

Université de Montréal

CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE ET GÉNOTYPIQUE D'ISOLATS DE
CAMPYLOBACTER SPP. ISOLÉS DE POULET DE CHAIR DANS LES
ABATTOIRS DU QUÉBEC

Par
VALÉRIE NORMAND

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise ès Sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

30 novembre 2005

© Valérie Normand, 2005



SF

607

U54

2006

V. 001

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE ET GÉNOTYPIQUE D'ISOLATS DE
CAMPYLOBACTER SPP. ISOLÉS DE POULET DE CHAIR DANS LES
ABATTOIRS DU QUÉBEC

Présenté par

VALÉRIE NORMAND

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dre Josée Harel, présidente-rapporteuse

Dr Sylvain Quessy, directeur de recherche

Dre Martine Boulianne, codirectrice de recherche

Dre Marie Archambault, membre du jury

Mémoire accepté le

SOMMAIRE

Campylobacter est reconnu à travers le monde comme étant un des plus importants genres bactériens pouvant causer des gastro-entérites. L'ingestion ou la manipulation de viande de volaille contaminée par la bactérie sont par ailleurs les plus importants facteurs de risque reliés à ces infections. La colonisation du poulet par *Campylobacter* est bien documentée, la prévalence variant quant à elle selon les pays. La présence de contamination croisée à l'abattoir a été démontrée dans certains pays. Par ailleurs, *Campylobacter* est lui aussi touché par l'émergence de la résistance aux antibiotiques, tel que rapporté par des études européennes. Toutefois, les causes de cette émergence sont encore obscures. Les hypothèses principales de ce projet étaient qu'il existe un lien entre les isolats de *Campylobacter* retrouvés dans les caecums et sur les carcasses de poulet de chair à l'abattoir, et que la présence de résistance aux antibiotiques pourrait être reliée à leur utilisation à la ferme.

Entre avril 2003 et mars 2004, quatre-vingt-deux lots de poulets de chair provenant de 104 producteurs différents ont été échantillonnés dans quatre principaux abattoirs commerciaux du Québec. Un total de 2 372 échantillons a été récolté. Le profil génotypique et la résistance aux antibiotiques (test phénotypique) des isolats provenant des caecums et des carcasses des poulets de 22 de ces lots ont été effectués.

Soixante-neuf pourcent (57/82) des lots de poulets échantillonnés se sont avérés positifs pour *Campylobacter* au niveau des carcasses (environ 30 carcasses par lot). Vingt-cinq pourcent de ces lots ont démontré une prévalence de carcasses positives supérieure à 50%. Au niveau des pools de caecums (environ trois pools de 10 caecums par lot), 27,2% étaient positifs pour la bactérie. Les analyses génétiques ont permis de mettre en évidence une faible diversité au niveau des génotypes isolés d'une carcasse ou d'un pool de caecums donné. Au niveau du lot, jusqu'à quatre profils distincts ont pu être détectés. Par ailleurs, pas moins de 39 génotypes différents ont été mis en évidence pour l'ensemble des 22 lots, carcasses et caecums confondus.

Il a été démontré que les lots abattus de façon consécutive lors d'une même journée d'abattage sont contaminés par des génotypes identiques au niveau des carcasses, laissant présager la présence de contamination croisée. De plus, certains lots non apparentés abattus à des dates et des endroits différents sont contaminés par des génotypes identiques, laissant croire à une source de contamination commune.

Les analyses de résistance aux antibiotiques ont quant à elles permis de détecter un phénotype de résistance à sept antibiotiques différents. Les plus hauts niveaux de résistance ont été détectés pour la bacitracine de zinc, le ceftiofur et la tétracycline. La multi-résistance aux antibiotiques a elle aussi été détectée, certains isolats s'avérant résistants à sept antibiotiques à la fois.

Les liens pouvant être faits entre l'utilisation thérapeutique d'antibiotiques ou à titre de promoteurs de croissance et la présence de résistance aux antibiotiques sont quant à eux très minces. Seule une association entre l'utilisation du ceftiofur et la résistance à cet antibiotique peut être soupçonnée, sans être confirmée puisque 100% des oiseaux ont reçu une injection de cet antibiotique, et que tous les isolats analysés y étaient résistants.

Mots clés : *Campylobacter*, poulet de chair, contamination croisée, abattoir, antibiotiques, résistance, promoteurs de croissance.

