transmission de la mère au porcelet par l'intermédiaire de matières fécales contaminées n'est pas le seul type de transmission existant. Ainsi Hume *et al.* (2002) ne retrouvent pas de similitude entre les souches isolées sur les mères et sur leurs produits. Soutos et Madden (2007) observent qu'après 66 jours, seulement 33% des souches isolées

sur les porcelets sont communes avec leurs mères. Ces auteurs concluent à l'existence d'autres sources de contamination dans l'environnement des porcelets. L'importante variabilité génétique des *Campylobacter* complique cependant l'interprétation de ces résultats, il est très difficile de faire la part des choses entre souches issues des souches déjà existantes chez les mères et souches provenant d'autres sources de contamination. Les porcs peuvent de plus se contaminer ou se re-contaminer au contact des matières fécales de leurs congénères eux-mêmes contaminés. Ces contaminations entre porcs de la même case pourraient avoir un impact sur le niveau d'excrétion moyen des animaux d'une case à un moment donné. Un « effet portée » a été souligné pendant le sevrage pour les deux élevages alors qu'aucun « effet case » n'a été observé pendant le post-sevrage et en engraissement. Néanmoins, les cases ne sont pas suffisamment isolées les unes des autres pour que les seules sources de contamination dans chaque case soient les animaux qui l'occupent : Leblanc Maridor *et al.* (2008) ont montré qu'une transmission à distance, vraisemblablement par projection de matières fécales était possible entre porcs ; le contact nez à nez et les déplacements de l'éleveur entre les cases pourraient également constituer des voies de transmission. D'autres modalités de contamination par l'environnement telles que transmission à partir d'animaux sauvages (rongeurs, oiseaux, insectes) ou par l'intermédiaire de l'éleveur (en lien avec d'autres productions dans l'élevage) sont donc potentiellement existantes, comme c'est le cas en élevage de volailles. Peu d'études ont pour l'instant été réalisées sur ce sujet, mais Meerburg *et al.* (2006) et Jensen *et al.* (2006) ont montré qu'une contamination des porcs par *Campylobacter* à partir de la faune sauvage autour de l'élevage était possible bien que vraisemblablement peu fréquente.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre étude a confirmé la forte prévalence de l'infection par *Campylobacter* des truies et des porcelets tout au long d'un cycle de production. La contamination des porcelets est précoce et s'effectue au moins en partie au contact de la mère, l'environnement ne présentant plus de *Campylobacter* après le nettoyage, la désinfection et le vide sanitaire. Bien qu'aucune relation quantitative n'ait été démontrée entre la contamination de l'environnement et des animaux, l'environnement est apparu très fréquemment contaminé, vraisemblablement en grande partie à partir des matières fécales des porcs. Il s'avère donc un élément possible de transmission des *Campylobacter* entre animaux.

L'analyse par typage génétique permettra de répondre à certaines questions concernant les modalités de contamination des animaux et la circulation de *Campylobacter* au sein d'un élevage porcin. Le typage génétique des souches de *Campylobacter* isolées pour chaque prélèvement positif (matières fécales, aliment et environnement) aidera peut-être à déterminer d'autres sources de contamination autres que les truies qui pourraient jouer un rôle dans la contamination des porcelets et de leur environnement au cours de l'élevage. D'autres enquêtes en élevage sont également nécessaires pour confirmer ou infirmer certaines observations (telle que la diminution éventuelle de l'excrétion fécale de *Campylobacter* par les porcelets à 3 semaines).

ANNEXE 1

Planification des visites et des différents prélèvements pour l'élevage I

CALENDRIER PREVISIONNEL DES VISITES																	
date des visites (numéro de la visite)	04-mai-07 (1)	7-mai-07 (2)	14-mai-07 (3)	17-mai-07 (4)	21-mai-07 (5)	28-mai-07 (6)	4-juin-07 (7)	11-juin-07 (8)	18-juin-07 (9)	9-juil-07 (10)	23-juil-07 (11)	30-juil-07 (12)	20-août-07 (13)	10-sept-07 (14)	1-oct-07 (15)	22-oct-07 (16)	
date par rapport à j (jour de la mise bas)		j-3-1s	j-3	mise bas = j0	j+4	j+4+1s	j+4+2s	j+4+3s	j+4+4s	j+4+7s	j+4+8s	j+4+10s	j+4+13s	j+4+16s	j+4+19s	j+4+22s	
TRUIES	emplacement des truies	salle gestante			maternité					verrerie			salle gestante				
	prélèvements de matières fécales	X		X	Ⓜ	X	X	X	X	X	X		X		X		
	typage PFGE	X	X	X		X	X	X	X		X			X			
PORCELETS	emplacements des porcelets				maternité					post-sevrage			Pré-engraissement		engraissement		
	prélèvements de matières fécales	Ⓜ			Ⓜ	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
	typage PFGE					X	X	X	X	X	X		X		X		X
ENVIRONNEMENT en l'absence des animaux	prélèvements "salle" truies		maternité		Ⓜ				verrerie		salle gestante						
	prélèvements "salle" porcelets	Ⓜ				Ⓜ				post-sevrage		Pré-engraissement	Engraissement				
	prélèvements aliment : silo			aliments truie et porcelet									aliment engraissement				
	prélèvement eau (analyse spécifique)			X+ analyse extérieure								X (engraissement)					
	prélèvements autres animaux (MF ou cadavres)	si présence															
ENVIRONNEMENT en présence des animaux	prélèvements "case" truies	X		X	Ⓜ	X	X	X	X	X	X		X		X		
	prélèvements "case" porcelets	X								X	X	X		X	X	X	
	prélèvements aliment : auge	X					X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
	prélèvements autres animaux (MF, cadavres)	si présence															

départ pour l'abattoir des charcutiers

ANNEXE 2

Planification des visites et des différents prélèvements pour l'élevage II

DATE	Code	Semaines de vie	Nom du Prélèvement	Nb d'échantillons	
16 janvier 2008	B1	-2	Avant Mise - Bas + VS Maternité	18	Avant Mise-Bas B1-B2
22 janvier 2008	B2	-1	Avant Mise - Bas	18	
30 janvier 2008	B3	1	Maternité	45	Maternité B3-B4-B5-B6
6 février 2008	B4	2	Maternité	45	
12 février 2008	B5	3	Maternité	45	
19 février 2008	B6	4	Maternité + VS PS	54	
26 février 2008	B7	5	PS	55	PS B7-B8
18 mars 2008	B8	8	PS	55	
8 avril 2008	B9	11	Pré-engraissement	55	Pré-engraissement B9-B10-B11
22 avril 2008	B10	13	Pré-engraissement + VS Engraissement	55 + 13	
29 avril 2008	B11	14	Pré-engraissement	55	
20 mai 2008	B12	17	Engraissement	50	Pré-engraissement B12-B13-B14-B15-B16-B17- B18
26 mai 2008	B13	18	Engraissement	50	
3 juin 2008	B14	19	Engraissement	50	
10 juin 2008	B15	20	Engraissement	50	
17 juin 2008	B16	21	Engraissement	50	
24 juin 2008	B17	22	Engraissement	50	
1 juillet 2008	B18	23	Engraissement	50	

ANNEXE 3

Composition des principaux milieux de récupération, d'enrichissement ou de sélection utilisés pour la détection des *Campylobacter spp.*

COMPOSITION DE L'EAU PEPTONNÉE STÉRILE TAMPONNÉE (ISO 6579) (pH=7)

Peptone de caséine :	10	g/L
Chlorure de sodium :	5	g/L
Potassium déhydrogénophosphate :	1.5	g/L
Disodium hydrogénophosphate dodécahydraté :	9	g/L

COMPOSITION DU MILIEU DE STOCKAGE : BOUILLON CŒUR-CERVELLE (BHB = BRAIN HEART BROTH)

Substrat nutritif (extrait de cerveau et de cœur, peptone)	275	g/L
D(+)-glucose	2	g/L
Chlorure de sodium	5	g/L
Di-Sodium hydrogénophosphate	2.5	g/L

Préparation par dissolution de 37g de poudre dans 1L d'eau déminéralisée

COMPOSITION DU MILIEU D'ENRICHISSEMENT : BOUILLON PRESTON

MILIEU DE BASE	SOLUTION D'ANTIBIOTIQUES	MILIEU COMPLET
Peptone 10 g	Polymyxine B 2500 UI	Solution d'antibiotiques 2 mL
Charbon 10 g	Rifampicine 5 mg	
Chlorure de sodium 5 g	Triméthoprime... 5 mg	Milieu de base 473 mL
Agar-agar 1 g	Cycloheximide 50mg	
Eau 1000 mL	Acétone ... 1 mL	Sang de cheval lysé stérile 25mL
	Eau ... 1 mL	

COMPOSITION DU MILIEU DE SÉLECTION : GELOSE KARMALI

MILIEU DE BASE	SOLUTION D'ANTIBIOTIQUES	MILIEU COMPLET
Peptone 23 g	Pyruvate de sodium 2 g	Solution d'antibiotiques 10 mL
Charbon 4 g	Vancomycine 0.4 g	
Hématine 0.032 g	Céfopérazone..... 0.64 g	Milieu de base 990 mL
Chlorure de sodium 5 g	Cycloheximide 2 g	
Agar-agar 10 g	Ethanol à 95% ... 50 mL	
Eau 1000 mL		

Toutes les préparations sont autoclavées à 121 °C pendant 15 minutes.

ANNEXE 4

Protocole d'extraction d'ADN à partir des différents prélèvements

Préparation de l'échantillon

Homogénéisation du prélèvement

Dilution par 2 des 5g de prélèvement dans un tube Falcon 50 mL (Ajout de 5 mL d'eau stérile)
Ajout de 10µL de *Yersinia ruckeri* (solution à 10⁷ CFU/mL)
Vortexer 30 secondes, conservation sur glace

Ebullition

10 minutes à 100°C
Placer les tubes sur la glace après ébullition

Centrifugation

5 minutes à 8000 tours par minute
Récupération de 1 à 2 mL de surnageant dans un tube Eppendorf

Protocole kit Nucleospin Tissue Macherey Nagel

Dans un tube Eppendorf contenant 25 µL de protéinase K
ajouter 250 µL du surnageant puis 180 µL de tampon T1
Vortexer puis incubé 1 heure à 56°C

Lyse dans le tampon B3

Vortexer l'échantillon
Ajouter 200 µL de tampon B3 et vortexer
Incuber 10 minutes à 70°C
Vortexer et centrifuger rapidement pour récupérer les gouttelettes accumulées dans le capuchon

Ajouter 210 µL d'éthanol à 96-100%
Vortexer 15 secondes
Centrifuger rapidement pour récupérer les gouttelettes accumulées dans le capuchon

Adsorption de l'ADN sur la membrane de silice

Déposer la totalité du lysat dans la colonne d'extraction
Centrifuger 2 min à 11000 x g
(éventuellement une deuxième fois si tout l'effluent n'est pas passé à travers la colonne)
Transférer la colonne sur laquelle est maintenant fixé l'ADN dans un nouveau tube collecteur

Purification de l'ADN

Ajouter 500 µL de tampon BW
Centrifuger 1 minute à 11000 x g
Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur

Ajouter 600 µL de tampon B5
Centrifuger 1 minute à 11000 x g
Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur

Centrifuger 1 minute à 11000 x g
Transférer la colonne dans un tube Eppendorf

Elution de l'ADN

Déposer 100 µL de tampon BE préchauffé à 70°C directement au centre de la colonne
Incuber 1 minute à température ambiante
Centrifuger 1 minute à 11000 x g
Récupération de l'éluat contenant l'ADN des bactéries initialement présentes dans le prélèvement
Réalisation de 2 aliquots de 50 µL avec l'éluat
Conserver un aliquot à 4°C pour une utilisation directe et l'autre à -20°C pour une utilisation future

ANNEXE 5

Excrétion fécale de *Campylobacter* en log (UFC/g MF) par les porcelets pour l'élevage I

Porcelets	Age en semaines des porcelets								
	1	2	3	4	5	8	11	14	17
A1	pas de données (x)	7,3	P	0	6,8	6,0	6,0	5,6	3,8
A2		P	0	P	P	7,4	4,5	4,0	4,9
A3		7,5	0	P	6,9	P	7,0	4,7	6,3
A4		4,9	0	8,3	7,7	X	3,9	3,7	4,0
A5		P	P	7,2	6,3	5,4	7,2	4,6	5,7
A6		P	0	P	7,2	6,8	5,8	3,7	3,4
B1	9,3	P	P	7,0	5,8	7,6	6,8	P	6,7
B2	P	P	P	8,3	4,7	5,2	6,9	5,5	5,8
B3	0	P	P	7,5	P	7,2	5,2	4,3	4,6
B4	P	P	P	P	P	6,3	porcelet mort		
B5	P	P	0	8,5	4,9	7,5	2,8	3,2	0
B6	P	0	0	8,5	5,3	5,6	5,8	3,0	4,2
C1	P	P	0	P	8,4	porcelet mort			
C2	P	0	0	7,5	7,5	6,3	4,2	5,7	4,5
C3	8,3		0	6,7		6,5	7,3	4,2	4,3
C4	P	P	0	8,6	P	7,1	7,2	5,0	5,5
C5	P	P	0	P	7,2	6,5	5,8	6,0	5,7
C6	P	P	0	P	8,4	7,5	6,3	6,6	<2
D1	P	3,5	0	8,6	pas de données		7,2	5,2	7,3
D2	0	P	0	6,8	4,4	6,6	5,0	5,3	4,6
D3	P	8,0	P	7,6	3,9	7,0	5,8	5,9	5,9
D4	X	7,8	0	8,2	7,6	6,2	5,3	5,6	5,9
D5	0	P	0	7,2	6,3	6,1	1	5,4	5,8
D6	0	3,9	0	6,4	5,4	5,3	4,9	X	6,6
E1	P	P	P	8,7	P	6,9	7,4	4,2	5,4
E2	X	5,6	0	4,8	7,1	5,1	4,8	3,9	4,8
E3	5	7,7	X	X	4,1	4,3	4,8	3,8	X
E4	P	2,3	P	7,4	5,9	6,0	7,1	4,3	5,5
E5	P	P	P	P	5,2	6,0	5,82	3,7	3,5
E6	0	4,5	X	7,9	3,6	3,8	6,8	5,0	4,0

ANNEXE 6

Excrétion fécale de *Campylobacter* en log (UFC/g MF) par les porcelets pour l'élevage II

Porcelets	Age en semaines des porcelets															
	1	2	3	4	5	8	11	13	14	17	18	19	20	21	22	23
A1	3,6	4,9	7,4	8,1	3,3	4,8	5,5	6,7	6,9	6,9	5,9	x	7,3	7,5	7,8	7,8
A2	3,5	6,0	4,6	7,1	7,5	5,1	4,9	4,5	6,8	7,0	6,3	x	6,5	7,0	7,1	6,7
A3	5,6	7,1	4,1	5,7	6,6	4,4	0,0	7,1	5,8	6,4	6,7	7,2	6,4	6,8	6,9	7,0
A4	3,5	6,5	7,8	6,4	8,4	3,7	4,7	5,8	7,3	x	5,5	6,9	6,8	6,4	6,8	7,2
A5	x	4,7	3,9	4,8	5,7	4,1	3,5	7,5	6,3	x	5,8	7,2	7,0	5,8	6,6	6,8
A6	3,3	4,7	0,0	6,4	4,9	6,1	5,9	5,4	6,0	x	5,3	6,6	7,0	6,5	7,4	7,5
B1	6,2	7,2	3,5	7,3	5,1	7,3	3,4	4,6	6,2	x	x	7,0	6,6	7,1	7,2	7,1
B2	5,4	6,9	0,0	7,3	0,0	3,8	3,1	4,3	6,6	5,0	5,6	6,4	5,8	6,1	6,2	6,1
B3	4,6	6,5	0,0	7,3	0,0	4,3	4,4	6,6	5,8	5,4	6,2	6,0	6,2	7,2	6,2	6,7
B4	x	3,5	4,3	6,4	6,1	5,4	5,5	6,8	6,4	4,9	x	6,4	5,9	7,0	6,9	5,6
B5	3,6	6,2	7,3	8,6	0,0	3,2	4,7	6,1	5,9	5,0	6,1	6,1	x	6,2	6,1	6,2
B6	6,9	5,3	7,9	8,2	5,9	4,8	4,5	5,4	4,9	4,8	5,9	5,8	6,1	6,1	6,7	6,2
C1	4,3	2,6	0,0	6,8	5,4	6,1	4,5	6,9	5,8	6,6	6,6	6,9	6,2	7,5	6,6	6,4
C2	x	0,0	4,3	4,9	6,5	4,8	0,0	4,2	5,4	5,7	6,2	6,5	6,0	6,4	7,7	7,2
C3	0,0	3,0	5,7	8,1	4,8	5,8	5,5	5,0	6,4	5,9	6,4	6,4	5,8	7,1	6,9	6,9
C4	4,3	0,0	0,0	5,3	6,2	7,0	6,0	7,1	6,8	7,1	x	7,2	6,7	7,2	6,0	6,6
C5	x	2,6	0,0	7,5	4,3	4,4	4,9	4,8	5,6	6,0	5,7	6,2	5,4	6,5	5,9	4,5
C6	4,6	2,5	3,2	2,9	x	3,7	4,8	6,8	6,6	6,6	3,5	6,9	6,2	7,1	6,6	6,9
D1	0,0	0,0	0,0	6,1	5,0	0,0	5,7	5,5	5,9	5,7	x	6,8	5,8	5,5	5,7	5,5
D2	3,0	2,8	0,0	4,1	4,8	2,8	5,1	3,5	5,6	4,8	5,3	6,6	6,8	6,5	5,1	4,5
D3	x	2,9	2,8	6,3	7,3	2,9	5,9	3,4	5,6	5,6	6,6	6,1	6,1	7,1	5,9	6,0
D4	x	0,0	3,8	5,5	x	0,0	6,8	3,6	7,3	6,6	x	7,8	6,2	7,4	6,8	5,5
D5	x	3,1	3,4	4,3	2,7	3,1	5,5	0,0	4,8	6,3	5,9	6,7	7,0	6,3	5,5	6,4
D6	0,0	0,0	0,0	4,1	7,2	0,0	5,7	5,1	6,1	5,3	x	7,5	6,1	7,5	5,7	7,0
E1	3,7	3,2	0,0	0,0	5,4	3,2	4,8	3,8	5,6	4,9	6,1	6,4	6,7	7,1	4,8	5,3
E2	4,3	3,7	0,0	0,0	x	3,7	5,8	4,2	x	5,7	5,8	6,5	5,6	6,9	6,6	6,3
E3	3,1	0,0	3,4	3,7	8,2	0,0	x	3,4	8,1	5,8	4,4	6,9	x	6,5	5,6	5,1
E4	x	3,3	4,1	4,2	0,0	3,3	x	5,5	6,4	5,2	5,0	5,0	5,6	7,2	5,8	6,4
E5	x	3,7	2,9	3,0	4,4	3,7	x	4,8	7,0	4,7	6,7	4,1	5,6	6,8	6,3	5,7
E6	2,9	3,9	3,4	0,0	6,5	3,9	x	4,6	6,1	4,9	6,1	x	6,8	7,1	6,7	6,9

CHAPITRE VI :

CONCLUSION

PERSPECTIVES

L'objectif principal de ces travaux de thèse était de produire des méthodes et des connaissances permettant d'étudier le portage et la dynamique d'infection de *Campylobacter* en élevage porcin. La maîtrise de la circulation chez le porc des agents pathogènes pour le porc et l'Homme constitue un enjeu primordial pour la filière porcine. Récemment, le cadre réglementaire européen a pris en compte ces dangers en imposant la surveillance de la contamination des denrées d'origine animale et des principaux agents responsables de zoonose d'origine alimentaire, notamment *Campylobacter* (Directive 2003/99/CE).

La détermination quantitative du niveau d'excrétion des différentes espèces de *Campylobacter* chez le porc et la description des éventuelles variations de cette excrétion au cours du cycle de production constituait un premier objectif. Le second objectif était de pouvoir décrire précisément les souches excrétées et/ou rencontrées dans l'environnement et d'évaluer leur variabilité afin de comprendre les modalités de transmission de *Campylobacter* au sein d'un élevage porcin. En parallèle, la quantification et l'identification des souches de *Campylobacter* dans l'environnement des animaux (eau, aliments, cases) avaient au préalable «étaient peu explorées ». Or l'analyse de la contamination de l'environnement d'élevage des animaux et la précision éventuelle de son implication dans la transmission de *Campylobacter* au sein d'un élevage porcin constituent un aspect essentiel en vue de l'éventuelle maîtrise de l'infection.

Dans un premier temps, un aspect méthodologie nous semblait essentiel à la fois pour disposer d'une méthode d'identification quantitative applicable rapidement et aisément sur le terrain en élevage porcin mais également pour valider et calibrer les méthodes de typage actuelles afin de pouvoir les appliquer à grande échelle lors d'enquêtes en élevage.

Une première étape a consisté à la mise au point et la validation de méthodes rapides d'identification quantitative de *Campylobacter spp.* et des espèces majeures, à savoir *C. coli* et *C. jejuni* retrouvées chez le porc et chez l'Homme. Les tests de PCR quantitative en temps réel développés lors de cette thèse permettent ainsi :

- de quantifier *Campylobacter spp.* directement à partir de matrices complexes telles que les matières fécales et les prélèvements environnementaux

- de quantifier et de discriminer *C. coli* et *C. jejuni* dans un essai duplex à partir de cultures pures ou lors de deux essais simplex à partir de substrats complexes.

Ces méthodes rapides permettent de quantifier l'excrétion de *Campylobacter* par les animaux (durée, intermittence éventuelle et espèces excrétées) et d'estimer la contamination de l'environnement. Afin de garantir la fiabilité des résultats, la présence d'un témoin interne d'extraction et d'amplification était essentielle à l'application de ces techniques à des prélèvements polycontaminés tels que les matières fécales susceptibles de contenir des inhibiteurs de la PCR. Ces méthodes serviront à l'étude du portage de *Campylobacter* chez le porc en élevage lors d'enquêtes futures du fait de leur simplicité d'application et de leur rapidité. Une utilisation à grande échelle semble donc possible, néanmoins, dans nos travaux, dans un contexte d'évaluation de la contamination des animaux et de la dynamique d'infection de *Campylobacter* au sein d'un élevage porcin, l'analyse bactériologique est nécessaire pour pouvoir isoler et caractériser les différentes souches de *Campylobacter*.

Un deuxième aspect de notre étude est en effet de décrire la variabilité génétique des souches excrétées. Etant donné la plasticité génomique de *Campylobacter*, il est important d'évaluer la valeur informative des méthodes de typage moléculaires pour décrire cette variabilité en élevage puisque les méthodes choisies conditionnent les résultats.

Une première approche *in vitro* par repiquages successifs de plusieurs souches de *Campylobacter* nous a permis de mettre en évidence la stabilité génomique de trois souches de *Campylobacter* d'origines différentes : *C. coli* d'origine porcine, *C. coli* et *C. jejuni* d'origine aviaire isolés en conditions de terrain. Il s'agissait ensuite d'analyser et de renseigner les différentes composantes de l'hétérogénéité des profils observés sur le terrain : tester les hypothèses (i) d'un effet animal, (ii) d'un effet espèce/souche, (iii) d'une évolution différente de l'infection selon que les animaux étaient infectés par une ou plusieurs souches de *Campylobacter*.

Lors d'enquêtes en élevage, de nombreux paramètres ne peuvent pas être contrôlés tels que l'eau et l'alimentation, les flux d'air, de personnes ou d'animaux (déplacements de l'éleveur, rongeurs, oiseaux, entrée éventuelle de contaminants extérieurs), la propreté des animaux, des auges, des parcs et des bâtiments en général. Tous ces facteurs peuvent

influencer la dynamique d'infection de *Campylobacter* chez le porc. Afin de générer des données plus fondamentales, il nous semblait important de réaliser une étude de la cinétique d'excrétion de *Campylobacter* chez le porc dans des conditions contrôlées avec des souches choisies inoculées à des animaux EOPS suivis au cours du temps. La deuxième étape de nos travaux a donc été la mise en place d'une infection expérimentale. Cette approche originale nous permettait ainsi de tester l'installation et les modalités d'excrétion de plusieurs souches de *Campylobacter* d'origines différentes (porcine ou aviaire), correspondant aux principales espèces retrouvées chez le porc et chez l'Homme, dans des conditions où tous les facteurs exogènes entrants sont contrôlés.

D'une part, l'infection expérimentale nous a permis de valider les méthodes de PCR en temps réel et de réaliser la calibration des méthodes de typage moléculaire choisies, en l'occurrence la macrorestriction génomique en champ pulsé et la PCR-RFLP sur le gène *flaA*, en vue de leur application en élevage porcin. Outre la mise en évidence du portage asymptomatique et des niveaux d'excrétion élevés de *Campylobacter* par le porc, cette étude a souligné l'existence d'un éventuel effet souche et/ou espèce. *C. coli* semble en effet prédominer en France et en Europe dans les élevages porcins, néanmoins différentes études soulignent la présence d'autres espèces de *Campylobacter*, notamment de *C. jejuni*. Lors de l'infection expérimentale, la capacité de colonisation et d'implantation des souches de *C. jejuni* et de *C. coli* d'origine aviaire semble plus difficile chez le porc et les quantités de *Campylobacter* excrétées dans les matières fécales des porcs sont inférieures avec ces mêmes souches. Boes *et al.* (2005) soulignent qu'un porc, infecté par *C. jejuni* lors d'un prélèvement, n'excrète pas forcément la bactérie au prélèvement suivant. Cette observation concorde avec l'arrêt progressif de l'excrétion des trois animaux inoculés avec *C. jejuni* et l'absence d'implantation de *C. jejuni* lorsqu'elle est inoculée simultanément avec *C. coli*. La description de l'évolution qualitative et quantitative de l'excrétion, l'existence d'une différence éventuelle dans l'installation et la survie d'une souche par rapport à une autre constituent une première approche de la notion éventuelle d'interaction spécifique hôte-bactérie décrite par Dingle *et al.* (2005) et par Miller *et al.* (2006).

Dans notre étude, tous les animaux « contacts », logés dans des cases attenantes à celles des animaux inoculés, sont devenus excréteurs avec un niveau d'excrétion similaire à celui des animaux infectés expérimentalement. Ces résultats mettent en évidence la possibilité d'une transmission à distance de *Campylobacter* dans des locaux d'élevage. La réalisation

d'une macrorestriction génomique en champ pulsé sur ces mêmes isolats a permis de distinguer *C. coli* d'origine porcine de *C. coli* d'origine aviaire et de souligner la transmission de ces deux souches aux porcs des cases adjacentes.

A l'inverse, aucun passage n'a été mis en évidence entre les parcs d'animaux inoculés avec *C. coli* d'origine aviaire et ceux inoculés avec *C. jejuni*. En plus d'une première hypothèse concernant l'existence d'une interaction spécifique hôte-bactérie, il est possible que l'inoculation avec *C. jejuni* ait empêché la colonisation secondaire de *C. coli*. Le dispositif expérimental permettait en effet de tester l'effet de compétition ou l'effet de transmission d'une souche lorsqu'un animal est déjà porteur. Ainsi, dans cette salle, nous pouvions tester l'infection d'animaux logés dans des cases adjacentes, déjà inoculés avec une souche pour *C. jejuni* et *C. coli* d'origine aviaire (éventualité qui pourrait se produire en élevage plein air ou via l'environnement).

Ces résultats sont à confirmer puisque dans cette étude le nombre d'animaux est relativement faible pour chaque lot en raison des conditions contraignantes de sa réalisation (conditions expérimentales). La mise en place d'un autre essai est une perspective intéressante pour étudier la capacité de transmission de ces souches à des animaux contacts non inoculés. Des infections répétées au cours du temps pour un même animal avec une ou plusieurs souches (effet des inoculations successives) permettront d'étudier un éventuel effet de compétition entre deux souches. De la même façon, il serait intéressant d'étudier l'implantation de souches de *C. jejuni* retrouvées chez le porc, notamment celles retrouvées aux Etats Unis par Harvey et Young, prédominantes dans deux élevages de porcs (Harvey *et al.*, 1999 ; Young *et al.*, 2000). Enfin cet effet de compétition ou effet barrière s'il existe est une voie d'exploration intéressante notamment dans la mise en place de mesures de lutte (type flore de barrière).

En parallèle lors de cette étude, l'application des méthodes de typage moléculaire a souligné la variabilité de *Campylobacter* « *in vivo* » dans l'animal. Un effet souche a été remarqué puisque seul *C. coli* d'origine porcine a varié. Les résultats concernant les deux méthodes de typage employées sont similaires et permettent d'établir un seuil au delà duquel il est difficile de faire la part entre la variabilité génomique intrinsèque de la souche et la variabilité observée due à la présence de souches d'origines différentes. La validation et la calibration des méthodes dans une perspective d'utilisation en contexte épidémiologique sont des données essentielles pour pouvoir « tracer » les souches et établir un lien en élevage. De

plus, nous avons observé que la capacité de la méthode à détecter des variations était sans doute dépendante du nombre d'isolats. Hänninen *et al.* (1999) émettent l'hypothèse que la détection d'une variabilité dépendrait non seulement de la méthode utilisée mais également du nombre d'échantillons prélevés. Notre étude corrobore cette hypothèse puisqu'au maximum 3 isolats sur 20 varient. De ce fait, comme le souligne Weijtens *et al.* (1999), une analyse génotypique réalisée sur un nombre restreint de colonies diminue les chances de mettre en évidence des profils variés. De fait, en testant 1 à 3 isolats par prélèvement, comme il est habituellement réalisé, la probabilité de voir une différence est plus faible.

Enfin, la dernière partie de cette thèse correspondait à l'étude en conditions réelles (i) de l'infection des porcs par *Campylobacter* et (ii) de la contamination de leur environnement en élevage naisseur engraisseur. Notre étude a confirmé la forte prévalence de l'infection par *Campylobacter* des truies et des porcelets tout au long d'un cycle de production. La contamination des porcelets est précoce et s'effectue au moins en partie au contact de la mère, l'environnement ne présentant plus de *Campylobacter* après le nettoyage, la désinfection et le vide sanitaire. Bien qu'aucune relation quantitative n'ait été démontrée entre la contamination de l'environnement et des animaux, l'environnement est apparu très fréquemment contaminé et il joue probablement un rôle dans la transmission des *Campylobacter* entre animaux. L'analyse par typage génétique permettra de répondre à certaines questions concernant les modalités de contamination des animaux et la circulation de *Campylobacter* au sein d'un élevage porcin. Le typage génétique des souches de *Campylobacter* isolées pour chaque prélèvement positif (matières fécales, aliment et environnement) aidera peut être à déterminer d'autres sources de contamination autres que les truies qui pourraient jouer un rôle dans la contamination des porcelets et de leur environnement au cours de l'élevage.

Outre l'efficacité des mesures classiques de nettoyage / désinfection / vide sanitaire pour éliminer *Campylobacter*, ces deux enquêtes en élevages ont permis de mettre en évidence, dans les deux élevages étudiés, une diminution de l'excrétion fécale de *Campylobacter* par les porcelets à 3 semaines. La poursuite du travail avec l'obtention de données similaires dans d'autres élevages sont nécessaires pour confirmer ou infirmer ces observations. Peu de données sont disponibles concernant l'établissement de la flore digestive chez le porcelet au cours des premières semaines de vie. Les facteurs de variation de la composition de cette flore seraient toutefois des éléments intéressants pour comprendre ce phénomène de diminution apparent de la prévalence d'infection, ce qui pourrait ouvrir des

perspectives quant à d'éventuelles méthodes de maîtrise.

Les procédés de nettoyage / désinfection / vide sanitaire et la conduite en bandes sont efficaces pour éviter le contact des animaux avec la bactérie dans une exploitation. Ces pratiques de biosécurité semblent à l'issue des études préliminaires en élevage relativement efficaces. Ces pratiques ont probablement un effet sur l'amélioration d'un troupeau vis à vis de *Campylobacter* comme cela avait été souligné par Weijtens *et al.* (2000) et Hume *et al.* (2002). Néanmoins, globalement la mise en place de mesures de lutte au niveau de l'élevage paraît difficile étant donné l'exposition permanente des animaux via l'environnement notamment. Il faut donc intégrer une lutte à l'échelle de l'ensemble de la filière porcine, plus particulièrement au niveau du process d'abattage et aux étapes de ressuyage par exemple.

Le rôle majeur des truies dans l'infection précoce des animaux avec la transmission indirecte de *Campylobacter* via les matières fécales et le maintien de l'infection dans l'ensemble du troupeau a été souligné. En effet, Weijtens *et al.*, en 2000, ont souligné que l'introduction de porcs EOPS permet de diminuer le pourcentage d'adultes porteurs de *Campylobacter* par rapport à des élevages conventionnels. Les auteurs suggèrent qu'il serait ainsi possible de diminuer notablement le taux de contamination en élevage porcin en associant mesures d'hygiène strictes et introduction de reproducteurs indemnes.

Ces travaux de recherche ont permis l'acquisition de méthodes d'études calibrées et de données concernant l'infection des porcs et la contamination de l'environnement par *Campylobacter* en élevage naisseur-engraisseur. Ces méthodes sont adaptables à d'autres substrats tels que les aliments et peuvent être utilisés à grande échelle. L'analyse des souches isolées au sein de l'élevage I permettra sans doute de formuler des hypothèses concernant les mécanismes de transmission et la dynamique d'infection de *Campylobacter* en élevage porcin.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abeyta C, Deeter FG, Kaysner CA, Stott RF, Wekell MM, 1993. *Campylobacter jejuni* in a Washington state shellfish growing bed associated with illness. *Journal of Food Protection* 56:323-325.
- Abu-Halaweh M, Bates J, Patel BK, 2005. Rapid detection and differentiation of pathogenic *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by real-time PCR. *Research in Microbiology* 156:107-114.
- Açık MN, Cetinkaya B, 2006. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from healthy cattle and sheep. *Journal of Medical Microbiology* 55.
- Adak GK, Cowden JM, Nicholas S, Evans HS, 1995. The Public Health Laboratory Service national case-control study of primary indigenous sporadic cases of campylobacter infection. *Epidemiology and Infection* 115:15-22.
- Adak GK, Long SM, O'Brien SJ, 2002. Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut* 51:832-841.
- Adak GK, Meakins SM, Yip H, Lopman BA, O'Brien SJ, 2005. Disease risks from foods, England and Wales, 1996-2000. *Emerging Infectious Diseases* 11:365-372.
- Adesiyun AA, Kaminjolo JS, Loregnard R, Kitson-Piggott W, 1992. *Campylobacter* infections in calves, piglets, lambs and kids in Trinidad. *British Veterinary Journal* 148:547-556.
- Aeschbacher M, Piffaretti JC, 1989. Population genetics of human and animal enteric *Campylobacter* strains. *Infection and Immunity* 57:1432-1437.
- AFSSA, 2004. Appréciation des risques alimentaires liés aux *Campylobacter*. Application au couple poulet / *C. jejuni*. In: Rapport technique de l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments). Maisons-Alfort (France): AFSSA; 96.
- Albert MJ, Neil L, Pazhoor AA, Haridas S, Rotimi VO, Khan I, 2005. Ciprofloxacin resistance and its molecular mechanism in *Campylobacter* spp. isolated in Kuwait. *Microbial Drug Resistance* 11:266-270.
- Alderton MR, Korolik V, Coloe PJ, Dewhirst FE, Paster BJ, 1995. *Campylobacter hyoilei* sp. nov., associated with porcine proliferative enteritis. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45:61-66.
- Allos BM, 2001. *Campylobacter jejuni* Infections: Update on Emerging Issues and Trends. *Clinical Infectious Diseases* 32:1201-1206.
- Alm RA, Guerry P, Trust TJ, 1993a. Significance of duplicated flagellin genes in *Campylobacter*. *Journal of Molecular Biology* 230:359-363.
- Alm RA, Guerry P, Trust TJ, 1993b. The *Campylobacter sigma* 54 *flaB* flagellin promoter is subject to environmental regulation. *Journal of Bacteriology* 175:4448-4455.
- Alm RA, Guerry P, Trust TJ, 1993c. Distribution and polymorphism of the flagellin genes from isolates of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology* 175:3051-3057.
- Altekruse SF, Stern NJ, Fields PI, Swerdlow DL, 1999. *Campylobacter jejuni*--an emerging foodborne pathogen. *Emerging Infectious Diseases* 5:28-35.
- Alter T, Gaull F, Kasimir S, Gurtler M, Mielke H, Linnebur M, Fehlhaber K, 2005. Prevalences and transmission routes of *Campylobacter* spp. strains within multiple pig farms. *Veterinary Microbiology* 108:251-261.