SUMMARY

Campylobacter is now recognized as one of the leading cause of gastro-enteritis worldwide. Infections usually occur following ingestion or handling of contaminated or undercooked poultry products. *Campylobacter* is frequently isolated from the normal chicken small intestines and ceca microflora, and gut colonization is well documented. Moreover, many studies in USA and other countries have evaluated the importance of cross-contamination at the slaughterhouse level. However, occurrence and importance of cross-contamination is highly dependant of slaughter practices and may vary from a country to another. Antimicrobial resistance of bacteria is in emergence, and European studies have reported that this increase is also observed for *Campylobacter* recovered from poultry. Hypotheses of this study were that there is a link between *Campylobacter* isolates recovered from chicken carcasses and ceca, that there is a common source of contamination of chicken flocks, and that antibiotic resistance is strongly associated to drug usage at farm level.

Between April 2003 and March 2004, 82 broiler chicken flocks originating from 104 different producers were sampled at four important Quebec commercial slaughterhouses. A total of 2372 samples were analyzed. Genotypes and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from broiler chicken carcasses and ceca of 22 different flocks were characterized.

Sixty-nine percent (57/82) of sampled broiler flocks were *Campylobacter* positive at carcass level (approximately 30 carcasses per lot), with a prevalence of 25% of them higher than 50%, while 27,2% of flocks were *Campylobacter* positive at the pooled ceca level (approximately 3 pools of 10 ceca per lot). Genetic analysis showed weak genotype diversity on a given carcass or in pooled ceca. At flock level, as many as four different profiles were detected. For the 22 flocks under study, 39 unique genotypes were found, regardless of sample source.

Flocks slaughtered consecutively on a same slaughter day showed similar genotypes on their carcasses, which is indicative of cross-contamination at slaughter. Moreover, some unrelated flocks slaughtered on different dates and places were contaminated with related genotypes, which might be indicative of an unknown common contamination source.

Antibiotic resistance analysis led us to detect resistance for seven different drugs. Highest levels of resistance were for zinc bacitracine, ceftiofur and tetracycline. Multi-resistant isolates were also found, with a resistant phenotype for seven different antimicrobials.

No obvious association between drug use at farm level and presence of antimicrobial resistance was found. Since 100% of sampled flocks received ceftiofur, we cannot conclude if resistance to this drug was associated with previous use at hatchery.

Key words: *Campylobacter*, broiler chicken, cross-contamination, slaughter, slaughterhouse, antibiotic, resistance, growth promoters.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
SOMMAIRE.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES.....	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiii
DÉDICACE.....	xv
REMERCIEMENTS.....	xvi
Chapitre 1. INTRODUCTION.....	1
Chapitre 2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	5
2.1 Famille des <i>Campylobacteraceae</i>	6
2.1.1 Historique.....	6
2.2 Le genre <i>Campylobacter</i>	8
2.2.1 Caractéristiques biochimiques.....	10
2.2.2 Méthodes de détection.....	10
2.2.2.1 Échantillonnage.....	12
2.2.2.2 Isolement.....	12
2.3 Identification au genre et à l'espèce.....	15
2.3.1 Utilisation de tests biochimiques.....	15
2.3.2 Méthodes sérologiques.....	16
2.3.3 Méthodes moléculaires.....	18
2.3.3.1 Utilisation des acides nucléiques.....	18
2.3.3.2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)....	18
2.4 Facteurs de virulence.....	19
2.4.1 Mobilité et flagelle.....	20
2.4.2 Interaction avec les cellules de l'hôte.....	21
2.4.2.1 Chimiotactisme.....	21
2.4.2.2 Protéines de la membrane externe.....	21
2.4.2.3 Réarrangement des microtubules et microfilaments de la cellule de l'hôte.....	23
2.4.2.4 Survie intracellulaire.....	23

2.4.3	Capsule, LPS et LOS.....	24
2.4.4	Production de toxines.....	25
2.4.5	Association avec le syndrome de Guillain-Barré.....	26
2.5	Épidémiologie.....	27
2.5.1	Prévalence chez l'humain.....	27
2.5.2	Prévalence chez le poulet à griller.....	30
2.5.3	Transmission horizontale.....	30
2.5.4	Transmission verticale.....	31
2.5.5	Facteurs de risque à l'abattoir.....	33
2.5.6	Contamination croisée à l'abattoir.....	34
2.6	Caractérisation des profils génétiques.....	35
2.6.1	PCR-RFLP.....	36
2.6.2	RAPD.....	37
2.6.3	AFLP.....	37
2.6.4	MLST.....	38
2.6.5	Pulsed-Field Gel Electrophoresis.....	39
2.6.5.1	Instabilité génétique de <i>Campylobacter</i>	43
2.6.5.2	Diversité génétique de <i>Campylobacter</i> chez le poulet à griller.....	45
2.7	Résistance aux antibiotiques chez <i>Campylobacter</i>	46
2.7.1	Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	48
2.7.1.1	Résistance aux fluoroquinolones.....	48
2.7.1.2	Résistance aux MLS _B	50
2.7.1.3	Résistance aux β-lactames et aux céphalosporines.....	52
2.7.1.4	Résistance au chloramphénicol.....	53
2.7.1.5	Résistance aux aminoglycosides.....	53
2.7.1.6	Résistance à la tétracycline.....	54
2.7.1.7	Résistance aux sulphamides.....	55
2.7.1.8	Résistance au triméthoprim.....	55
2.7.1.9	Résistance à la bacitracine.....	56
2.7.2	Utilisation d'antimicrobiens chez la volaille.....	57
2.7.3	Patrons de résistance observés chez <i>Campylobacter</i>	57
Chapitre 3.	Evidence of cross-contamination by <i>Campylobacter</i> spp. of broiler carcasses using genetic characterization of isolates.....	60