- Alter T, Scherer K, 2006. Stress response of *Campylobacter* spp. and its role in food processing. *Journal of Veterinary Medicine* 53:351-357.
- Armstrong D, 2002. An introduction to batch farrowing. Meat and livestock commission.
- Avrain L, Allain L, Vernozy-Rozand C, Kempf I, 2003. Disinfectant susceptibility testing of avian and swine *Campylobacter* isolates by a filtration method. *Veterinary Microbiology* 96:35-40.
- Ayling RD, Woodward MJ, Evans S, Newell DG, 1996. Restriction fragment length polymorphism of polymerase chain reaction products applied to the differentiation of poultry *Campylobacter* for epidemiological investigations. *Research in Veterinary Science* 60:168-172.
- Babakhani FK, Joens LA, 1993. Primary swine intestinal cells as a model for studying *Campylobacter jejuni* invasiveness. *Infection and Immunity* 61:2723-2726.
- Bacon DJ, Alm RA, Burr DH, Hu L, Kopecko DJ, Ewing CP, Trust TJ, Guerry P, 2000. Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infection and Immunity* 68:4384-4390.
- Bacon DJ, Alm RA, Hu L, Hickey TE, Ewing CP, Batchelor RA, Trust TJ, Guerry P, 2002. DNA sequence and mutational analyses of the pVir plasmid of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infection and Immunity* 70:6242-6250.
- Bacon DJ, Szymanski CM, Burr DH, Silver RP, Alm RA, Guerry P, 2001. A phase-variable capsule is involved in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Molecular Microbiology* 40:769-777.
- Baffone W, Casaroli A, Citterio B, Pierfelici L, Campana R, Vittoria E, Guaglianone E, Donelli G, 2006. *Campylobacter jejuni* loss of culturability in aqueous microcosms and ability to resuscitate in a mouse model. *International Journal of Food Microbiology* 107:83-91.
- Bang DD, Scheutz F, Ahrens P, Pedersen K, Blom J, Madsen M, 2001. Prevalence of cytolethal distending toxin (cdt) genes and CDT production in *Campylobacter* spp. isolated from Danish broilers. *Journal of Medical Microbiology* 50:1087-1094.
- Bar W, Fricke G, 1987. Rapid and improved gas-liquid chromatography technique for detection of hippurate hydrolysis by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 25:1776-1778.
- Barer MR, Harwood CR, 1999. Bacterial viability and culturability. *Advances in Microbial Physiology* 41:93-137.
- Barloy-Hubler F, 2007. *Campylobacter* Genomes: General and specific features. In: *New Developments in Food Microbiology Research* (Berger MC, ed). New York: Novapublishers.
- Belloc C, Magras C, Fourichon C, Fédérighi M, Seegers H, 2004. Epidémiologie descriptive de *Campylobacter* spp. chez le porc : portage et typologie des souches isolées en élevage et dans les viandes. In: 36^{ème} journées de la Recherche Porcine. Paris.
- Berends BR, Urlings HA, Snijders JM, Van Knapen F, 1996. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. *International Journal of Food Microbiology* 30:37-53.
- Bereswill S, Kist M, 2003. Recent developments in *Campylobacter* pathogenesis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 16:487-491.
- Best EL, Powell EJ, Swift C, Grant KA, Frost JA, 2003. Applicability of a rapid duplex real-time PCR assay for speciation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* directly from culture plates. *FEMS Microbiology Letters* 229:237-241.
- Beumer RR, Noomen A, Kampelmacher EH, 1985a. The effect of the lactoperoxidase system on reduction of *Campylobacter jejuni* in raw milk. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 51:501-503.

- Beumer RR, Noomen A, Marijs JA, Kampelmacher EH, 1985b. antibacterial action of the lactoperoxydase system on campylobacter jejuni in cows milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 39:107-114.
- Biswas D, Fernando U, Reiman C, Willson P, Potter A, Allan B, 2006. Effect of cytolethal distending toxin of *Campylobacter jejuni* on adhesion and internalization in cultured cells and in colonization of the chicken gut. *Avian Diseases* 50:586-593.
- Black RE, Levine MM, Clements ML, Hughes TP, Blaser MJ, 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *The Journal of Infectious Diseases* 157:472-479.
- Blaser MJ, Smith PF, Repine JE, Joiner KA, 1988. Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections. Failure of encapsulated *Campylobacter fetus* to bind C3b explains serum and phagocytosis resistance. *The Journal of Clinical Investigation* 81:1434-1444.
- Bolton FJ, Coates D, 1983. A comparison of microaerobic systems for the culture of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *European journal of clinical microbiology* 2:105-110.
- Bolton FJ, Holt AV, Hutchinson DN, 1984. *Campylobacter* biotyping scheme of epidemiological value. *Journal of Clinical Pathology* 37:677-681.
- Bolton FJ, Holt AV, Hutchinson DN, 1985. Urease-positive thermophilic campylobacters. *Lancet* 1:1217-1218.
- Bolton FJ, Wareing DRA, Skirrow MB, Hutchinson DN, 1992. Identification and biotyping of campylobacters. In: *Identification methods in applied and environmental microbiology* (R. G. Board DJFASE, ed). London: Blackwell Scientific; 151-161.
- Boosinger TR, Powe TA, 1988. *Campylobacter jejuni* infections in gnotobiotic pigs. *American Journal of Veterinary Research* 49:456-458.
- Borch E, Nesbakken T, Christensen H, 1996. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 30:9-25.
- Bourke B, Sherman P, Louie H, Hani E, Islur P, Chan VL, 1995. Physical and genetic map of the genome of *Campylobacter upsaliensis*. *Microbiology* 141 (Pt 10):2417-2424.
- Bown P, 2006. Advantages and disadvantages of batch farrowing. *Farm Animal Practice* :94-96.
- Bracewell AJ, Reagan JO, Carpenter JA, Blankenship LC, 1985. Incidence of *Campylobacter-jejuni-coli* on pork carcasses in the Northwest Georgia area. *Journal of Food Protection* 48:808-810.
- Bras AM, Ketley JM, 1999. Transcellular translocation of *Campylobacter jejuni* across human polarised epithelial monolayers. *FEMS Microbiology Letters* 179:209-215.
- Bretag AH, Archer RS, Atkinson HM, Woods WH, 1984. Circadian urticaria: another campylobacter association. *Lancet* 1:954.
- Broman T, Waldenstrom J, Dahlgren D, Carlsson I, Eliasson I, Olsen B, 2004. Diversities and similarities in PFGE profiles of *Campylobacter jejuni* isolated from migrating birds and humans. *Journal of Applied Microbiology* 96:834-843.
- Brown PE, Christensen OF, Clough HE, Diggle PJ, Hart CA, Hazel S, Kemp R, Leatherbarrow AJH, Moore A, Sutherst J, Turner J, Williams NJ, Wright EJ, French NP, 2004. Frequency and Spatial Distribution of Environmental *Campylobacter* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 70:6501-6511.
- Bryner JH, Ritchie AE, Foley JW, Berman DT, 1970. Isolation and characterization of a bacteriophage for *Vibrio fetus*. *Journal of Virology* 6:94-99.
- Burr MD, Pepper IL, 1997. Variability in presence-absence scoring of AP PCR fingerprints affects computer matching of bacterial isolates. *Journal of Microbiological Methods* 29:63-68.
- Butler RC, Lund V, Carlson DA, 1987. Susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Yersinia enterocolitica* to UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology* 53:375-378.

- Buswell CM, Herlihy YM, Lawrence LM, McGuiggan JT, Marsh PD, Keevil CW, Leach SA, 1998. Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and -rRNA staining. *Applied and Environmental Microbiology* 64:733-741.
- Butzler JP, 2004. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clinical Microbiology and Infections* 10:868-876.
- Butzler JP, Dekeyser P, Detrain M, Dehaen F, 1973. Related vibrio in stools. *The Journal of Pediatrics* 82:493-495.
- Butzler JP, Oosterom J, 1991. *Campylobacter*: pathogenicity and significance in foods. *International Journal of Food Microbiology* 12:1-8.
- Butzler JP, Skirrow MB, 1979. *Campylobacter* enteritis. *Clinics in Gastroenterology* 8:737-765.
- Buzby JC, Allos BM, Roberts T, 1997. The economic burden of *Campylobacter*-associated Guillain-Barre syndrome. *The Journal of Infectious Diseases* 176 Suppl 2:S192-197.
- Cabrita J, Rodrigues J, Braganca F, Morgado C, Pires I, Goncalves AP, 1992. Prevalence, biotypes, plasmid profile and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from wild and domestic animals from northeast Portugal. *The Journal of Applied Bacteriology* 73:279-285.
- Caldwell MB, Guerry P, Lee EC, Burans JP, Walker RI, 1985. Reversible expression of flagella in *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity* 50:941-943.
- Canton P, Hoen B, Gerard A, May T, Burdin P, 1989. Infections à *Campylobacter* d'origine intestinale - manifestations extra-digestives. *Médecine et Maladies Infectieuses* 19:43-47.
- Cappelier JM, Minet J, Magras C, Colwell RR, Federighi M, 1999a. Recovery in embryonated eggs of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells and maintenance of ability to adhere to HeLa cells after resuscitation. *Applied and Environmental Microbiology* 65:5154-5157.
- Cappelier J-M, Magras C, Jouve J-L, Federighi M, 1999b. Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells in two animal models. *Food Microbiology* 16.
- Caugant A, Quéméré A, 1999. La conduite tout plein-tout vide. *Atout Porc Septembre*:14-15.
- CDCP, 2002a. Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illnesses—elected sites, United States, 2001. (Rep MMMW, ed): Centers for Disease Control and Prevention; 325–329.
- CDCP, 2002b. Outbreak of *Campylobacter jejuni* infections associated with drinking unpasteurized milk procured through a cow-leasing program - Wisconsin, 2001. (Rep MMMW, ed): Centers for Disease Control and Prevention; 548–549.
- CDCP, 2004. Preliminary FoodNet data on the incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - Selected Sites, United States, 2003. (Rep MMMW, ed): Centers for Disease Control and Prevention; 338–343
- CDCP, 2006. Preliminary FoodNet data on the incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - 10 Sites, United States, 2005. (Rep MMMW, ed): Centers for Disease Control and Prevention; 392–396.
- Chang N, Taylor DE, 1990. Use of pulsed-field agarose gel electrophoresis to size genomes of *Campylobacter* species and to construct a Sall map of *Campylobacter jejuni* UA580. *The Journal of Bacteriology* 172:5211-5217.
- Chen ML, Ge Z, Fox JG, Schauer DB, 2006. Disruption of tight junctions and induction of proinflammatory cytokine responses in colonic epithelial cells by *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity* 74:6581-6589.

- Chinivasagam HN, Thomas RJ, Casey K, McGahan E, Gardner EA, Rafiee M, Blackall PJ, 2004. Microbiological status of piggery effluent from 13 piggeries in the south east Queensland region of Australia. *Journal of Applied Microbiology* 97:883-891.
- Choi HK, Marth EH, Vasavada PC, 1993. Use of microwave energy to inactivate *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter jejuni* in milk. *Milchwissenschaft-Milk Science International* 48:134-136.
- Christensen BB, Sommer HM, Rosenquist H, Nielsen NL, 2001. Risk assessment on *Campylobacter jejuni* in chicken products. Danish Veterinary and Food administration.
- Christensen H, Jorgensen K, Olsen JE, 1999. Differentiation of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* by length and DNA sequence of the 16S-23S rRNA internal spacer region. *Microbiology* 145 (Pt 1):99-105.
- Colin P, 1985. *Campylobacter jejuni* dans les abattoirs de porc. *Sciences des Aliments* 5:127-132.
- Colles FM, Jones K, Harding RM, Maiden MC, 2003. Genetic diversity of *Campylobacter jejuni* isolates from farm animals and the farm environment. *Applied and Environmental Microbiology* 69:7409-7413.
- Corbel MJ, Gill KP, 1987. Lectin agglutination of thermophilic *Campylobacter* species. *Veterinary Microbiology* 15:163-173.
- Corry JE, Post DE, Colin P, Laisney MJ, 1995. Culture media for the isolation of campylobacters. *International Journal of Food Microbiology* 26:43-76.
- Crushell E, Harty S, Sharif F, Bourke B, 2004. Enteric campylobacter: purging its secrets? *Pediatric Research* 55:3-12.
- De Boer E, Hahne M, 1990. Cross-contamination with *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* spp. from raw chicken products during food preparation. *Journal of Food Protection* 53:1067-1068.
- De Boer P, Wagenaar JA, Achterberg RP, van Putten JP, Schouls LM, Duim B, 2002. Generation of *Campylobacter jejuni* genetic diversity in vivo. *Molecular Microbiology* 44:351-359.
- De Grau A, Dewey C, Friendship R, de Lange K, 2005. Observational study of factors associated with nursery pig performance. *Canadian Journal of Veterinary Research* 69:241-245.
- Debruyne L, Samyn E, De Brandt E, Vandenberg O, Heyndrickx M, Vandamme P, 2008. Comparative performance of different PCR assays for the identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Research in Microbiology* 159:88-93.
- Deibel KE, Banwart GJ, 1984. Effect of spices on *Campylobacter jejuni* at 3 temperatures. *Journal of Food Safety* 6:241-251.
- Delsol AA, Sunderland J, Woodward MJ, Pumbwe L, Piddock LJ, Roe JM, 2004. Emergence of fluoroquinolone resistance in the native *Campylobacter coli* population of pigs exposed to enrofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53:872-874.
- Deming MS, Tauxe RV, Blake PA, Dixon SE, Fowler BS, Jones TS, Lockamy EA, Patton CM, Sikes RO, 1987. *Campylobacter* enteritis at a university: transmission from eating chicken and from cats. *American Journal of Epidemiology* 126:526-534.
- Denis M, Soumet C, Rivoal K, Ermel G, Blivet D, Salvat G, Colin P, 1999. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Letters in Applied Microbiology* 29:406-410.
- Denis M, Refrégier-Petton J, Laisney MJ, Ermel G, Salvat G, 2001. *Campylobacter* contamination in French chicken production from farm to consumers. Use of a PCR assay for detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Camp. coli*. *Journal of Applied Microbiology* 91:255-267.

- Denis M, Chidaine B, Laisney MJ, Kempf I, Rivoal K, Megraud F, Fravallo P, 2008a. Comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry, pig and *Campylobacter* human infections in Brittany, France. *Pathol Biol (Paris)*.
- Denis M, Rose V, Huneau-Salaun A, Balaine L, Salvat G, 2008b. Diversity of pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from broiler chickens in France. *Poultry Science* 87:1662-1671.
- Diarra M, 1993. Diarrhée aiguë à *Campylobacter* chez les enfants vietnamiens suivis de 0 à 24 mois dans leur milieu naturel : incidence et immunité. Bordeaux: Université Bordeaux 2.
- Diker KS, Akan M, Hascelik G, Yurdakok M, 1991. The bactericidal activity of tea against *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Letters in Applied Microbiology* 12:34-35.
- Dingle KE, Colles FM, Wareing DR, Ure R, Fox AJ, Bolton FE, Bootsma HJ, Willems RJ, Urwin R, Maiden MC, 2001. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology* 39:14-23.
- Dingle KE, Colles FM, Falush D, Maiden MC, 2005a. Sequence typing and comparison of population biology of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology* 43:340-347.
- Dingle KE, Colles FM, Falush D, Maiden MCJ, 2005b. Sequence Typing and Comparison of Population Biology of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology* 43:340-347.
- Docherty L, Adams MR, Patel P, McFadden J, 1996a. Detection of *C. jejuni* in milk and poultry using the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. In: *Campylobacters, Helicobacters, and related organisms* (Press P, ed). New-York, USA: Plenum Press.
- Docherty L, Adams MR, Patel P, McFadden J, 1996b. The magnetic immuno-polymerase chain reaction assay for the detection of *Campylobacter* in milk and poultry. *Letters in Applied Microbiology* 22:288-292.
- Dorrell N, Mangan JA, Laing KG, Hinds J, Linton D, Al-Ghusein H, Barrell BG, Parkhill J, Stoker NG, Karlyshev AV, Butcher PD, Wren BW, 2001. Whole genome comparison of *Campylobacter jejuni* human isolates using a low-cost microarray reveals extensive genetic diversity. *Genome Research* 11:1706-1715.
- Doyle LP, 1944. A *Vibrio* associated swine dysentery. *American Journal of Veterinary Research* 5:3-5.
- Doyle MP, 1981. *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*: an old pathogen of new concern. *Journal of Food Protection* 44:480-488.
- Doyle MP, 1984. *Campylobacter* in foods. In: *Campylobacter Infection in Man and Animals* (Butzler JP, ed): Boca Raton, CRC Press; 163-180.
- Dubnau D, 1999. DNA uptake in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 53:217-244.
- Duim B, Wassenaar TM, Rigter A, Wagenaar J, 1999. High-resolution genotyping of *Campylobacter* strains isolated from poultry and humans with amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology* 65:2369-2375.
- Durand P, 1999. Technologies des produits de charcuterie et des salaisons. *Technique & Documentation*:1-46.
- Eastmond CJ, Reid TM, 1982. *Campylobacter* enteritis and erythema nodosum. *British Medical Journal (Clinical Research Ed)* 285:1421-1422.
- Eastmond CJ, Reid TM, Rennie JA, 1981. Reactive arthritis associated with *campylobacter* enteritis. *Annals of The Rheumatic Diseases* 40:431.

- Eastmond CJ, Rennie JA, Reid TM, 1983. An outbreak of *Campylobacter* enteritis--a rheumatological followup survey. *The Journal of Rheumatology* 10:107-108.
- Easton J, 1996. Fate and transport of *Campylobacter* in soil arising from farming practices. In: *Campylobacters, Helicobacters, and related organisms*. New-York, USA: Plenum Press.
- Eberhart-Phillips J, Walker N, Garrett N, Bell D, Sinclair D, Rainger W, Bates M, 1997. *Campylobacteriosis* in New Zealand: results of a case-control study. *Journal of Epidemiology & Community Health* 51:686-691.
- Effler P, Jeong MC, Kimura A, Nakata M, Burr R, Cremer E, Slutsker L, 2001. Sporadic *Campylobacter jejuni* infections in Hawaii: associations with prior antibiotic use and commercially prepared chicken. *The Journal of Infectious Diseases* 183:1152-1155.
- EFSA, 2006. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2005. (Journal TE, ed): EFSA; 94.
- EFSA, 2007. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006. (Journal TE, ed): EFSA; 130.
- Eisenstein BI, 1990. New molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases. *The Journal of Infectious Diseases* 161:595-602.
- Ekdahl K, Giesecke J, 2004. Travellers returning to Sweden as sentinels for comparative disease incidence in other European countries, *campylobacter* and *giardia* infection as examples. *Euro Surveillance* 9:476.
- El Harrif Z, Mégraud F, 1986a. Characterization of thermophilic *Campylobacter*: I. carbon-substrate utilization tests. *Current Microbiology* 13:117-122.
- El Harrif Z, Mégraud F, 1986b. Characterization of thermophilic *Campylobacter*: II. Enzymatic profiles. *Current Microbiology* 13:1-6.
- Endtz HP, Giesendorf BA, van Belkum A, Lauwers SJ, Jansen WH, Quint WG, 1993. PCR-mediated DNA typing of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with recurrent infections. *Research in Microbiology* 144:703-708.
- Endtz HP, Vliegthart JS, Vandamme P, Weverink HW, van den Braak NP, Verbrugh HA, van Belkum A, 1997. Genotypic diversity of *Campylobacter lari* isolated from mussels and oysters in The Netherlands. *International Journal of Food Microbiology* 34:79-88.
- Endtz HP, Ang CW, van Den Braak N, Duim B, Rigter A, Price LJ, Woodward DL, Rodgers FG, Johnson WM, Wagenaar JA, Jacobs BC, Verbrugh HA, van Belkum A, 2000. Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* from patients with Guillain-Barre and Miller Fisher syndromes. *Journal of Clinical Microbiology* 38:2297-2301.
- Engberg J, Gerner-Smidt P, Scheutz F, Moller Nielsen E, On SL, Molbak K, 1998. Water-borne *Campylobacter jejuni* infection in a Danish town---a 6-week continuous source outbreak. *Clinical Microbiology and Infections* 4:648-656.
- Englen MD, Fedorka-Cray PJ, 2002. Evaluation of a commercial diagnostic PCR for the identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Letters in Applied Microbiology* 35:353-356.
- Englen MD, Ladely SR, Fedorka-Cray PJ, 2003. Isolation of *Campylobacter* and identification by PCR. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ) 216:109-121.
- Eriksen K, Landsverk T, Gondrosen B, Vormeland J, 1990. Immuno-histochemical and -cytochemical evidence suggesting the presence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in cases of porcine intestinal adenomatosis. *Acta Veterinaria Scandinavica* 31:445-451.

- Espié E, Rouault E, Gallay A, Lehours P, Mégraud F, 2007. Bilan de la surveillance des infections à *Campylobacter* chez l'homme en France en 2006. INVS.
- Euzéby JP, 2002. Campylobacterales. In: Dictionnaire de bactériologie vétérinaire disponible en ligne à <http://www.bacteriocict.fr>.
- Euzéby JP, 2005. Campylobacterales. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire <http://www.bacdiconet>.
- Evans MR, Roberts RJ, Ribeiro CD, Gardner D, Kembrey D, 1996. A milk-borne campylobacter outbreak following an educational farm visit. *Epidemiology and Infection* 117:457-462.
- Eyers M, Chapelle S, Van Camp G, Goossens H, De Wachter R, 1993. Discrimination among thermophilic *Campylobacter* species by polymerase chain reaction amplification of 23S rRNA gene fragments. *Journal of Clinical Microbiology* 31:3340-3343.
- Eyigor A, Dawson KA, Langlois BE, Pickett CL, 1999. Detection of cytolethal distending toxin activity and *cdt* genes in *Campylobacter* spp. isolated from chicken carcasses. *Applied and Environmental Microbiology* 65:1501-1505.
- Fauchere JL, Kervella M, Rosenau A, Mohanna K, Veron M, 1989. Adhesion to HeLa cells of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* outer membrane components. *Research in Microbiology* 140:379-392.
- Fayos A, Owen RJ, Hernandez J, Jones C, Lastovica A, 1993. Molecular subtyping by genome and plasmid analysis of *Campylobacter jejuni* serogroups O1 and O2 (Penner) from sporadic and outbreak cases of human diarrhoea. *Epidemiology and Infection* 111:415-427.
- Federighi M, Magras C, Pilet MF, Cappelier J-M, 1996. Les *Campylobacter* thermotolérants et les viandes rouges. *Viandes et Produits carnés* 17:283-285.
- Federighi M, Tholozan JL, Cappelier JM, Tissier JP, Jouve JL, 1998. Evidence of non-cocoid viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells in microcosm water by direct viable count, CTC-DAPI double staining, and scanning electron microscopy. *Food Microbiology* 15:539-550.
- Fernandez H, Landskron E, Figueroa G, Gesche W, Montefusco A, 1990. [*Campylobacter laridis*: first clinical isolation and identification of a reservoir in Chile]. *Revista Médica de Chile* 118:699-701.
- Finlay RC, Mann ED, Horning JL, 1986. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* Contamination in Manitoba Swine Carcasses. *Canadian Veterinary Journal* 27:185-187.
- Fleiss JLFJ, 1981. *Statistical Methods for Rates and Proportions*; John Wiley & Sons, Inc. ed. New York: John Wiley & Sons.
- Florent A, 1953. Isolement d'un vibron saprophyte du sperme taureau et du vagin de la vache (*vibrio bubulus*). *Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie Et De Ses Filiales* 147:2066-2069.
- Fosse J, Laroche M, Rossero A, Federighi M, Seegers H, Magras C, 2006. Recovery methods for detection and quantification of *Campylobacter* depend on meat matrices and bacteriological or PCR tools. *Journal of Food Protection* 69:2100-2106.
- Fouts DE, Mongodin EF, Mandrell RE, Miller WG, Rasko DA, Ravel J, Brinkac LM, DeBoy RT, Parker CT, Daugherty SC, Dodson RJ, Durkin AS, Madupu R, Sullivan SA, Shetty JU, Ayodeji MA, Shvartsbeyn A, Schatz MC, Badger JH, Fraser CM, Nelson KE, 2005. Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *Campylobacter* species. *PLoS Biology* 3:e15.
- Friedman CR, Neimann J, Wegener HC, Tauxe RV, 2000. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: *Campylobacter*, 2nd edition ed. Washington D.C., USA: ASM press; 121-138.

- Friedman CR, Hoekstra RM, Samuel M, Marcus R, Bender J, Shiferaw B, Reddy S, Ahuja SD, Helfrick DL, Hardnett F, Carter M, Anderson B, Tauxe RV, 2004. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: A case-control study in FoodNet sites. *Clinical Infectious Diseases* 38 Suppl 3:S285-296.
- Friendship RM, Kains F, 1998. Low-cost housing and batch farrowing. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 20:205-209.
- Frost JA, Oza AN, Thwaites RT, Rowe B, 1998. Serotyping scheme for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on direct agglutination of heat-stable antigens. *Journal of Clinical Microbiology* 36:335-339.
- Gallay A, Simon F, Megraud F, 2003a. Surveillance of human *Campylobacter* infections in France--part 2--implementation of national surveillance. *Eurosurveillance* 8:218.
- Gallay A, Simon F, Mégraud F, 2003b. Surveillance of human *Campylobacter* infections in France--part 1--which data? A study of microbiological laboratories, 2000. *Eurosurveillance* 8:213-217.
- Gallay A, Prouzet V, Vaillant V, De Valk H, Labadi L, Desenclos JC, Mégraud F, 2004. Les infections à *Campylobacter* en France : deux premières années de surveillance. (sanitaire RdIIIndv, ed): INVS.
- Gallay A, Prouzet-Mauleon V, De Valk H, Vaillant V, Labadi L, Desenclos JC, Megraud F, 2005. Les infections à *Campylobacter* chez l'homme en France : bilan des trois années de surveillance 2001-2003. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* 185:369-376.
- Gallay A, De Valk H, Cournot M, Ladeuil B, Hemery C, Castor C, Bon F, Megraud F, Le Cann P, Desenclos JC, 2006. A large multi-pathogen waterborne community outbreak linked to faecal contamination of a groundwater system, France, 2000. *Clinical Microbiology and Infection* 12:561-570.
- Gallay A, Espié E, Prouzet-Mauléon V, Rouault E, Lehours P, Mégraud F, 2007a. Surveillance des infections à *Campylobacter* en France : bilan de la surveillance du réseau de laboratoires de ville et hospitaliers, 2004-2005. INVS.
- Gallay A, Prouzet-Mauleon V, Kempf I, Lehours P, Labadi L, Camou C, Denis M, de Valk H, Desenclos JC, Megraud F, 2007b. *Campylobacter* antimicrobial drug resistance among humans, broiler chickens, and pigs, France. *Emerging Infectious Diseases* 13:259-266.
- Gallay A, Bousquet V, Siret V, Prouzet-Mauleon V, Valk Hd, Vaillant V, Simon F, Strat YL, Megraud F, Desenclos J-C, 2008. Risk Factors for Acquiring Sporadic *Campylobacter* Infection in France: Results from a National Case-Control Study. *The Journal of Infectious Diseases* 197:1477-1484.
- Gebhart CJ, Edmonds P, Ward GE, Kurtz HJ, Brenner DJ, 1985. "*Campylobacter hyointestinalis*" sp. nov.: a new species of *Campylobacter* found in the intestines of pigs and other animals. *Journal of Clinical Microbiology* 21:715-720.
- Gibson JR, Fitzgerald C, Owen RJ, 1995. Comparison of PFGE, ribotyping and phage-typing in the epidemiological analysis of *Campylobacter jejuni* serotype HS2 infections. *Epidemiology and Infection* 115:215-225.
- Gibson J, Lorenz E, Owen RJ, 1997. Lineages within *Campylobacter jejuni* defined by numerical analysis of pulsed-field gel electrophoretic DNA profiles. *Journal of Medical Microbiology* 46:157-163.
- Gillespie IA, O'Brien SJ, Frost JA, Adak GK, Horby P, Swan AV, Painter MJ, Neal KR, Collaborators TCSSS, 2002. A Case-Case Comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* Infection: A Tool for Generating Hypotheses. *Emerging Infectious Diseases* 8:937-942.

- Goodman SD, Scocca JJ, 1988. Identification and arrangement of the DNA sequence recognized in specific transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 85:6982-6986.
- Goossens H, Vlaes L, De Boeck M, Pot B, Kersters K, Levy J, De Mol P, Butzler JP, Vandamme P, 1990. Is "*Campylobacter upsaliensis*" an unrecognised cause of human diarrhoea? *Lancet* 335:584-586.
- Grajewski BA, Kusek JW, Gelfand HM, 1985. Development of a bacteriophage typing system for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 22:13-18.
- Guerry P, Szymanski CM, Prendergast MM, Hickey TE, Ewing CP, Pattarini DL, Moran AP, 2002. Phase variation of *Campylobacter jejuni* 81-176 lipooligosaccharide affects ganglioside mimicry and invasiveness in vitro. *Infection and Immunity* 70:787-793.
- Guerry P, 2007. *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends in Microbiology* 15:456-461.
- Guévremont E, Higgins R, Quessy S, 2004. Characterization of *Campylobacter* isolates recovered from clinically healthy pigs and from sporadic cases of *Campylobacteriosis* in humans. *Journal of Food Protection* 67:228-234.
- Gun-Munro J, Rennie RP, Thornley JH, Richardson HL, Hodge D, Lynch J, 1987. Laboratory and clinical evaluation of isolation media for *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology* 25:2274-2277.
- Hald B, Skovgard H, Pedersen K, Bunkenborg H, 2008. Influxed Insects as Vectors for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Danish Broiler Houses. *Poultry Science* 87:1428-1434.
- Hanninen ML, 1982. Comparison of four enrichment media in the recovery of *Campylobacter jejuni*. *Acta Veterinaria Scandinavica* 23:425-437.
- Hanninen ML, Hakkinen M, Rautelin H, 1999. Stability of Related Human and Chicken *Campylobacter jejuni* Genotypes after Passage through Chick Intestine Studied by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 65:2272-2275.
- Hanninen ML, Pajarre S, Klossner ML, Rautelin H, 1998. Typing of human *Campylobacter jejuni* isolates in Finland by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 36:1787-1789.
- Hanninen ML, Haajanen H, Pummi T, Wermundsen K, Katila ML, Sarkkinen H, Miettinen I, Rautelin H, 2003. Detection and typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and analysis of indicator organisms in three waterborne outbreaks in Finland. *Applied and Environmental Microbiology* 69:1391-1396.
- Harrington CS, Thomson-Carter FM, Carter PE, 1997. Evidence for recombination in the flagellin locus of *Campylobacter jejuni*: implications for the flagellin gene typing scheme. *Journal of Clinical Microbiology* 35:2386-2392.
- Harrington CS, On SL, 1999. Extensive 16S rRNA gene sequence diversity in *Campylobacter hyointestinalis* strains: taxonomic and applied implications. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49 Pt 3:1171-1175.
- Harrington CS, Moran L, Ridley AM, Newell DG, Madden RH, 2003. Inter-laboratory evaluation of three flagellin PCR/RFLP methods for typing *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: the CAMPYNET experience. *Journal of Applied Microbiology* 95:1321-1333.
- Harris NV, Weiss NS, Nolan CM, 1986. The role of poultry and meats in the etiology of *Campylobacter jejuni/coli* enteritis. *American Journal of Public Health* 76:407-411.
- Harvey RB, Anderson RC, Young CR, Hume ME, Genovese KJ, Ziprin RL, Farrington LA, Stanker LH, Nisbet DJ, 1999. Prevalence of *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Arcobacter* species at slaughter in market age pigs. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 473:237-239.

- Harvey RB, Young CR, Anderson RC, Droleskey RE, Genovese KJ, Egan LF, Nisbet DJ, 2000. Diminution of *Campylobacter* colonization in neonatal pigs reared off-sow. *Journal of Food Protection* 63:1430-1432.
- Hassane DC, Lee RB, Pickett CL, 2003. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin promotes DNA repair responses in normal human cells. *Infection and Immunity* 71:541-545.
- Havelaar AH, de Wit MA, van Koningsveld R, van Kempen E, 2000. Health burden in the Netherlands due to infection with thermophilic *Campylobacter* spp. *Epidemiology and Infection* 125:505-522.
- Hazeleger WC, Wouters JA, Rombouts FM, Abee T, 1998. Physiological activity of *Campylobacter jejuni* far below the minimal growth temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 64:3917-3922.
- Hebert GA, Hollis DG, Weaver RE, Lambert MA, Blaser MJ, Moss CW, 1982. 30 years of campylobacters: biochemical characteristics and a biotyping proposal for *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology* 15:1065-1073.
- Hébert H, Lurette A, Fourichon C, Seegers H, Belloc C, 2006. Modalités de conduite en bandes en élevage porcin : effets sur les contacts entre animaux. *Journées de la Recherche Porcine* 39:345-340.
- Helms M, Vastrup P, Gerner-Smidt P, Molbak K, 2003. Short and long term mortality associated with foodborne bacterial gastrointestinal infections: registry based study. *British Medical Journal* 326:357.
- Hendrixson DR, DiRita VJ, 2003. Transcription of sigma54-dependent but not sigma28-dependent flagellar genes in *Campylobacter jejuni* is associated with formation of the flagellar secretory apparatus. *Molecular Microbiology* 50:687-702.
- Hendrixson DR, 2006. A phase-variable mechanism controlling the *Campylobacter jejuni* FlgR response regulator influences commensalism. *Molecular Microbiology* 61:1646-1659.
- Hernandez J, Fayos A, Ferrus MA, Owen RJ, 1995. Random amplified polymorphic DNA fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from human faeces, seawater and poultry products. *Research in Microbiology* 146:685-696.
- Hernandez J, Fayos A, Alonso JL, Owen RJ, 1996. Ribotypes and AP-PCR fingerprints of thermophilic campylobacters from marine recreational waters. *The Journal of applied bacteriology* 80:157-164
- Hickey TE, McVeigh AL, Scott DA, Michielutti RE, Bixby A, Carroll SA, Bourgeois AL, Guerry P, 2000. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin mediates release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity* 68:6535-6541.
- Ho TW, Willison HJ, Nachamkin I, Li CY, Veitch J, Ung H, Wang GR, Liu RC, Cornblath DR, Asbury AK, Griffin JW, McKhann GM, 1999. Anti-GD1a antibody is associated with axonal but not demyelinating forms of Guillain-Barre syndrome. *Annals of Neurology* 45:168-173.
- Hook H, 2005. *Campylobacter* epidemiology - Insights from subtyping by pulsed-field gel electrophoresis. Uppsala.
- Hook H, Fattah MA, Ericsson H, Vagsholm I, Danielsson-Tham M-L, 2005. Genotype dynamics of *Campylobacter jejuni* in a broiler flock. *Veterinary Microbiology* 106:109-117.
- Houng HS, Sethabutr O, Nirdnoy W, Katz DE, Pang LW, 2001. Development of a *ceuE*-based multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for direct detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Thailand. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 40:11-19.