Chapitre 4.	Antimicrobial resistance of <i>Campylobacter</i> spp strains isolated from broiler chickens at slaughterhouse, in relation with growth promoters used at farm level in Québec.....	74
Chapitre 5.	DISCUSSION GÉNÉRALE.....	88
5.1	Isolement de <i>Campylobacter</i> à partir de carcasses de poulets à griller à l'abattoir.....	89
5.1.1	Présence de <i>Campylobacter</i> sur les carcasses de poulet à griller à l'abattoir.....	90
5.1.2	Présence de <i>Campylobacter</i> dans les cæcums des carcasses échantillonnées.....	91
5.1.3	Comparaison entre les cæcums et les carcasses pour la présence de <i>C. jejuni</i>	92
5.2	Caractérisation génétique des isolats de <i>Campylobacter</i>	92
5.2.1	Étude de la diversité génétique des isolats de <i>Campylobacter</i> au niveau des carcasses de poulet à griller à l'abattoir, à l'échelle de l'individu.....	94
5.2.2	Étude de la diversité génétique des isolats de <i>C. jejuni</i> retrouvés dans les cæcums de poulets à griller échantillonnées à l'abattoir, à l'échelle de l'individu.....	94
5.2.3	Étude de la variabilité génétique des isolats de <i>C. jejuni</i> retrouvés sur les carcasses de poulets à griller, à l'échelle du lot.....	95
5.2.4	Étude de la variabilité génétique des isolats de <i>C. jejuni</i> retrouvés à l'intérieur des cæcums de carcasses de poulets à griller à l'abattoir, à l'échelle du lot.....	97
5.2.5	Comparaison des souches de <i>Campylobacter</i> retrouvées sur les carcasses et dans les caecums de poulets à griller à l'abattoir.....	98
5.2.6	Présence de contamination croisée entre les carcasses de poulet à griller à l'abattoir.....	98
5.2.7	Existence potentielle d'une source commune de contamination des lots de poulet de chair.....	99

5.3	Résistance aux antibiotiques en lien avec leur utilisation à la ferme.....	100
5.3.1	Résistance aux antibiotiques des souches de <i>Campylobacter</i> retrouvées sur les carcasses et dans les caecums de poulet de chair à l'abattoir.....	101
5.3.1.1	Résistance au ceftiofur en lien avec son utilisation à la ferme.....	102
5.3.1.2	Résistance à la bacitracine en lien avec son utilisation à la ferme	104
5.3.1.3	Résistance à la tétracycline en lien avec son utilisation à la ferme	105
5.3.1.4	Résistance à l'azithromycine, la clindamycine et l'érythromycine en lien avec leur utilisation à la ferme	106
5.3.1.5	Résistance à l'ampicilline en lien avec son utilisation à la ferme	107
Chapitre 6.	CONCLUSIONS.....	108
	BIBLIOGRAPHIE.....	112

LISTE DES TABLEAUX

I	Chronologie de découverte des différentes espèces de <i>Campylobacter</i>	8
II	Principaux tests biochimiques utilisés pour l'identification d'isolats de <i>Campylobacter</i> au niveau de l'espèce.....	11
III	Algorithmes pour l'identification de <i>Campylobacter</i>	17
IV	Prévalence de <i>Campylobacter</i> dans les principaux pays industrialisés	29
V	Critères de Tenover utilisés pour la comparaison des patrons de bandes d'isolats bactériens analysés par PFGE.....	41
VI	Évolution des résistances aux différentes classes d'antibiotiques.....	45
VII	Résistance aux antibiotiques chez <i>Campylobacter</i> tel qu'observé dans divers pays chez le poulet de chair à l'abattoir et/chez le marchand.....	56
VIII	Genotypes of <i>Campylobacter</i> isolates recovered from broiler carcasses and pools of ceca for different broiler flocks and slaughter days in Québec, as obtain by <i>KpnI</i> digestion and PFGE.....	70
IX	Diversity of colonies isolated from broiler chicken carcasses and pools of ceca at slaughter as obtain by PFGE and cut with <i>KpnI</i> restriction enzyme..	72
X	MICs distribution of <i>Campylobacter</i> strains recovered from broiler chicken carcasses at time of slaughter between July 2003 and February 2004, at four big Quebec slaughterhouses.....	85
XI	Antibiotics and growth promoters used at farm level for broiler flocks under study between July 2003 and February 2004.....	86