- Hu L, Kopecko DJ, 1999. *Campylobacter jejuni* 81-176 associates with microtubules and dynein during invasion of human intestinal cells. *Infection and Immunity* 67:4171-4182.
- Hume ME, Droleskey RE, Sheffield CL, Harvey RB, 2002. *Campylobacter coli* pulsed field gel electrophoresis genotypic diversity among sows and piglets in a farrowing barn. *Current microbiology* 45:128-132.
- Hunter PR, 1990. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *Journal of Clinical Microbiology* 28:1903-1905.
- Ikram R, Chambers S, Mitchell P, Brieseman MA, Ikam OH, 1994. A case control study to determine risk factors for campylobacter infection in Christchurch in the summer of 1992-3. *The New Zealand Medical Journal* 107:430-432.
- Imai Y, Kikuchi M, Matsuda M, Honda M, Fukuyama M, Tsukada M, Kaneuchi C, 1994. Macro-fingerprinting analysis at the chromosomal genomic DNA level of isolates of thermophilic *Campylobacter coli* and *C. jejuni*, by pulsed-field gel electrophoresis. *Cytobios* 78:115-122.
- Inglis GD, Kalischuk LD, 2003. Use of PCR for Direct Detection of *Campylobacter* Species in Bovine Feces. *Applied and Environmental Microbiology* 69:3435-3447.
- Ito T, Sekizuka T, Murayama O, Moore JE, Millar BC, Taneike I, Matsuda M, 2007. Cloning, sequencing and molecular characterisation of a cryptic plasmid from a urease-positive thermophilic *Campylobacter* (UPTC) isolate. *British Journal of Biomedical Science* 64:70-73.
- ITP, 2000. Mémento de l'éleveur de porc. ITP (Institut Technique du Porc).
- ITP, 2004. Le Porc par les chiffres 2005. ITP (Institut Technique du Porc).
- Jackson CJ, Fox AJ, Jones DM, 1996. A novel polymerase chain reaction assay for the detection and speciation of thermophilic *Campylobacter* spp. *The Journal of Applied Bacteriology* 81:467-473.
- Jakopanec I, Borgen K, Vold L, Lund H, Forseth T, Hannula R, Nygard K, 2008. A large waterborne outbreak of campylobacteriosis in Norway: the need to focus on distribution system safety. *BMC Infectious Diseases* 8:128.
- Janssen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker M, Vos P, Zabeau M, Kersters K, 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* 142 (Pt 7):1881-1893.
- Jensen MA, Webster JA, Straus N, 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology* 59:945-952.
- Jensen AN, Andersen MT, Dalsgaard A, Baggesen DL, Nielsen EM, 2005. Development of real-time PCR and hybridization methods for detection and identification of thermophilic *Campylobacter* spp. in pig faecal samples. *Journal of Applied Microbiology* 99:292-300.
- Jensen AN, Dalsgaard A, Baggesen DL, Nielsen EM, 2006. The occurrence and characterization of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in organic pigs and their outdoor environment. *Veterinary Microbiology* 116:96-105.
- Jin S, Joe A, Lynett J, Hani EK, Sherman P, Chan VL, 2001. JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Molecular Microbiology* 39:1225-1236.
- Jin S, Song YC, Emili A, Sherman PM, Chan VL, 2003. JlpA of *Campylobacter jejuni* interacts with surface-exposed heat shock protein 90alpha and triggers signalling pathways leading to the activation of NF-kappaB and p38 MAP kinase in epithelial cells. *Cellular Microbiology* 5:165-174.
- Johnson WM, Lior H, 1988. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microbial Pathogenesis* 4:115-126.

- Jones FS, Orcutt M, Little RB, 1931. Vibrios (*Vibrio jejuni*, n.sp.) associated with intestinal disorders of cows and calves. *Journal of Experimental Medicine* 53:853-864.
- Jones DM, Sutcliffe EM, Abbott JD, 1985. Serotyping of *Campylobacter* species by combined use of two methods. *European Journal of Clinical Microbiology* 4:562-565.
- Jones K, 2001a. The *Campylobacter* conundrum. *Trends in Microbiology* 9:365-366.
- Jones K, 2001b. *Campylobacters* in water, sewage and the environment. *Journal of Applied Microbiology* 90:68S-79S.
- Kains F, 1998. Batch farrowing alternatives. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs.
- Kakinuma Y, Iida H, Sekizuka T, Usui K, Murayama O, Takamiya S, Millar BC, Moore JE, Matsuda M, 2007. Cloning, sequencing and characterization of a urease gene operon from urease-positive thermophilic *Campylobacter* (UPTC). *Journal of Applied Microbiology* 103:252-260.
- Kakoyiannis CK, Winter PJ, Marshall RB, 1984. Identification of *Campylobacter coli* isolates from animals and humans by bacterial restriction endonuclease DNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 48:545-549.
- Kakoyiannis CK, Winter PJ, Marshall RB, 1988. The relationship between intestinal *Campylobacter* species isolated from animals and humans as determined by BRENDA. *Epidemiology and Infection* 100:379-387.
- Kalenic S, Gmajnicki B, Milakovic-Novak L, Baklaic Z, Vodopija I, Skirrow MB, 1985. [Seasonal distribution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* (1 September 1982--31 August 1983)]. *Lijecnicki vjesnik* 107:431-432.
- Kalman M, Szollosi E, Czermann B, Zimanyi M, Szekeres S, Kalman M, 2000. Milkborne *Campylobacter* infection in Hungary. *Journal of Food Protection* 63:1426-1429.
- Kapperud G, Aasen S, 1992. Descriptive epidemiology of infections due to thermotolerant *Campylobacter* spp. in Norway, 1979-1988. *Apmis* 100:883-890.
- Kapperud G, Skjerve E, Bean NH, Ostroff SM, Lassen J, 1992. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infections: results of a case-control study in southeastern Norway. *Journal of Clinical Microbiology* 30:3117-3121.
- Kapperud G, Espeland G, Wahl E, Walde A, Herikstad H, Gustavsen S, Tveit I, Natas O, Bevanger L, Digranes A, 2003. Factors associated with increased and decreased risk of *Campylobacter* infection: a prospective case-control study in Norway. *American Journal of Epidemiology* 158:234-242.
- Karlyshev AV, McCrossan MV, Wren BW, 2001. Demonstration of polysaccharide capsule in *Campylobacter jejuni* using electron microscopy. *Infection and Immunity* 69:5921-5924.
- Karlyshev AV, Ketley JM, Wren BW, 2005. The *Campylobacter jejuni* glycome. *FEMS Microbiology Reviews* 29:377-390.
- Karmali MA, Simor AE, Roscoe M, Fleming PC, Smith SS, Lane J, 1986. Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. *Journal of Clinical Microbiology* 23:456-459.
- Keer JT, Birch L, 2003. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *Journal of Microbiological Methods* 53:175-183.
- Keller J, Wieland B, Wittwer M, Stephan R, Perreten V, 2007. Distribution and genetic variability among *Campylobacter* spp. isolates from different animal species and humans in Switzerland. *Zoonoses and Public Health* 54:2-7.
- Keramas G, Bang DD, Lund M, Madsen M, Bunkenborg H, Telleman P, Christensen CBV, 2004. Use of Culture, PCR Analysis, and DNA Microarrays for Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Chicken Feces. *Journal of Clinical Microbiology* 42:3985-3991.

- Ketley JM, 1997. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology* 143 (Pt 1):5-21.
- Khakhria R, Lior H, 1992. Extended phage-typing scheme for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Epidemiology and Infection* 108:403-414.
- Kiehlbauch JA, Cameron DN, Wachsmuth IK, 1994. Evaluation of ribotyping techniques as applied to *Arcobacter*, *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Molecular and Cellular Probes* 8:109-115.
- Kiggins EM, Plastringe WN, 1956. Effect of gaseous environment on growth and catalase content of *Vibrio fetus* cultures of bovine origin. *Journal of Bacteriology* 72:397-400.
- Kim NW, Bingham H, Khawaja R, Louie H, Hani E, Neote K, Chan VL, 1992. Physical map of *Campylobacter jejuni* TGH9011 and localization of 10 genetic markers by use of pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* 174:3494-3498.
- Kim NW, Lombardi R, Bingham H, Hani E, Louie H, Ng D, Chan VL, 1993. Fine mapping of the three rRNA operons on the updated genomic map of *Campylobacter jejuni* TGH9011 (ATCC 43431). *Journal of Bacteriology* 175:7468-7470.
- Kim JS, Carver DK, Kathariou S, 2006. Natural transformation-mediated transfer of erythromycin resistance in *Campylobacter coli* strains from turkeys and swine. *Applied Environmental Microbiology* 72:1316-1321.
- King EO, 1957. Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related vibrio. *The Journal of Infectious Diseases* 101:119-128.
- King L, Lehours P, Mégraud F, 2008. Bilan de la surveillance des infections à *Campylobacter* chez l'homme en France en 2007. INVS.
- Kist M, 1983. [Bacteriological diagnosis of enteric infections]. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A* 255:423-447.
- Klena JD, Parker CT, Knibb K, Ibbitt JC, Devane PM, Horn ST, Miller WG, Konkel ME, 2004a. Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a multiplex PCR developed from the nucleotide sequence of the lipid A gene *lpxA*. *Journal of Clinical Microbiology* 42:5549-5557.
- Klena JD, Parker CT, Knibb K, Ibbitt JC, Devane PML, Horn ST, Miller WG, Konkel ME, 2004b. Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a Multiplex PCR Developed from the Nucleotide Sequence of the Lipid A Gene *lpxA*. *Journal of Clinical Microbiology* 42:5549-5557.
- Kodaka H, Lombard GL, Dowell VR, Jr., 1982. Gas-liquid chromatography technique for detection of hippurate hydrolysis and conversion of fumarate to succinate by microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology* 16:962-964.
- Koene MG, Houwers DJ, Dijkstra JR, Duim B, Wagenaar JA, 2004. Simultaneous presence of multiple *Campylobacter* species in dogs. *Journal of Clinical Microbiology* 42:819-821.
- Koenraad PM, Ayling R, Hazeleger WC, Rombouts FM, Newell DG, 1995. The speciation and subtyping of *campylobacter* isolates from sewage plants and waste water from a connected poultry abattoir using molecular techniques. *Epidemiology and Infection* 115:485-494.
- Kokotovic B, On SLW, 1999. High-resolution genomic fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by analysis of amplified fragment length polymorphisms. *FEMS Microbiology Letters* 173:77-84.
- Konkel ME, Mead DJ, Hayes SF, Cieplak W, Jr., 1992. Translocation of *Campylobacter jejuni* across human polarized epithelial cell monolayer cultures. *The Journal of Infectious Diseases* 166:308-315.
- Konkel ME, Garvis SG, Tipton SL, Anderson DE, Jr., Cieplak W, Jr., 1997. Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Molecular Microbiology* 24:953-963.

- Konkel ME, Joens LA, Mixer PF, 2000. Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* virulence determinants. In: *Campylobacter*, 2nd edition ed. Washington D.C., USA: ASM Press; 217-240.
- Konkel ME, Klena JD, Rivera-Amill V, Monteville MR, Biswas D, Raphael B, Mickelson J, 2004. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *Journal of Bacteriology* 186:3296-3303.
- Koonjul PK, Brandt WF, Farrant JM, Lindsey GG, 1999. Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA. *Nucleic Acids Research* 27:915-916.
- Korolik V, Moorthy L, Coloe PJ, 1995. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains by using restriction endonuclease DNA profiles and DNA fragment polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology* 33:1136-1140.
- Kranker S, Alban L, Boes J, Dahl J, 2003. Longitudinal study of *Salmonella enterica* aerotype Typhimurium infection in three Danish farrow-to-finish swine herds. *Journal of Clinical Microbiology* 41:2282-2288.
- Kusumaningrum HD, Riboldi G, Hazeleger WC, Beumer RR, 2003. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology* 85:227-236.
- Kusumaningrum HD, van Asselt ED, Beumer RR, Zwietering MH, 2004. A quantitative analysis of cross-contamination of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. via domestic kitchen surfaces. *Journal of Food Protection* 67:1892-1903.
- Kutyavin IV, Lukhtanov EA, Gamper HB, Meyer RB, 1997. Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization. *Nucleic Acids Research* 25:3718-3723.
- Kuusi M, Nuorti JP, Hanninen ML, Koskela M, Jussila V, Kela E, Miettinen I, Ruutu P, 2005. A large outbreak of campylobacteriosis associated with a municipal water supply in Finland. *Epidemiology and Infection* 133:593-601.
- Labarca JA, Sturgeon J, Borenstein L, Salem N, Harvey SM, Lehnkering E, Reporter R, Mascola L, 2002. *Campylobacter upsaliensis*: Another Pathogen for Consideration in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 34:e59-e60.
- Lagier MJ, Joseph LA, Passaretti TV, Musser KA, Cirino NM, 2004. A real-time multiplexed PCR assay for rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Molecular and Cellular Probes* 18:275-282.
- Lammerding AM, Garcia MM, Mann ED, Robinson Y, Dorward WJ, Truscott RB, Tittiger F, 1988. Prevalence of *Salmonella* and thermophilic *Campylobacter* in fresh pork, beef, veal and poultry in Canada. *Journal of Food Protection* 51:47-52.
- Laternus C, Jores J, Moser I, Schwerk P, Wieler LH, 2005. Long-term clonal lineages within *Campylobacter jejuni* O:2 strains from different geographical regions and hosts. *International Journal of Medical Microbiology* 294:521-524.
- Le Bas D, 2001. 3-4-5 bandes, une autre stratégie! *Porc Magazine* 348.
- Le Borgne M, Jegou JY, 1997. Choisir une conduite en bandes : une affaire de conviction. *Porc Magazine* 297:73-79.
- Le Borgne M, Jegou JY, 2000. Les critères d'une bonne conduite en bandes. *Porc Magazine* 330:39-54.
- Leblanc Maridor M, Denis M, Lalande F, Beaurepaire B, Cariolet R, Fravallo P, Federighi M, Seegers H, Belloc C, 2008. Experimental infection of specific pathogen-free pigs with *Campylobacter*:

- excretion in faeces and transmission to non-inoculated pigs. *Veterinary Microbiology* 131:309-317.
- Lee A, O'Rourke JL, Barrington PJ, Trust TJ, 1986. Mucus colonization as a determinant of pathogenicity in intestinal infection by *Campylobacter jejuni*: a mouse cecal model. *Infection and Immunity* 51:536-546.
- Lekowska-Kochaniak A, Rozynek E, Popowski J, 1996. Antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* with reference to plasmid profiles of clinical and chicken isolates. *Acta Microbiologica Polonica* 45:249-259.
- Lentzsch P, Rieksneuwohner B, Wieler LH, Hotzel H, Moser I, 2004. High-resolution genotyping of *Campylobacter upsaliensis* strains originating from three continents. *Journal of Clinical Microbiology* 42:3441-3448.
- Levy AJ, 1946. A gastroenteritis outbreak probably due to a bovine strain of vibrio. *Yale Journal of Biological Medicine* 18:243-258.
- Lin JY, Chen KC, Hale J, Totten PA, Holmes KK, 1986. Two-dimensional thin-layer chromatography for the specific detection of hippurate hydrolysis by microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology* 23:118-123.
- Lin GF, Gebhart CJ, Murtaugh MP, 1991. Southern blot analysis of strain variation in *Campylobacter mucosalis*. *Veterinary Microbiology* 26:279-289.
- Lind L, Sjogren E, Welinder-Olsson C, Kaijser B, 1989. Plasmids and serogroups in *Campylobacter jejuni*. *Apmis* 97:1097-1102.
- Linton D, Lawson AJ, Owen RJ, Stanley J, 1997. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *Journal of Clinical Microbiology* 35:2568-2572.
- Lior H, Woodward DL, Edgar JA, Laroche LJ, Gill P, 1982. Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *Journal of Clinical Microbiology* 15:761-768.
- Lior H, 1984. New, extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and "*Campylobacter laridis*". *Journal of Clinical Microbiology* 20:636-640.
- Lior H, Butzler JP, 1986. Serotyping campylobacter. *Lancet* 1:1381-1382.
- Lior H, 1989a. *Médecine et Maladies Infectieuses* 19:18-24.
- Lior H, 1989b. Les *Campylobacter* : marqueurs épidémiologiques. *Médecine et Maladies Infectieuses* 19:18-24.
- Logan JMJ, Edwards KJ, Saunders NA, Stanley J, 2001. Rapid Identification of *Campylobacter* spp. by Melting Peak Analysis of Biprobcs in Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 39:2227-2232.
- Lund M, Nordentoft S, Pedersen K, Madsen M, 2004. Detection of *Campylobacter* spp. in Chicken Fecal Samples by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 42:5125-5132.
- Lund M, Madsen M, 2006. Strategies for the inclusion of an internal amplification control in conventional and real time PCR detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples. *Molecular and Cellular Probes* 20:92-99.
- Lurette A, 2007. Modélisation pour l'évaluation de mesures de maîtrise du portage de salmonelles chez le porc charcutier. Thèse doctorale, Université Rennes 1.
- Madden RH, Moran L, Scates P, 1996. Sub-typing of animal and human *Campylobacter* spp. using RAPD. *Letters in Applied Microbiology* 23:167-170.

- Madden RH, Moran L, Scates P, 1998. Frequency of occurrence of *Campylobacter* spp. in red meats and poultry in Northern Ireland and their subsequent subtyping using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and the random amplified polymorphic DNA method. *Journal of Applied Microbiology* 84:703-708.
- Madden RH, Moran L, Scates P, 2000. Optimising recovery of *Campylobacter* spp. from the lower porcine gastrointestinal tract. *Journal of Microbiological Methods* 42:115-119.
- Mafu AA, Higgins R, Nadeau M, Cousineau G, 1989. The incidence of *Salmonella*, *Campylobacter*, and *Yersinia enterocolitica* in swine carcasses and the slaughterhouse environment. *Journal of Food Protection* 52:642-645.
- Magras C, Garrec N, Laroche M, Rossero A, Mircovich C, Desmots M-H, Federighi M, 2004. Quantitative analysis of *Campylobacter* hazard in the pork chain. In: *CAMPYCHECK*, European Commission Research Project. Dublin, UK.
- Magras C, Garrec N, Laroche M, Rossero A, Mircovich C, Desmots M-H, Federighi M, 2004a. Sources of *Campylobacter* sp. contamination of piglets in farrowing units of farrow-to-finish farms: first results. In: *International Society for Animal Hygiene*. Saint Malo.
- Magras C, Laroche M, Rossero A, Mircovitch C, Desmots MH, Federighi M, 2004b. Contamination par *Campylobacter coli* en élevage porcin. In: *Société Française de Microbiologie*, 6ème congrès national. Bordeaux, France.
- Magras C, Laroche M, Rossero A, Federighi M, 2006. Quantitative analysis of *Campylobacter* hazard in the pork food chain. *CAMPYCHECK*, European Commission Research Project, 8th February, Dublin, UK.
- Malakauskas M, Jorgensen K, Nielsen EM, Ojeniyi B, Olsen JE, 2006. Isolation of *Campylobacter* spp. from a pig slaughterhouse and analysis of cross-contamination. *International Journal of Food Microbiology* 108:295-300.
- Mandal BK, Ellis ME, Dunbar EM, Whale K, 1984. Double-blind placebo-controlled trial of erythromycin in the treatment of clinical *campylobacter* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 13:619-623.
- Manning G, Duim B, Wassenaar T, Wagenaar JA, Ridley A, Newell DG, 2001. Evidence for a genetically stable strain of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology* 67:1185-1189.
- Martinez-Rodriguez A, Kelly AF, Park SF, Mackey BM, 2004. Emergence of variants with altered survival properties in stationary phase cultures of *Campylobacter jejuni*. *International Journal of Food Microbiology* 90:321-329.
- Mateo E, Carcamo J, Urquijo M, Perales I, Fernandez-Astorga A, 2005. Evaluation of a PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in retail poultry products. *Research in Microbiology* 156:568-574.
- Matsuda M, Tsukada M, Fukuyama M, Kato Y, Ishida Y, Honda M, Kaneuchi C, 1995. Detection of genomic variability among isolates of *Campylobacter jejuni* from chickens by crossed-field gel electrophoresis. *Cytobios* 82:73-79.
- Matsuda M, Moore JE, 2004. Urease-positive thermophilic *Campylobacter* species. *Applied and Environmental Microbiology* 70:4415-4418.
- Matsumoto K, Matsuda M, Kaneuchi C, 1992. Analysis of chromosome-sized DNA from the bacterial genome of thermophilic *Campylobacter lariidis* by pulsed-field gel electrophoresis and physical mapping. *Microbios* 71:7-14.
- Mazick A, Ethelberg S, Nielsen EM, Molbak K, Lisby M, 2006. An outbreak of *Campylobacter jejuni* associated with consumption of chicken, Copenhagen, 2005. *Euro Surveill* 11:137-139.

- Mazurek GH, Reddy V, Marston BJ, Haas WH, Crawford JT, 1996. DNA fingerprinting by infrequent-restriction-site amplification. *Journal of Clinical Microbiology* 34:2386-2390.
- Mazurier S, van de Giessen A, Heuvelman K, Wernars K, 1992. RAPD analysis of *Campylobacter* isolates: DNA fingerprinting without the need to purify DNA. *Letters in Applied Microbiology* 14:260-262.
- McCarthy N, Giesecke J, 2001. Incidence of Guillain-Barre syndrome following infection with *Campylobacter jejuni*. *American Journal of Epidemiology* 153:610-614.
- McOrist AL, Jackson M, Bird AR, 2002. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. *Journal of Microbiological Methods* 50:131-139.
- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV, 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 5:607-625.
- Meerburg BG, Jacobs-Reitsma WF, Wagenaar JA, Kijlstra A, 2006. Presence of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in Wild Small Mammals on Organic Farms. *Applied and Environmental Microbiology* 72:960-962.
- Mégraud F, 1987. Diagnostic bactériologique des infections à *Campylobacter*. *Revue Française des Laboratoires* 156:2-16.
- Mégraud F, 1988. Réseau de surveillance nationale des infections à *Campylobacter* - bilan de l'année 1997. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*:52.
- Mégraud F, 2003. Les infections à *Campylobacter* en France (1986-2000). In: *Surveillance nationale des maladies infectieuses 1998-2000: INVS*.
- Mégraud F, Prouzet-Mauleon V, 2004. Evolution de la résistance des *Campylobacters* aux antibiotiques en France (1986-2002). *BEH-Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire - Institut de veille sanitaire n°32-33:156-157*.
- Meinersmann RJ, Patton CM, Evins GM, Kaye WI, Fields PI, 2002. Genetic diversity and relationships of *Campylobacter* species and subspecies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:1789-1797.
- Melby K, Gondrosen B, Gregusson S, Ribe H, Dahl OP, 1991. Waterborne campylobacteriosis in northern Norway. *International Journal of Food Microbiology* 12:151-156.
- Mendelson TC, Shaw KL, 2005. Use of AFLP markers in surveys of arthropod diversity. *Methods in Enzymology* 395:161-177.
- Meunier JR, Grimont PA, 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Research in Microbiology* 144:373-379.
- Miller WG, Mandrell RE, 2005. Prevalence of *Campylobacter* in the food and water supply: Incidence, outbreaks, isolation and detection. *Campylobacter: Molecular and Cellular Biology*:101-163.
- Miller WG, Parker CT, Heath S, Lastovica AJ, 2007. Identification of genomic differences between *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* and *C. jejuni* subsp. *doylei* at the *nap* locus leads to the development of a *C. jejuni* subspeciation multiplex PCR method. *BMC Microbiology* 7:11.
- Miller WG, Wang G, Binnewies TT, Parker CT, 2008. The complete genome sequence and analysis of the human pathogen *Campylobacter lari*. *Foodborne Pathogens and Diseases* 5:371-386.
- Mills SD, Kurjanczyk LA, Shames B, Hennessy JN, Penner JL, 1991. Antigenic shifts in serotype determinants of *Campylobacter coli* are accompanied by changes in the chromosomal DNA restriction endonuclease digestion pattern. *Journal of Medical Microbiology* 35:168-173.
- Minet J, Grosbois B, Megraud F, 1988. *Campylobacter hyointestinalis*: an opportunistic enteropathogen? *Journal of Clinical Microbiology* 26:2659-2660.

- Mircovich C, Laroche M, Desmonts MH, Federighi M, 2004. Prévalence de la contamination des carcasses de porcs réfrigérés par *Campylobacter* sp. - premiers résultats. In: 1^{ère} journées "Sciences du muscle et technologie des Viandes". Rennes.
- Misawa N, Allos BM, Blaser MJ, 1998. Differentiation of *Campylobacter jejuni* serotype O19 strains from non-O19 strains by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 36:3567-3573.
- Mishu B, Ilyas AA, Koski CL, Vriesendorp F, Cook SD, Mithen FA, Blaser MJ, 1993. Serologic evidence of previous *Campylobacter jejuni* infection in patients with the Guillain-Barre syndrome. *Annals of Internal Medicine* 118:947-953.
- Mohran ZS, Guerry P, Lior H, Murphy JR, el-Gendy AM, Mikhail MM, Oyofa BA, 1996. Restriction fragment length polymorphism of flagellin genes of *Campylobacter jejuni* and/or *C. coli* isolates from Egypt. *Journal of Clinical Microbiology* 34:1216-1219.
- Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, Cabrita J, Megraud F, 1997. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *Journal of Clinical Microbiology* 35:995-998.
- Monteville MR, Yoon JE, Konkel ME, 2003. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiology* 149:153-165.
- Moore JE, Madden RH, 1993. Effects of processing on the survival of porcine *Campylobacter* spp. In: 62nd Annual Meeting and Summer Conference University of Nottingham. Nottingham: The Society for Applied Microbiology.
- Moore JE, Madden RH, 1998. Occurrence of thermophilic *Campylobacter* spp. in porcine liver in Northern Ireland. *Journal of Food Protection* 61:409-413.
- Moore JE, Lanser J, Heuzenroeder M, Ratcliff RM, Millar BC, Madden RH, 2002a. Molecular diversity of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* isolated from pigs at slaughter by *flaA*-RFLP analysis and ribotyping. *Journal of Veterinary Medicine* 49:388-393.
- Moore JE, Wilson TS, Wareing DR, Humphrey TJ, Murphy PG, 2002b. Prevalence of thermophilic *Campylobacter* spp. in ready-to-eat foods and raw poultry in Northern Ireland. *Journal of Food Protection* 65:1326-1328.
- Moore M, Cargill C, 2005. Batch farrowing. Adelaide, South Australia: Roseworthy Campus, The University of Adelaide.
- Moore JE, Corcoran D, Dooley JS, Fanning S, Lucey B, Matsuda M, McDowell DA, Megraud F, Millar BC, O'Mahony R, O'Riordan L, O'Rourke M, Rao JR, Rooney PJ, Sails A, Whyte P, 2005a. *Campylobacter*. *Veterinary Research* 36:351-382.
- Moore JE, Corcoran D, Dooley JSG, Fanning S, Lucey B, Matsuda M, McDowell DA, Mégraud F, Millar BC, O'Mahony R, O'Riordan L, 2005b. *Campylobacter*. *Veterinary Research* 36:351-382.
- Morgan D, Gunneberg C, Gunnell D, Healing TD, Lamerton S, Soltanpoor N, Lewis DA, White DG, 1994. An outbreak of *Campylobacter* infection associated with the consumption of unpasteurised milk at a large festival in England. *European Journal of Epidemiology* 10:581-585.
- Morris GK, el Sherbeeney MR, Patton CM, Kodaka H, Lombard GL, Edmonds P, Hollis DG, Brenner DJ, 1985. Comparison of four hippurate hydrolysis methods for identification of thermophilic *Campylobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 22:714-718.
- Moser I, Schroeder W, Salnikow J, 1997. *Campylobacter jejuni* major outer membrane protein and a 59-kDa protein are involved in binding to fibronectin and INT 407 cell membranes. *FEMS Microbiology Letters* 157:233-238.

- Moureau P, Derclaye I, Gregoire D, Janssen M, Cornelis GR, 1989. *Campylobacter* species identification based on polymorphism of DNA encoding rRNA. *Journal of Clinical Microbiology* 27:1514-1517.
- Munroe DL, Prescott JF, Penner JL, 1983. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* serotypes isolated from chickens, cattle, and pigs. *Journal of Clinical Microbiology* 18:877-881.
- Nachamkin I, Bohachick K, Patton CM, 1993a. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 31:1531-1536.
- Nachamkin I, Yang XH, Stern NJ, 1993b. Role of *Campylobacter jejuni* flagella as colonization factors for three-day-old chicks: analysis with flagellar mutants. *Applied and Environmental Microbiology* 59:1269-1273.
- Nachamkin I, Fischer SH, Yang XH, Benitez O, Cravioto A, 1994. Immunoglobulin A antibodies directed against *Campylobacter jejuni* flagellin present in breast-milk. *Epidemiology and Infection* 112:359-365.
- Nachamkin I, Ung H, Patton CM, 1996. Analysis of HL and O serotypes of *Campylobacter* strains by the flagellin gene typing system. *Journal of Clinical Microbiology* 34:277-281.
- Nachamkin I, Blaser MJ, 2000. *Campylobacter*, 2nd edition ed. Washington D.C., USA: ASM press.
- Nastasi A, Mammina C, Fantasia M, Pontello M, 1997. Epidemiological analysis of strains of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from foodborne outbreaks occurring in Italy, 1980-1994. *Journal of Medical Microbiology* 46:377-382.
- Nayak R, Stewart TM, Nawaz MS, 2005. PCR identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by partial sequencing of virulence genes. *Molecular and Cellular Probes* 19:187-193.
- Nelson W, Harris B, 2006. Flies, fingers, fomites, and food. *Campylobacteriosis in New Zealand-food-associated rather than food-borne*. *The New Zealand Medical Journal* 119:U2128.
- Nesbakken T, Eckner K, Hoidal HK, Rotterud OJ, 2003. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp. in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering, and dressing procedures. *International Journal of Food Microbiology* 80:231-240.
- Newell DG, Fearnley C, 2003. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* 69:4343-4351.
- Newnham E, Chang N, Taylor DE, 1996. Expanded genomic map of *Campylobacter jejuni* UA580 and localization of 23S ribosomal rRNA genes by I-CeuI restriction endonuclease digestion. *FEMS Microbiology Letters* 142:223-229.
- Ng LK, Stiles ME, Taylor DE, 1987. DNA probes for identification of tetracycline resistance gene in *Campylobacter* species isolated from swine and cattle. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 31:1669-1674.
- Ng LK, Taylor DE, Stiles ME, 1988. Characterization of freshly isolated *Campylobacter coli* strains and suitability of selective media for their growth. *Journal of Clinical Microbiology* 26:518-523.
- Nielsen B, Baggesen D, Bager F, Haugegaard J, Lind P, 1995. The serological response to *Salmonella* serovars typhimurium and infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Veterinary Microbiology* 47:205-218.
- Nielsen EM, Engberg J, Madsen M, 1997. Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Danish patients, poultry, cattle and swine. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 19:47-56.

- Nielsen EM, Engberg J, Fussing V, Petersen L, Brogren CH, On SL, 2000. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry, and cattle. *Journal of Clinical Microbiology* 38:3800-3810.
- Nogva HK, Bergh A, Holck A, Rudi K, 2000. Application of the 5'-Nuclease PCR Assay in Evaluation and Development of Methods for Quantitative Detection of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4029-4036.
- Nylen G, Dunstan F, Palmer SR, Andersson Y, Bager F, Cowden J, Feierl G, Galloway Y, Kapperud G, Megraud F, Molbak K, Petersen LR, Ruutu P, 2002. The seasonal distribution of campylobacter infection in nine European countries and New Zealand. *Epidemiology and Infection* 128:383-390.
- O'Sullivan N, Benjamin J, Skirrow MB, 1990. Lectin typing of *Campylobacter* isolates. *Journal of Clinical Pathology* 43:957-960.
- Obiri-Danso K, Paul N, Jones K, 2001. The effects of UVB and temperature on the survival of natural populations and pure cultures of *Campylobacter jejuni*, *Camp. coli*, *Camp. lari* and urease-positive thermophilic campylobacters (UPTC) in surface waters. *Journal of Applied Microbiology* 90:256-267.
- Ohya T, Kubo M, Watase H, 1985. *Campylobacter* species isolated from swine with lesions of proliferative enteritis. *Nippon Juigaku Zasshi* 47:285-294.
- On SL, 1996. Identification methods for campylobacters, helicobacters, and related organisms. *Clinical Microbiology Reviews* 9:405-422.
- On SL, 1998. In vitro genotypic variation of *Campylobacter coli* documented by pulsed-field gel electrophoretic DNA profiling: implications for epidemiological studies. *FEMS Microbiology Letters* 165:341-346.
- On SL, 2001. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *Symposium series (Society for Applied Microbiology):1S-15S*.
- On SL, Bloch B, Holmes B, Hoste B, Vandamme P, 1995. *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *lawsonii* subsp. nov., isolated from the porcine stomach, and an emended description of *Campylobacter hyointestinalis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45:767-774.
- On SL, Jensen TK, Bille-Hansen V, Jorsal SE, Vandamme P, 2002. Prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. isolated from the internal organs of spontaneous porcine abortions in Denmark. *Veterinary Microbiology* 85:159-167.
- On SL, Jordan PJ, 2003. Evaluation of 11 PCR assays for species-level identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 41:330-336.
- On SL, Nielsen EM, Engberg J, Madsen M, 1998. Validity of *Sma*I-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *Sal*I, *Kpn*I, and *Bam*HI polymorphisms: evidence of identical clones infecting humans, poultry, and cattle. *Epidemiology and Infection* 120:231-237.
- On SLW, Holmes B, 1995. Classification and identification of *Campylobacters*, *Helicobacters* and allied taxa by numerical analysis of phenotypic characters. *Systematic and Applied Microbiology* 18:374-390.
- Ono K, Masaki H, Tokumaru Y, 1995. Isolation of *Campylobacter* spp. from slaughtered cattle and swine on blood-free selective medium. *The Journal of Veterinary Medical Science / The Japanese Society of Veterinary Science* 57:1085-1087.
- Oosterom J, Beckers HJ, van Noorle Jansen LM, van Schothorst M, 1980a. [An outbreak of *Campylobacter* infection in a barrack, probably caused by raw hamburger]. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde* 124:1631-1634.

- Oosterom J, Beckerts H, Van Noorle L, Schothorst M, 1980b. Een explosie van *Campylobacter*-infectie in een kaserne, waarschijnlijk veroorzaakt door rauwe tartaar. *Ned T Geneesk* 124:1631-1634.
- Oosterom J, Dekker R, de Wilde GJ, van Kempen-de Troye F, Engels GB, 1985. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* during pig slaughtering. *The Veterinary Quarterly* 7:31-34.
- Oporto B, Esteban JI, Aduriz G, Juste RA, Hurtado A, 2007. Prevalence and strain diversity of thermophilic campylobacters in cattle, sheep and swine farms. *Journal of Applied Microbiology* 103:977-984.
- Orskov F, Orskov I, 1983. From the national institutes of health. Summary of a workshop on the clone concept in the epidemiology, taxonomy, and evolution of the enterobacteriaceae and other bacteria. *The Journal of Infectious Diseases* 148:346-357.
- Owen RJ, Costas M, Dawson C, 1989. Application of different chromosomal DNA restriction digest fingerprints to specific and subspecific identification of *Campylobacter* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 27:2338-2343.
- Owen RJ, Desai M, Garcia S, 1993. Molecular typing of thermotolerant species of *Campylobacter* with ribosomal RNA gene patterns. *Research in Microbiology* 144:709-720.
- Owen RJ, Hernandez J, Bolton F, 1990. DNA restriction digest and ribosomal RNA gene patterns of *Campylobacter jejuni*: a comparison with bio-, sero-, and bacteriophage-types of United Kingdom outbreak strains. *Epidemiology and Infection* 105:265-275.
- Owen RJ, Leeton S, 1999. Restriction fragment length polymorphism analysis of the *flaA* gene of *Campylobacter jejuni* for subtyping human, animal and poultry isolates. *FEMS Microbiology Letters* 176:345-350.
- Oyoyo BA, Thornton SA, Burr DH, Trust TJ, Pavlovskis OR, Guerry P, 1992. Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30:2613-2619.
- Park CE, Stankiewicz ZK, Lovett J, Hunt J, 1981. Incidence of *Campylobacter jejuni* in fresh eviscerated whole market chickens. *Canadian Journal of Microbiology* 27:841-842.
- Park CE, Sanders GW, 1992. Occurrence of thermotolerant campylobacters in fresh vegetables sold at farmers' outdoor markets and supermarkets. *Canadian Journal of Microbiology* 38:313-316.
- Park SF, 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 74:177-188.
- Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, Chillingworth T, Davies RM, Feltwell T, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev AV, Moule S, Pallen MJ, Penn CW, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, van Vliet AH, Whitehead S, Barrell BG, 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 403:665-668.
- Patton CM, Barrett TJ, Morris GK, 1985. Comparison of the Penner and Lior methods for serotyping *Campylobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 22:558-565.
- Patton CM, Wachsmuth IK, Evins GM, Kiehlbauch JA, Plikaytis BD, Troup N, Tompkins L, Lior H, 1991. Evaluation of 10 methods to distinguish epidemic-associated *Campylobacter* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 29:680-688.
- Pavlovskis OR, Rollins DM, Haberberger RL, Jr., Green AE, Habash L, Strocko S, Walker RI, 1991. Significance of flagella in colonization resistance of rabbits immunized with *Campylobacter* spp. *Infection and Immunity* 59:2259-2264.