LISTE DES FIGURES

- 1 Relationships derived of the *KpnI* DNA digestion of *Campylobacter* strains isolated from broiler chicken carcasses and pools of ceca at slaughterhouse...69

- 2 Antibiotic^a resistance of *Campylobacter* strains recovered from broiler chicken carcasses and pools of ceca at time of slaughter in four big Quebec slaughterhouses between July 2003 and February 2004.....84

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AFLP:	Amplified fragment length polymorphism
Ala:	Alanine
Asn:	Asparagine
Asp:	Aspartate
AMPC:	AMP cyclique
AND:	Acide desoxyribonucléique
ARN:	Acide ribonucléique
BB:	Bolton Broth
<i>Bgl</i> I:	Enzyme de restriction <i>Bgl</i> I
CDC:	Center for Disease Control and Prevention
CDT:	Cytolethal distending toxin
CEB :	<i>Campylobacter</i> enrichment broth
CFU :	Colony forming units
CHO:	Chinese hamster ovary cells
CJT:	<i>C.jejuni</i> toxin
CLT:	Cholera-like toxin
CPB:	Concentrated polymyxin B extract
CSM:	Charcoal-based selective medium
CT :	<i>Vibrio cholerae</i> toxin
Fla ou <i>fla</i> :	Protéine ou gène de la flagelline
GBS :	Syndrome du Guillain-Barré
H ₂ O ₂ :	Peroxyde d'hydrogène
H ₂ S:	Sulfide d'hydrogène
<i>Hha</i> I :	Enzyme de restriction <i>Hha</i> I
<i>Hind</i> III :	Enzyme de restriction <i>Hind</i> III
IgG :	Immunoglobuline G
INT-407:	Lignée cellulaire de cellules intestinales humaines (ATCC CCL-6)
kDa:	kilo Dalton
<i>Kpn</i> I:	Enzyme de restriction <i>Kpn</i> I

LOS :	Lipooligosaccharides
LPS :	Lipopolysaccharides
LT :	Heat-Labile toxin
Lys :	Lysine
mCCDA:	modified Cefoperazone Deoxycholate Agar
mO2:	atmosphere microaérophile
MLEE:	Multilocus enzyme electrophoresis
MLS _B :	Macrolides-Lincosamides-Streptogramines de groupe B
MLST:	Multilocus sequence typing
NaCl:	Chlorure de sodium
OD:	Optical density (Densité optique)
OMP:	Outer membrane protein
pb:	Paire de base
PCR:	Polymerase chain reaction
PFGE:	Pulsed-field gel electrophoresis (Électrophorèse à champs pulsé)
PB :	Preston Broth
PBP :	Penicillin binding protein
QRDR :	Région déterminante de la résistance aux quinolones
RAPD:	Random amplified polymorphic DNA
RFLP:	Restriction fragment length polymorphism
S _{AB} :	Coefficient de similarité
<i>SalI</i> :	Enzyme de restriction <i>SalI</i>
SNC :	Système nerveux central
SSM :	Semi solid medium
SSTIII :	Système de sécrétion de type trois
ST :	Séquence typique
Thr :	Thréonine
TSI :	Trypticase Soy Agar
UPGMA :	Unweighted Pair Group with Arithmetic Averages
Vero:	Lignée cellulaire Vero (African green monkey kidney cell)

À Yan, l'amour de ma vie...

À mes parents, pour leur présence et leur patience...

REMERCIEMENTS

La réussite de cette maîtrise de même que l'élaboration de ce mémoire n'auraient pas été les mêmes sans le soutien et l'appui de plusieurs personnes. Je tiens donc à remercier les personnes suivantes :

Mon directeur de recherche, le Dr Sylvain Quessy, pour m'avoir prise sous son aile, pour le support, la confiance témoignée et les sages conseils tout au long de ces deux années,

Ma codirectrice, le Dre Martine Boulianne, pour sa disponibilité, son écoute et son soutien,

L'équipe de la Chaire de Recherche en Salubrité des Viandes, spécialement Isabelle Arsenault, Marie-Lou Gaucher, Sandra Laplante et Geneviève Simard, pour leur amitié et les innombrables, mais combien agréables heures d'échantillonnage,

Julie Arsenault, pour les enrichissantes discussions, les conseils et son ordinateur magique,

Évelyne Guévremont, pour m'avoir fait connaître et apprécier les *Campylobacter*; Ann Letellier et Louise Lessard pour l'aide, les suggestions et les conseils techniques,

Le Dre Sophie Michaud, du Centre Hospitalier de l'Université de Sherbrooke, pour le temps accordé, les conseils et pour m'avoir accueillie quelques temps dans son laboratoire,

Yan, pour sa patience, sa compréhension, et pour être tout simplement là,

Mes parents, ma sœur et mon frère, pour leur support et leurs encouragements.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

Depuis sa découverte vers la fin du 19^e siècle, *Campylobacter* est reconnu comme un important pathogène alimentaire. Retrouvée chez de nombreuses espèces animales, cette bactérie niche principalement chez l'espèce aviaire, où elle est un constituant de la flore bactérienne normale (15, 118, 167). Porté de façon asymptomatique par la volaille, *Campylobacter* est responsable d'infections sporadiques chez l'homme, lesquelles sont la plupart du temps causées par l'ingestion ou la manipulation de viande de volaille contaminée par la bactérie (48). Selon le programme de surveillance des pathogènes alimentaires FoodNet du Center for Diseases Control and Prevention des Etats-Unis (CDC), cette bactérie serait la deuxième plus importante cause de gastro-entérites d'origine bactérienne, derrière *Salmonella* (30).

L'amélioration des techniques d'isolement de la bactérie et des méthodes de caractérisation moléculaires ont permis, au cours des années, de répondre à de nombreuses interrogations face à ce pathogène, notamment au niveau des facteurs de virulence. Toutefois, la cinétique et les causes de la contamination du poulet ne sont encore que partiellement définies. À ce jour, de nombreuses études se sont penchées sur les sources potentielles de la contamination du poulet au niveau de la ferme (118, 157). Deux grandes hypothèses ont été émises par les auteurs de ces études, soit une transmission verticale par le biais des oiseaux reproducteurs, et une transmission horizontale par le biais de l'environnement, d'autres animaux retrouvés à proximité ou d'employés de la ferme.

Il a été démontré par le passé que certains lots de poulet de chair pouvaient demeurer exempts de la bactérie durant toute la durée de l'élevage (170). Il a cependant été démontré que le passage à l'abattoir entraînait souvent une contamination des lots initialement non porteurs de la bactérie (63, 105, 120, 152). Ainsi, les mesures visant à prévenir ou à diminuer la contamination lors de l'élevage s'avèrent inefficaces puisque le passage à l'abattoir semble mener à une contamination des lots non porteurs de la bactérie. Toutefois, de nombreuses hypothèses ont été émises relativement à l'origine clonale des souches de *Campylobacter* colonisant le poulet de chair. Alors que les

résultats de certaines études défendent l'hypothèse qu'il existe une grande diversité au niveau des souches responsables de la colonisation du poulet (105, 120), d'autres croient plutôt en l'hypothèse d'une lignée clonale dominante à travers les lots (114). Toutefois, les sources de cette contamination demeurent encore inconnues. Il devient donc important de tenter de déterminer quelles sont les événements responsables de l'augmentation de la contamination à l'intérieur même des abattoirs, de façon à ce que les mesures de prévention au niveau de la ferme puissent porter fruit.

Malgré le peu de conséquences associées à la présence de *Campylobacter* chez l'espèce aviaire, il en va autrement lorsqu'elle se retrouve dans le tractus gastro-intestinal de l'espèce humaine. En effet, chez l'homme, cette bactérie peut causer des gastro-entérites de gravité variable. Bien qu'habituellement auto-limitantes, elles peuvent aussi être très sévères et récurrentes, et peuvent mener au développement du syndrome de Guillain-Barré (GBS), une condition d'ordre neurologique (48). Lors de gastro-entérites sévères, la prise d'antibiotiques peut être requise afin de réussir à enrayer efficacement l'infection. Cependant, seuls certains antibiotiques sont actuellement disponibles et efficaces contre *Campylobacter* spp. Les principaux utilisés sont ceux appartenant aux classes des fluoroquinolones et des macrolides, respectivement le ciprofloxacine et l'érythromycine (2, 107).

La résistance aux antibiotiques semble à son apogée pour certaines bactéries et *Campylobacter* présente lui aussi certaines résistances. Les sources de la contamination sont variables, la bactérie ayant été retrouvée aussi bien dans des cas d'infection humaine que chez la volaille (11, 38, 43, 49, 50, 55, 128, 196). Bien que les antibiotiques touchés par une résistance varient selon les pays, cette situation demeure un problème pour les autorités médicales qui doivent tenter d'y trouver des solutions.