- Payne RE, Lee MD, Dreesen DW, Barnhart HM, 1999. Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* in broiler flocks using randomly amplified polymorphic DNA-PCR and 23S rRNA-PCR and role of litter in its transmission. *Applied and Environmental Microbiology* 65:260-263.
- Payot S, Avrain L, Magras C, Praud K, Cloeckaert A, Chaslus-Dancla E, 2004a. Relative contribution of target gene mutation and efflux to fluoroquinolone and erythromycin resistance, in French poultry and pig isolates of *Campylobacter coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 23:468-472.
- Payot S, Dridi S, Laroche M, Federighi M, Magras C, 2004b. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* isolated from fattening pigs in France. *Veterinary Microbiology* 101:91-99.
- Pead PJ, 1979. Electron microscopy of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Medical Microbiology* 12:383-385.
- Pearce RA, Wallace FM, Call JE, Dudley RL, Oser A, Yoder L, Sheridan JJ, Luchansky JB, 2003. Prevalence of *Campylobacter* within a swine slaughter and processing facility. *Journal of Food Protection* 66:1550-1556.
- Pearson AD, Greenwood MH, Feltham RK, Healing TD, Donaldson J, Jones DM, Colwell RR, 1996. Microbial ecology of *Campylobacter jejuni* in a United Kingdom chicken supply chain: intermittent common source, vertical transmission, and amplification by flock propagation. *Applied and Environmental Microbiology* 62:4614-4620.
- Pearson BM, Gaskin DJ, Segers RP, Wells JM, Nuijten PJ, van Vliet AH, 2007. The complete genome sequence of *Campylobacter jejuni* strain 81116 (NCTC11828). *Journal of Bacteriology* 189:8402-8403.
- Pei Z, Blaser MJ, 1993. PEB1, the major cell-binding factor of *Campylobacter jejuni*, is a homolog of the binding component in gram-negative nutrient transport systems. *Journal of Biological Chemistry* 268:18717-18725.
- Penn CW, 2001. Surface components of *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Symposium Series (Society for Applied Microbiology)* 25S-35S.
- Penner JL, 1988. The genus *Campylobacter*: a decade of progress. *Clinical Microbiology Reviews* 1:157-172.
- Penner JL, Hennessy JN, 1980. Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. *Journal of Clinical Microbiology* 12:732-737.
- Penner JL, Hennessy JN, Congi RV, 1983. Serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on the basis of thermostable antigens. *European Journal of Clinical Microbiology* 2:378-383.
- Perelle S, Josefsen M, Hoorfar J, Dilasser F, Grout J, Fach P, 2004. A LightCycler real-time PCR hybridization probe assay for detecting food-borne thermophilic *Campylobacter*. *Molecular and Cellular Probes* 18:321-327.
- Persson S, Olsen KEP, 2005. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *Journal of Medical Microbiology* 54:1043-1047.
- Petersen L, On SL, 2000. Efficacy of flagellin gene typing for epidemiological studies of *Campylobacter jejuni* in poultry estimated by comparison with macrorestriction profiling. *Letters in Applied Microbiology* 31:14-19.
- Petersen L, Nielsen EM, Engberg J, On SL, Dietz HH, 2001. Comparison of genotypes and serotypes of *Campylobacter jejuni* isolated from Danish wild mammals and birds and from broiler flocks and humans. *Applied and Environmental Microbiology* 67:3115-3121.

- Peterson MC, 2003. *Campylobacter jejuni* enteritis associated with consumption of raw milk. *Journal of Environmental Health* 65:20-21, 24, 26.
- Pezzotti G, Serafin A, Luzzi I, Mioni R, Milan M, Perin R, 2003. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. *International Journal of Food Microbiology* 82:281-287.
- Pichodo X, Caugant A, Le Moan L, 2000. La MAP : mesures à mettre en place pour limiter le taux de pertes. Synthèse bibliographique. Enquêtes en élevages et approche économique du taux de pertes. *Etude EDE du Finistère*:1-51.
- Pickett CL, Pesci EC, Cottle DL, Russell G, Erdem AN, Zeytin H, 1996. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* gene. *Infection and Immunity* 64:2070-2078.
- Pilet MF, Magras C, Cappelier JM, Federighi M, 1997. La recherche des *Campylobacter* thermotolérants dans les aliments : méthode de référence et méthodes alternatives. *Revue de Médecine Vétérinaire* 148:99-106.
- Poly F, Guerry P, 2008. Pathogenesis of *Campylobacter*. *Current Opinion in Gastroenterology* 24:27-31.
- Prasad KN, Mathur SK, Dhole TN, Ayyagari A, 1994. Antimicrobial susceptibility and plasmid analysis of *Campylobacter jejuni* isolated from diarrhoeal patients and healthy chickens in northern India. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research* 12:270-273.
- Prasad KN, Pradhan S, Nag VL, 2001. Guillain-Barre syndrome and *Campylobacter* infection. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health* 32:527-530.
- Prendergast MM, Moran AP, 2000. Lipopolysaccharides in the development of the Guillain-Barre syndrome and Miller Fisher syndrome forms of acute inflammatory peripheral neuropathies. *Journal of Endotoxin Research* 6:341-359.
- Price EP, Huygens F, Giffard PM, 2006. Fingerprinting of *Campylobacter jejuni* by using resolution-optimized binary gene targets derived from comparative genome hybridization studies. *Applied and Environmental Microbiology* 72:7793-7803.
- Purdy D, Buswell CM, Hodgson AE, McAlpine K, Henderson I, Leach SA, 2000. Characterisation of cytolethal distending toxin (CDT) mutants of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Medical Microbiology* 49:473-479.
- Ragimbeau C, Salvat G, Colin P, Ermel G, 1998. Development of a multiplex PCR gene fingerprinting method using *gyrA* and *pflA* polymorphisms to identify genotypic relatedness within *Campylobacter jejuni* species. *Journal of Applied Microbiology* 85:829-838.
- Rams TE, Feik D, Slots J, 1993. *Campylobacter rectus* in human periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology* 8:230-235.
- Raphael BH, Pereira S, Flom GA, Zhang Q, Ketley JM, Konkel ME, 2005. The *Campylobacter jejuni* response regulator, CbrR, modulates sodium deoxycholate resistance and chicken colonization. *Journal of Bacteriology* 187:3662-3670.
- Reina J, 1993. [Pathogenicity and virulence mechanisms described in thermo-resistant *Campylobacter* bacteria]. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica* 11:497-501.
- Reina J, Munoz C, Serra A, 1993. *Acta Gastroenterologica Belgica Suppl* 56:22.
- Richardson PT, Park SF, 1997. Integration of heterologous plasmid DNA into multiple sites on the genome of *Campylobacter coli* following natural transformation. *Journal of Bacteriology* 179:1809-1812.
- Rijpens N, Herman L, Vereecken F, Jannes G, De Smedt J, De Zutter L, 1999. Rapid detection of stressed *Salmonella* spp. in dairy and egg products using immunomagnetic separation and PCR. *International Journal of Food Microbiology* 46:37-44.

- Ritmeester W, Delfgou-Van Asch E, De Jonge R, 2003. Stability of the genotype of *Campylobacter jejuni* under controlled culture conditionc. RIVM report.
- Rivera-Amill V, Kim BJ, Seshu J, Konkel ME, 2001. Secretion of the virulence-associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. *The Journal of Infectious Diseases* 183:1607-1616.
- Rivoal K, Ragimbeau C, Salvat G, Colin P, Ermel G, 2005. Genomic Diversity of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* Isolates Recovered from Free-Range Broiler Farms and Comparison with Isolates of Various Origins. *Applied and Environmental Microbiology* 71:6216-6227.
- Rodrigues LC, Cowden JM, Wheeler JG, Sethi D, Wall PG, Cumberland P, Tompkins DS, Hudson MJ, Roberts JA, Roderick PJ, 2001. The study of infectious intestinal disease in England: risk factors for cases of infectious intestinal disease with *Campylobacter jejuni* infection. *Epidemiology and Infection* 127:185-193.
- Roels TH, Wickus B, Bostrom HH, Kazmierczak JJ, Nicholson MA, Kurzynski TA, Davis JP, 1998. A foodborne outbreak of *Campylobacter jejuni* (O:33) infection associated with tuna salad: a rare strain in an unusual vehicle. *Epidemiology and Infection* 121:281-287.
- Rollins DM, Colwell RR, 1986. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Applied and Environmental Microbiology* 52:531-538.
- Roop RM, 2nd, Smibert RM, Johnson JL, Krieg NR, 1984. Differential characteristics of catalase-positive campylobacters correlated with DNA homology groups. *Canadian Journal of Microbiology* 30:938-951.
- Rosenfield JA, Arnold GJ, Davey GR, Archer RS, Woods WH, 1985. Serotyping of *Campylobacter jejuni* from an outbreak of enteritis implicating chicken. *Journal of Infection* 11:159-165.
- Rossero A, Koffi NG, Pilet MF, Jugiau F, Federighi M, Magras C, 1999. Evaluation du portage gastrique en *Campylobacter* spp. des porcs charcutiers à l'abattoir. *Journées de la Recherche Porcine en France* 31:391-394.
- Rudi K, Hoidal HK, Katla T, Johansen BK, Nordal J, Jakobsen KS, 2004. Direct Real-Time PCR Quantification of *Campylobacter jejuni* in Chicken Fecal and Cecal Samples by Integrated Cell Concentration and DNA Purification. *Applied and Environmental Microbiology* 70:790-797.
- Ruiz-Palacios GM, Torres J, Torres NI, Escamilla E, Ruiz-Palacios BR, Tamayo J, 1983. Cholera-like enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni*. Characterisation and clinical significance. *Lancet* 2:250-253.
- Saenz Y, Zarazaga M, Lantero M, Gastanares MJ, Baquero F, Torres C, 2000. Antibiotic resistance in *Campylobacter* strains isolated from animals, foods, and humans in Spain in 1997-1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44:267-271.
- Sagara H, Mochizuki A, Okamura N, Nakaya R, 1987. Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* with special reference to plasmid profiles of Japanese clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 31:713-719.
- Sails AD, Fox AJ, Bolton FJ, Wareing DR, Greenway DL, 2003a. A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology* 69:1383-1390.
- Sails AD, Swaminathan B, Fields PI, 2003b. Utility of multilocus sequence typing as an epidemiological tool for investigation of outbreaks of gastroenteritis caused by *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology* 41:4733-4739.
- Salama SM, Bolton FJ, Hutchinson DN, 1990. Application of a new phagotyping scheme to campylobacters isolated during outbreaks. *Epidemiology and Infection* 104:405-411.

- Salama SM, Garcia MM, Taylor DE, 1992. Differentiation of the subspecies of *Campylobacter fetus* by genomic sizing. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42:446-450.
- Salama SM, Newnham E, Chang N, Taylor DE, 1995. Genome map of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* ATCC 27374. *FEMS Microbiology Letters* 132:239-245.
- Santesteban E, Gibson J, Owen RJ, 1996. Flagellin gene profiling of *Campylobacter jejuni* heat-stable serotype 1 and 4 complex. *Research in Microbiology* 147:641-649.
- Savill MG, Hudson JA, Ball A, Klena JD, Scholes P, Whyte RJ, McCormick RE, Jankovic D, 2001. Enumeration of *Campylobacter* in New Zealand recreational and drinking waters. *Journal of Applied Microbiology* 91:38-46.
- Schorr D, Schmid H, Rieder HL, Baumgartner A, Vorkauf H, Burnens A, 1994. Risk factors for *Campylobacter* enteritis in Switzerland. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin* 196:327-337.
- Schouls LM, Reulen S, Duim B, Wagenaar JA, Willems RJ, Dingle KE, Colles FM, Van Embden JD, 2003. Comparative genotyping of *Campylobacter jejuni* by amplified fragment length polymorphism, multilocus sequence typing, and short repeat sequencing: strain diversity, host range, and recombination. *Journal of Clinical Microbiology* 41:15-26.
- Schunck B, Kraft W, Truyen U, 1995. A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. *Journal of Virological Methods* 55:427-433.
- Schuppers ME, Stephan R, Ledergerber U, Danuser J, Bissig-Choisat B, Stark KDC, Regula G, 2005. Clinical herd health, farm management and antimicrobial resistance in *Campylobacter coli* on finishing pig farms in Switzerland. *Preventive Veterinary Medicine* 69:189-202.
- Schwartz DC, Saffran W, Welsh J, Haas R, Goldenberg M, Cantor CR, 1983. New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 47 Pt 1:189-195.
- Seafood Network Information Center, 2006. Chapter 11 : *Campylobacter* spp. (–Davis UoC, ed). Davis: University of California –Davis.
- Sebald M, Veron M, 1963. [Base DNA Content and Classification of Vibrios.]. *Annales de l'Institut Pasteur (Paris)* 105:897-910.
- Sekizuka T, Gondo T, Murayama O, Kato Y, Moore JE, Millar BC, Matsuda M, 2004. Molecular cloning, nucleotide sequencing and characterization of the flagellin gene from isolates of urease-positive thermophilic *Campylobacter*. *Research in Microbiology* 155:185-191.
- Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS, 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Applied and Environmental Microbiology* 51:873-884.
- Shane SM, 1992. The significance of *Campylobacter jejuni* infection in poultry: a review. *Avian Pathology* 21:189-213.
- Shi F, Chen YY, Wassenaar TM, Woods WH, Coloe PJ, Fry BN, 2002. Development and application of a new scheme for typing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 40:1791-1797.
- Siemer BL, Nielsen EM, On SL, 2005. Identification and molecular epidemiology of *Campylobacter coli* isolates from human gastroenteritis, food, and animal sources by amplified fragment length polymorphism analysis and Penner serotyping. *Applied and Environmental Microbiology* 71:1953-1958.
- Sivadon V, Orlikowski D, Rozenberg F, Quincampoix JC, Caudie C, Durand MC, Fauchere JL, Sharshar T, Raphael JC, Gaillard JL, 2005. [Prevalence and characteristics of Guillain-Barre

- syndromes associated with *Campylobacter jejuni* and cytomegalovirus in greater Paris]. *Pathologie Biologie (Paris)* 53:536-538.
- Skelly C, Weinstein P, 2003. Pathogen survival trajectories: an eco-environmental approach to the modeling of human campylobacteriosis ecology. *Environmental Health Perspectives* 111:19-28.
- Skirrow MB, 1977. *Campylobacter enteritis: a "new" disease*. *British Medical Journal* 2:9-11.
- Skirrow MB, Benjamin J, 1980. Differentiation of enteropathogenic *Campylobacter*. *Journal of Clinical Pathology* 33:1122.
- Skirrow MB, 1982. *Campylobacter enteritis - the first five years*. *Journal of Hygiene (London)* 89:175-184.
- Skirrow MB, Blaser MJ, 1995. *Campylobacter jejuni*. In: *Infections of the gastrointestinal tract*. New York, USA: Raven press; 825-848.
- Skirrow MB, 1990. *Campylobacter*. *Lancet* 336:921-923.
- Slater E, Owen RJ, 1998. Subtyping of *Campylobacter jejuni* Penner heat-stable (HS) serotype 11 isolates from human infections. *Journal of Medical Microbiology* 47:353-357.
- Smibert RM, 1984. *Campylobacter*. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Volume 1. Baltimore: Krieg, H. (ed), Williams and Wilkins.
- Smibert RM, 1978. The genus *Campylobacter*. *Annual Review of Microbiology* 32:673-709.
- Smith JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG, 1993. How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 90:4384-4388.
- Snelling WJ, Matsuda M, Moore JE, Dooley JS, 2005. *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology* 41:297-302.
- Solow BT, Cloak OM, Fratamico PM, 2003. Effect of temperature on viability of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on raw chicken or pork skin. *Journal of Food Protection* 66:2023-2031.
- Sorensen R, Christensen H, 1997. *Campylobacter* in pork: A problem? *Dansk Veterinaertidsskrift* 80:452-453.
- Soultos N, Madden RH, 2007. A genotyping investigation of the colonization of piglets by *Campylobacter coli* in the first 10 weeks of life. *Journal of Applied Microbiology* 102:916-920.
- Stanley J, Linton D, Sutherland K, Jones C, Owen RJ, 1995. High-resolution genotyping of *Campylobacter coli* identifies clones of epidemiologic and evolutionary significance. *The Journal of Infectious Diseases* 172:1130-1134.
- Steinbrueckner B, Haerter G, Pelz K, Burnens A, Kist M, 1998. Discrimination of *Helicobacter pullorum* and *Campylobacter lari* by analysis of whole cell fatty acid extracts. *FEMS Microbiology Letters* 168:209-212.
- Steinbrueckner B, Haerter G, Pelz K, Kist M, 1999. Routine identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from human stool samples. *FEMS Microbiology Letters* 179:227-232.
- Stern NJ, Myszewski MA, Barnhart HM, Dreesen DW, 1997. Flagellin A gene restriction fragment length polymorphism patterns of *Campylobacter* spp. isolates from broiler production sources. *Avian Diseases* 41:899-905.
- Sticht-Groh V, 1982. *Campylobacter* in healthy slaughter pigs: a possible source of infection for man. *Veterinary Record* 110:104-106.
- Struelens MJ, 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clinical Microbiology and Infection* 2:2-11.