L'utilisation massive des antibiotiques à titre de promoteurs de croissance en élevage porte quant à elle à réfléchir. Bien que l'utilisation de certains antibiotiques démontre des avantages quant à une meilleure croissance animale liée à une mortalité et un taux de maladie réduites (25), certaines études ont proposé que cette utilisation pourrait être

responsable de l'augmentation de la résistance des bactéries aux antibiotiques utilisés (1, 182). Cependant, l'impact réel sur le développement de résistances est encore peu connu. Chez *Campylobacter*, seules quelques études ont été effectuées à ce sujet (11, 38, 47), mais aucune n'a permis jusqu'à présent d'établir un lien entre le développement de résistance et l'utilisation des antibiotiques à des doses de promoteurs de croissance.

Les hypothèses de ce projet étaient (i) les isolats de *Campylobacter* retrouvés sur les carcasses de poulet de chair à l'abattoir seraient de même lignée clonale que ceux retrouvés à l'intérieur des caecums des oiseaux, (ii) il y aurait présence de contamination croisée à l'abattoir et (iii) l'utilisation d'antimicrobiens à la ferme serait reliée à la présence de résistance à ces antibiotiques chez ce genre bactérien. Cette étude des isolats de *Campylobacter* chez le poulet de chair avait donc pour objectifs 1) d'évaluer la présence et la diversité des isolats de *Campylobacter* retrouvés sur les carcasses et les caecums des poulets de chair, 2) de comparer ces isolats afin de d'établir un lien clonal entre eux, 3) de mettre en évidence la présence de contamination croisée et de détecter une possible source commune de contamination en comparant les isolats de carcasses, 4) de déterminer le niveau de résistance aux antibiotiques à travers les isolats de *Campylobacter* isolés de carcasses et de caecums de poulet de chair et finalement 5) de tenter d'établir un lien entre l'utilisation d'antimicrobiens à la ferme sous forme de promoteurs de croissance et la présence d'antibiorésistance chez les isolats.

CHAPITRE 2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE

2.1 Famille des *Campylobacteraceae*

La famille des *Campylobacteraceae* a vu le jour dans les années 80 suite à une réorganisation de la taxonomie existante. Elle comprend principalement les genres *Campylobacter* et *Arcobacter*, qui sont des voisins phylogénétiques très proches partageant de nombreuses caractéristiques phénotypiques et génotypiques. (183).

Les bactéries appartenant à cette famille sont habituellement des bâtonnets courbés, en forme de S ou spirales et qui ont une taille se situant entre 0.2 à 0.8 μm de large et 0.5 à 5 μm de long (183). Négatives à la coloration de Gram, possédant une mobilité unique conférée par leur unique flagelle polaire (ou au nombre de deux), ces bactéries sont habituellement cultivables sous atmosphère dite microaérophile. L'énergie nécessaire à leur survie leur est conférée grâce au cycle des acides aminés ou des acides tricarboxyliques. Les bactéries de cette famille ne fermentent ni n'oxydent les sucres. Elles sont considérées comme des bactéries commensales ou parasites de l'homme et des animaux domestiques (183).

En 1984, seulement huit espèces et sous-espèces de bactéries faisaient partie du genre *Campylobacter* (112). Grâce à l'intérêt porté à cette bactérie et à l'amélioration des techniques de culture y étant reliées, cette bactérie est rapidement devenue un pathogène reconnu. À partir de cette période, *Campylobacter* a été isolé chez l'humain de même que chez une grande variété d'animaux et d'environnements. À l'heure actuelle, plus de 20 espèces et sous-espèces font partie du genre *Campylobacter*, lequel est reconnu comme l'un des plus grands responsables de toxi-infections alimentaires à travers le monde.

2.1.1 Historique

Il faut remonter à la fin du 19^e siècle pour retracer la première identification probable de *Campylobacter*. À cette époque, Theodor Escherich fit la première description d'une

bactérie spiralée associée au mucus du gros intestin d'enfants morts des suites d'une diarrhée. Malgré son incapacité à faire croître cette bactérie sur milieu solide, son observation au microscope a permis de déterminer qu'il s'agissait de cellules spiralées (183). Ce n'est que cent ans plus tard que cet événement fut révélé à la population scientifique par Kist (85).

En 1913, McFadyean et Stockman décrivent une bactérie spiralée semblable à *Vibrio* isolée à partir d'un fœtus de brebis avorté. Cinq ans plus tard, Smith isola lui aussi une bactérie vrillée, provenant cette fois d'un avortement de bovin. À cause des similarités entre les deux microorganismes, Smith conclut qu'il s'agissait du même type de bactérie, pour lequel il proposa le nom de *Vibrio fetus* (183).

En 1947 *V. fetus* fut isolé par Vinzent à partir d'échantillons sanguins provenant de femmes enceintes souffrant de fièvre d'origine inconnue et ayant par la suite avorté (183). Plus tard, soit en 1959, Florent démontra que des bactéries similaires aux *Vibrios* décrits par McFadyean et Stockman étaient responsables de problèmes de fertilité chez les vaches et les brebis, et d'autres, de problèmes d'avortements. Les *Vibrios* causant les problèmes de fertilité furent nommés *V. fetus* sous-espèce *veneralis*, et ceux causant les avortements, *V. fetus* sous-espèce *intestinalis* (183).

Ce n'est qu'en 1963 que le nom *Vibrio* fut modifié pour celui de *Campylobacter* qui signifie, en grec, bâtonnet recourbé. Ce nouveau nom fut proposé par Sebald et Véron. Ce changement fut apporté à cause des conditions de croissance différentes de la bactérie, soit une atmosphère microaérophile, de même qu'à cause de son faible pourcentage en guanine et cytosine (160) (134).

Durant les années qui suivirent, quelques cas d'infection à *Campylobacter* furent répertoriés. Malgré de nombreuses tentatives pour isoler la bactérie à partir de fèces humaines, ce n'est qu'en 1968 que Dekeyser réussit à isoler la bactérie à partir de fèces d'un patient souffrant de fièvre et de diarrhée sévère (26). De nos jours, *Campylobacter*

est principalement isolé à partir de fèces humaines et animales, et est une cause importante de toxi-infections alimentaires.

Le tableau I permet de visualiser la chronologie des découvertes des différentes espèces faisant partie du genre *Campylobacter* (183).

Tableau I : Chronologie des découvertes de différentes espèces de *Campylobacter*

Année d'apparition	Espèce	Type d'infection
1981	<i>C. concisus</i>	Cavité orale homme
	<i>C. spurotum subsp. mucosalis</i> (devint <i>C. Mucosalis</i>)	Intestins porcins
1983	<i>C. nitrofigilis</i>	Rhizosphère (<i>Spartina alterniflora</i>)
	<i>C. hyalointestinalis</i>	Intestins porcins
	<i>C. laridis</i> (devint <i>C. lari</i>)	Fèces goélands (<i>Larus argentus</i>)
1984	<i>C. pyloridis</i> (devint <i>C. pylori</i>)	Estomac homme
1985	<i>C. cryaerophila</i>	Avortements (bovins, porcs, brebis)
	<i>C. cinaedi</i>	Fèces hommes
	<i>C. fennelliae</i>	Fèces hommes
1989	<i>C. mustelae</i>	Estomac furet

2.2 Le genre *Campylobacter*

Les bactéries appartenant au genre *Campylobacter* sont des bâtonnets Gram négatif spiralés mesurant de 0,2 à 0,8 µm de large et de 0,5 à 5 µm de long. Caractérisées par leur pourcentage en guanine et cytosine se situant entre 29 et 47%, ces bactéries sont asporulées et asaccharolytiques. Elles peuvent également être retrouvées sous forme coccoïde lorsque les cultures sont vieilles ou endommagées par des conditions non favorables à leur croissance (112) (183). Ces conditions non favorables sont une

température inférieure à 30°C, une atmosphère riche en oxygène, de même qu'un pH inférieur à 2,3 (112). La mobilité vrillée de ce genre bactérien lui est caractéristique et conférée par la forme spiralee de la cellule, de même que par le flagelle polaire se situant à une ou aux deux extrémités apicales de la cellule. Toutefois, certaines espèces peuvent être non mobiles (*Campylobacter gracilis*) ou posséder plusieurs flagelles (*Campylobacter showae*) (183). Ce microorganisme est par ailleurs microaérophile et peut croître à des températures variables et aussi élevées que 42°C (ces campylobacters sont dits thermophiles). Il s'agit d'un organisme fastidieux, à croissance lente qui tire son énergie des acides aminés ou des intermédiaires du cycle tricarboxylique (Krebs), mais en aucun cas des carbohydrates (183).