- Studahl A, Andersson Y, 2000. Risk factors for indigenous campylobacter infection: a Swedish case-control study. *Epidemiology and Infection* 125:269-275.
- Studer E, Luthy J, Hubner P, 1999. Study of the presence of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in sand samples from four Swiss chicken farms. *Research in Microbiology* 150:213-219.
- Suzuki Y, Ishihara M, Saito M, Ishikawa N, Yokochi T, 1994. Discrimination by means of pulsed-field gel electrophoresis between strains of *Campylobacter jejuni* Lior type 4 derived from sporadic cases and from outbreaks of infection. *Journal of Infection* 29:183-187.
- Takkinen J, Ammon A, Robstad O, Breuer T, 2003. European survey on *Campylobacter* surveillance and diagnosis 2001. *Eurosurveillance* 8:207-213.
- Tangwacharin P, Chanthachum S, Khopaibool P, Griffiths MW, 2006. Morphological and physiological responses of *Campylobacter jejuni* to stress. *Journal of Food Protection* 69:2747-2753.
- Tauxe RV, Deming MS, Blake PA, 1985a. *Campylobacter jejuni* infections on college campuses: a national survey. *American Journal of Public Health* 75:659-660.
- Tauxe RV, Patton CM, Edmonds P, Barrett TJ, Brenner DJ, Blake PA, 1985b. Illness associated with *Campylobacter laridis*, a newly recognized *Campylobacter* species. *Journal of Clinical Microbiology* 21:222-225.
- Taylor DE, Yan W, Ng LK, Manavathu EK, Courvalin P, 1988. Genetic characterization of kanamycin resistance in *Campylobacter coli*. *Annales de l'Institut Pasteur-Microbiologie* 139:665-676.
- Taylor DN, Nachamkin I, Blaser MJ, Tompkins LS, 1992. *Campylobacter* infections in developing countries. In: *Campylobacter jejuni* : Current status and future trends. Washington D.C., USA: ASM Press; 20-30.
- Taylor DE, Eaton M, Yan W, Chang N, 1992. Genome maps of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Bacteriology* 174:2332-2337.
- Taylor DE, Garner RS, Allan BJ, 1983. Characterization of tetracycline resistance plasmids from *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 24:930-935.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B, 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulse-field gel electrophoresis strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* 33:2233-2239.
- Tenover FC, Knapp JS, Patton C, Plorde JJ, 1985a. Use of auxotyping for epidemiological studies of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections. *Infection and Immunity* 48:384-388.
- Tenover FC, Williams S, Gordon KP, Nolan C, Plorde JJ, 1985b. Survey of plasmids and resistance factors in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 27:37-41.
- Thackray PD, Moir A, 2003. SigM, an extracytoplasmic function sigma factor of *Bacillus subtilis*, is activated in response to cell wall antibiotics, ethanol, heat, acid, and superoxide stress. *Journal of Bacteriology* 185:3491-3498.
- Thakur S, Gebreyes WA, 2005. *Campylobacter coli* in swine production: antimicrobial resistance mechanisms and molecular epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology* 43:5705-5714.
- Tholozan JL, Cappelier JM, Tissier JP, Delattre G, Federighi M, 1999. Physiological Characterization of Viable-but-Nonculturable *Campylobacter jejuni* Cells. *Applied and Environmental Microbiology* 65:1110-1116.
- Thomas LM, Long KA, Good RT, Panaccio M, Widders PR, 1997. Genotypic Diversity among *Campylobacter jejuni* Isolates in a Commercial Broiler Flock. *Applied and Environmental Microbiology* 63:1874-1877.

- Vaillant V, De Valk H, Baron E, 2004. Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France Paris, France: INVS; 61-70.
- Vaillant V, de Valk H, Baron E, Ancelle T, Colin P, Delmas MC, Dufour B, Pouillot R, Le Strat Y, Weinbreck P, Jouglu E, Desenclos JC, 2005. Foodborne infections in France. *Foodborne Pathogens and Disease* 2:221-232.
- Valdivieso-Garcia A, Harris K, Riche E, Campbell S, Jarvie A, Popa M, Deckert A, Reid-Smith R, Rahn K, 2007. Novel *Campylobacter* isolation method using hydrophobic grid membrane filter and semisolid medium. *Journal of Food Protection* 70:355-362.
- Valsangiacomo C, Baggi F, Gaia V, Balmelli T, Peduzzi R, Piffaretti JC, 1995. Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies. *Journal of Clinical Microbiology* 33:1716-1719.
- Van Belkum A, Bax R, Peerbooms P, Goessens WH, van Leeuwen N, Quint WG, 1993. Comparison of phage typing and DNA fingerprinting by polymerase chain reaction for discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 31:798-803.
- Van Looveren M, Daube G, De Zutter L, Dumont JM, Lammens C, Wijdooghe M, Vandamme P, Jouret M, Cornelis M, Goossens H, 2001. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* strains isolated from food animals in Belgium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48:235-240.
- Vandamme P, De Ley J, 1991. Proposal for a new family, *Campylobacteriaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41:451-455.
- Vandamme P, Falsen E, Rossau R, Hoste B, Segers P, Tytgat R, De Ley J, 1991. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41:88-103.
- Vandamme P, Van Doorn LJ, al Rashid ST, Quint WG, van der Plas J, Chan VL, On SL, 1997. *Campylobacter hyoilei* Alderton et al. 1995 and *Campylobacter coli* Veron and Chatelain 1973 are subjective synonyms. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47:1055-1060.
- Vandamme P, Toffi C, *Campylobacter* ed. Nachamkin I, M.J. pp. 3±27., Press. WA, 2000. Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*.
- Vandenberg O, Dediste A, Houf K, Ibekwem S, Souayah H, Cadranel S, Douat N, Zissis G, Butzler JP, Vandamme P, 2004. *Arcobacter* species in humans. *Emerging Infectious Diseases* 10:1863-1867.
- Vanechoutte M, 1996. DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature. *Molecular Biotechnology* 6:115-142.
- Varela NP, Friendship RM, Dewey CE, 2007. Prevalence of *Campylobacter* spp. isolated from grower-finisher pigs in Ontario. *Canadian Veterinary Journal* 48:515-517.
- Véron M, Chatelain R, 1973. Taxonomic study of the genus *Campylobacter* *sebold* and *veron* and designation of the neotype strain for the type species *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) *sebold* and *veron*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 23:122-134.
- Versalovic J, Koeth T, Lupski JR, 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19:6823-6831.
- Vinzent R, Duma J, Picard N, 1947. Septicémie grave au cours de la grossesse due à un vibron. Avortement consécutif. *Compte rendu de l'Académie de Médecine* 131:90-94.

- Volokhov D, Chizhikov V, Chumakov K, Rasooly A, 2003. Microarray-based identification of thermophilic *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *Journal of Clinical Microbiology* 41:4071-4080.
- Von Altrock A, Louis AL, Rosler U, Alter T, Beyerbach M, Kreienbrocks L, Waldmann KH, 2006. [The bacteriological and serological prevalence of *Campylobacter* spp. and *Yersinia enterocolitica* in fattening pig herds in Lower Saxony]. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 119:391-399.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, et al., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414.
- Vriesendorp FJ, Mishu B, Blaser MJ, Koski CL, 1993. Serum antibodies to GM1, GD1b, peripheral nerve myelin, and *Campylobacter jejuni* in patients with Guillain-Barre syndrome and controls: correlation and prognosis. *Annals of Neurology* 34:130-135.
- Waage AS, Vardund T, Lund V, Kapperud G, 1999. Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* cells in environmental water, sewage, and food samples by a seminested PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology* 65:1636-1643.
- Walker RI, Caldwell MB, Lee EC, Guerry P, Trust TJ, Ruiz-Palacios GM, 1986. Pathophysiology of *Campylobacter enteritis*. *Microbiological Reviews* 50:81-94.
- Wang G, Clark CG, Taylor TM, Pucknell C, Barton C, Price L, Woodward DL, Rodgers FG, 2002. Colony Multiplex PCR Assay for Identification and Differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *Journal of Clinical Microbiology* 40:4744-4747.
- Wang Y, Taylor DE, 1990. Natural transformation in *Campylobacter* species. *Journal of Bacteriology* 172:949-955.
- Wang Y, Huang WM, Taylor DE, 1993. Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni* *gyrA* gene and characterization of quinolone resistance mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37:457-463.
- Wareing DR, Bolton FJ, Fox AJ, Wright PA, Greenway DL, 2002. Phenotypic diversity of *Campylobacter* isolates from sporadic cases of human enteritis in the UK. *Journal of Applied Microbiology* 92:502-509.
- Wassenaar TM, 1997. Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clinical Microbiology Reviews* 10:466-476.
- Wassenaar TM, Engelskirchen M, Park S, Lastovica A, 1997. Differential uptake and killing potential of *Campylobacter jejuni* by human peripheral monocytes/macrophages. *Medical Microbiology and Immunology* 186:139-144.
- Wassenaar TM, Blaser MJ, 1999. Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 1:1023-1033.
- Wassenaar TM, Geilhausen B, Newell DG, 1998. Evidence of genomic instability in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry. *Applied and Environmental Microbiology* 64:1816-1821.
- Wassenaar TM, Fry BN, Vanderzeijst BAM, 1995. Variation of the flagellin gene locus of *Campylobacter jejuni* by recombination and horizontal gene transfer. *Microbiology-Uk* 141:95-101.
- Wassenaar TM, Newell DG, 2000. Genotyping of *Campylobacter* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 66:1-9.
- Waterman SR, Small PL, 1998. Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain solid food sources. *Applied and Environmental Microbiology* 64:3882-3886.

- Weber P, Laudrat P, Dye D, 2003. Bactéries entéropathogènes isolées des coprocultures en médecine de ville : enquête EPICOP. Réseau Epiville. 1999–2000. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire 8:45-46.
- Wegmuller B, Luthy J, Candrian U, 1993. Direct polymerase chain reaction detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and dairy products. Applied and Environmental Microbiology 59:2161-2165.
- Wehebrink T, Kemper N, grosse Beilage E, Krieter J, 2008. Prevalence of *Campylobacter* spp. and *Yersinia* spp. in the pig production. Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift 121:27-32.
- Weijtens MJ, Bijker PG, Van der Plas J, Urlings HA, Biesheuvel MH, 1993. Prevalence of campylobacter in pigs during fattening; an epidemiological study. The Veterinary Quarterly 15:138-143.
- Weijtens MJ, van der Plas J, Bijker PG, Urlings HA, Koster D, van Logtestijn JG, Huis in't Veld JH, 1997. The transmission of campylobacter in piggeries; an epidemiological study. Journal of Applied Microbiology 83:693-698.
- Weijtens MJB, Reinders RD, Urlings HAP, Van der Plas J, 1999. *Campylobacter* infections in fattening pigs; excretion pattern and genetic diversity. Journal of Applied Microbiology 86:63-70.
- Weijtens MJB, Urlings HAP, Van der Plas J, 2000. Establishing a campylobacter-free pig population through a top-down approach. Letters in Applied Microbiology 30:479-484.
- Whitehouse CA, Balbo PB, Pesci EC, Cottle DL, Mirabito PM, Pickett CL, 1998. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. Infection and Immunity 66:1934-1940.
- Wiesner RS, Hendrixson DR, DiRita VJ, 2003. Natural transformation of *Campylobacter jejuni* requires components of a type II secretion system. Journal of Bacteriology 185:5408-5418.
- Wilson DL, Abner SR, Newman TC, Mansfield LS, Linz JE, 2000. Identification of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* by use of a fluorogenic PCR assay. Journal of Clinical Microbiology 38:3971-3978.
- Wilson N, 2003. Report to the Food Safety Authority of New Zealand: a systematic review of the aetiology of human campylobacteriosis in New Zealand. ESR; 1-107.
- Winquist AG, Roome A, Mshar R, Fiorentino T, Mshar P, Hadler J, 2001. Outbreak of campylobacteriosis at a senior center. Journal of the American Geriatrics Society 49:304-307.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN, Elenitoba-Johnson KS, 2001. Real-time multiplex PCR assays. Methods 25:430-442.
- Wolffs PFG, Glencross K, Norling B, Griffiths MW, 2007. Simultaneous quantification of pathogenic *Campylobacter* and *Salmonella* in chicken rinse fluid by a flotation and real-time multiplex PCR procedure. International Journal of Food Microbiology 117:50-54.
- Wong KH, Skelton SK, Feeley JC, 1986. Strain characterization and grouping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by interaction with lectins. Journal of Clinical Microbiology 23:407-410.
- Wooldridge KG, Ketley JM, 1997. *Campylobacter*-host cell interactions. Trends in Microbiology 5:96-102.
- Wright SL, Carver DK, Siletzky RM, Romine S, Morrow WE, Kathariou S, 2008. Longitudinal study of prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from turkeys and swine grown in close proximity. Journal of Food Protection 71:1791-1796.

- Yan W, Chang N, Taylor DE, 1991. Pulsed-field gel electrophoresis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genomic DNA and its epidemiologic application. *The Journal of Infectious Diseases* 163:1068-1072.
- Yanagisawa S, 1980. Large outbreak of campylobacter enteritis among schoolchildren. *Lancet* 2:153.
- Yang C, Jiang Y, Huang K, Zhu C, Yin Y, 2003. Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 38:265-271.
- Yao R, Burr DH, Doig P, Trust TJ, Niu H, Guerry P, 1994. Isolation of motile and non-motile insertional mutants of *Campylobacter jejuni*: the role of motility in adherence and invasion of eukaryotic cells. *Molecular Microbiology* 14:883-893.
- Young CR, Harvey R, Anderson R, Nisbet D, Stanker LH, 2000. Enteric colonisation following natural exposure to *Campylobacter* in pigs. *Research in Veterinary Science* 68:75-78.
- Yuki N, Takahashi M, Tagawa Y, Kashiwase K, Tadokoro K, Saito K, 1997. Association of *Campylobacter jejuni* serotype with antiganglioside antibody in Guillain-Barre syndrome and Fisher's syndrome. *Annals of Neurology* 42:28-33.
- Zabeau M, Vos P, 1993. Selective restriction fragment amplification : a general method for DNA fingerprinting. European Patent Office Publication 0534858A1.

RESUME

***Campylobacter* chez le porc, méthodes d'identification quantitative et dynamique d'infection**

Les bactéries appartenant au genre *Campylobacter* sont actuellement considérées comme la première cause de maladies infectieuses d'origine alimentaire chez l'Homme dans les pays développés. Les animaux d'élevage, notamment les porcs, constituent des réservoirs de ces bactéries dont ils sont fréquemment porteurs sains. L'objectif de ces travaux est de produire des méthodes et des connaissances permettant d'étudier le portage de *Campylobacter* en élevage porcin. Des techniques de PCR quantitative en temps réel rapides et fiables ont été mises au point pour la détection et la quantification de *Campylobacter spp.*, *C. coli* et *C. jejuni*. Ces méthodes d'identification quantitative présentent l'avantage d'être simples d'utilisation, rapides et applicables directement à des substrats complexes tels que les matières fécales ou les prélèvements environnementaux. La validation de ces techniques était un préalable à l'étude de la cinétique d'excrétion de *Campylobacter* dans les matières fécales de porcs et à l'évaluation de la contamination de l'environnement. Afin de générer des données fondamentales pour pouvoir interpréter les données relevées sur le terrain, des porcs EOPS âgés de sept semaines ont été inoculés expérimentalement avec plusieurs souches de *Campylobacter* d'origine différente, seules ou en association. Cette infection expérimentale a permis de souligner les grandes tendances décrites dans la littérature, à savoir un portage asymptomatique, des niveaux d'excrétion élevés et une légère baisse des quantités excrétées en fin d'engraissement. Elle a également permis de mettre en évidence une intermittence de l'excrétion, une contagiosité de *Campylobacter* avec une transmission rapide à distance aux animaux des cases adjacentes et l'existence d'une interaction spécifique hôte/espèce de *Campylobacter* (effet souche/espèce marqué). Outre ces résultats sur l'étude de la cinétique d'excrétion, elle a permis de calibrer deux méthodes de typage, à savoir la macrorestriction génomique en champ pulsé et la PCR-RFLP sur le gène *flaA*. Une variabilité génomique « *in vivo* » dans l'animal a été mise en évidence avec un effet souche marqué puisque seul *C. coli* d'origine porcine a varié. Les résultats concernant les deux méthodes permettent ainsi d'établir un seuil de similarité entre souches. La dernière étape était l'application de ces méthodes lors d'enquêtes en élevage naisseur-engraisseur pour décrire la contamination de l'environnement et la dynamique d'infection des *Campylobacter* en élevage porcin. Notre étude souligne le rôle de la truie comme source de contamination mais l'environnement est un élément possible de transmission des *Campylobacter* entre les animaux à considérer.

Mots-clés : *Campylobacter*, Porcs, Réaction en chaîne de la polymérase, Variabilité génétique, Epidémiologie moléculaire

SUMMARY

***Campylobacter* in pig, quantitative identification methods and dynamic of infection.**

Campylobacter is a major cause of food-borne infection in developed countries. Pigs are frequently contaminated with *Campylobacter coli*. This work aimed at providing new methods and knowledge to study the carriage of *Campylobacter* in conventional pig herds. *Campylobacter* specific real-time PCR assays developed in this study allow (i) to perform a direct detection of *Campylobacter spp.*, *C. coli* and *C. jejuni* in complex substrates like faeces or environmental samples, (ii) to perform a direct quantification of each target in pig faecal or environmental samples without the need of enrichment, isolation or biochemical tests, and (iii) to obtain a reliable result due to the presence of an internal bacterial control of DNA extraction and PCR amplification. To study excretion in controlled condition, we inoculated *per os* 5.10^7 CFU of *Campylobacter* to specific pathogen-free pigs of 7 weeks old. Three different strains (two *C. coli* strains, one isolated from pigs, the other one from chickens and one *C. jejuni* strain isolated from chickens) were used alone or together for inoculation. Pigs were monitored during 80 days for clinical signs and growth performances. Bacteriological analyses of faeces were also performed. This study underlines the possible experimental infection of young pigs with *Campylobacter*. Moreover, an asymptomatic carriage and a high excretion were observed during the whole trial for pigs contaminated with *C. coli*. There is a transmission between inoculated and «contact» pigs, which are *Campylobacter-free* at the beginning of the study and which live in the same experimental unit. Our results on both contaminated and «contact» pigs are similar to excretion levels observed in the field. The results suggest a specific interaction between the *Campylobacter* species and the host. Moreover, this experimental infection allowed to calibrate two molecular typing methods, namely RFLP-PFGE and *flaA* PCR-RFLP. Variability was evidenced only in pigs inoculated with *C. coli* of porcine origin, either alone or in the mix, or in sham inoculated pigs neighbouring the latter. A discrimination threshold was established with the two methods. Finally, to describe *Campylobacter* infection in commercial pig herds, faecal shedding as well as contamination of pens (either empty or with animals), feed and water were monitored from birth to finishing for pigs, and during one production cycle for sows. Our study underlines the role of the sows as a *Campylobacter* contamination source for their piglets. Nevertheless, the role of the environment in the transmission of *Campylobacter* between animals is important to consider.

Key-Words : *Campylobacter*, Pigs, Polymerase Chain Reaction, Genetic Variability, Molecular Epidemiology