Différentes espèces de *Campylobacter* ont été découvertes à ce jour, et chacune a une spécificité d'hôte qui lui est propre. Chez l'homme, la plus fréquemment retrouvée dans les cas d'intoxications alimentaires est *C. jejuni*. Celle-ci doit son nom à son tropisme tissulaire, soit le jéjunum (183). Cette espèce est également la plus abondamment retrouvée chez la volaille, suivie de *C. coli* et *C. lari*, lesquelles sont plus rarement isolées chez cet hôte. *C. coli* est aussi fréquemment retrouvé chez l'homme et le porc, et s'apparente beaucoup à *C. jejuni* d'un point de vue morphologique et biochimique. *C. lari* fait partie des souches dites résistantes à l'acide nalidixique, et est entre autres caractérisé par son incapacité à hydrolyser l'acétate indoxyle. Cette espèce peut être retrouvée dans le tractus gastro-intestinal des goélands, dans les poissons d'eau douce, les fruits de mer et quelques fois dans les fèces d'hommes diarrhéiques. *C. fetus* est probablement la première espèce de *Campylobacter* à avoir été isolée. Deux sous-espèces y sont rattachées, soit *C. fetus* sous-espèce *fetus*, et *C. fetus* sous-espèce *veneralis*. La première cause des avortements sporadiques chez les brebis et des avortements chez les bovins, et la seconde est responsable d'avortements et d'infertilité chez les bovins. Cette espèce est également fréquemment retrouvée lors d'infections porcines et de temps à autres chez l'homme. *C. upsaliensis*, quoique moins connue, est une espèce entéropathogène chez l'homme. Elle est souvent isolée du sang et de fèces d'humains, mais aussi de chiens et de chats présentant ou non des symptômes (183).

2.2.1 Caractéristiques biochimiques

Campylobacter possède l'enzyme oxydase, et la plupart du temps, l'enzyme catalase lui permettant de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les caractéristiques morphologiques des différentes espèces sont semblables : sur gélose à base de charbon, les colonies sont habituellement plates, irrégulières et grisâtres, pouvant porter un reflet métallique lorsque les nutriments deviennent plus rares. Sur gélose à base de sang, les colonies sont la plupart du temps semblables à des taches d'huile, ou encore petites, rondes et distinctes, habituellement de couleur gris-beige. Afin de pouvoir effectuer une identification à l'espèce, des tests biochimiques sont nécessaires étant donné la similitude des colonies sur géloses. Dans le cas de *C. coli* et *C. jejuni*, seuls les tests d'hydrolyse de l'hippurate et de l'acétate indoxyl peuvent permettre la différenciation; *C. jejuni* étant le seul à dégrader l'hippurate. L'utilisation de tests biochimiques (Tableau II) peut donc permettre de faire une distinction et une identification des différentes espèces existantes (124).

2.2.2 Méthodes de détection

Puisque *Campylobacter* peut être retrouvé chez divers hôtes, différentes techniques ont été mises au point afin de faciliter son isolement. L'échantillonnage effectué en vue de l'isolement est une étape importante lorsque des bactéries provenant d'un site particulier sont convoitées. Il est donc primordial de pouvoir cibler ce site et d'y prélever les bactéries représentatives. Parce que plusieurs genres bactériens peuvent se retrouver à l'intérieur d'un échantillon destiné à l'analyse, il sera par la suite important d'utiliser des milieux d'enrichissement et de culture spécifiques au microorganisme souhaité.

Tableau II : Principaux tests biochimiques utilisés pour l'identification d'isolats de *Campylobacter* au niveau de l'espèce (124)

Espèce	Catalase	Réduction du nitrate	Uréase	H ₂ S (TSI)	Hydrolyse hippurate	Hydrolyse indoxyle acétate		Croissance			Susceptibilité à :		
						25°C	42°C	Glycine (1%)	NaCl (3,5%)	Acide nalidixique	Ceph- Iothine		
<i>C. jejuni</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	V	R
<i>C. jejuni</i> subsp <i>doylei</i>	V	-	-	-	V	+	-	-	V	+	V	S	S
<i>C. coli</i>	+	+	-	V	-	+	-	+	-	+	-	V	R
<i>C. fetus</i> subsp <i>fetus</i>	+	+	-	-	-	-	+	V	-	+	-	V	S
<i>C. fetus</i> subsp <i>veneralis</i>	V	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	V	S
<i>C. lari</i>	+	+	V	-	-	-	-	+	-	+	-	R	R
<i>C. upsaliensis</i>	-	+	-	-	-	+	-	V	-	+	-	S	V
<i>C. hyointestinalis</i> subsp <i>hyointestinalis</i>	+	+	-	+	-	-	V	+	-	+	-	R	V
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsonii</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	-	V	-	R	S
<i>C. lanternae</i>	+	+	ND	-	-	-	-	+	-	-	-	R	R
<i>C. helveticus</i>	-	+	-	-	-	+	-	+	-	V	-	S	S
<i>C. hominis</i>	-	V	ND	ND	-	+	-	-	-	-	-	V	ND
<i>C. mucosalis</i>	-	-	-	+	-	-	-	+	-	V	-	V	S
<i>C. concisus</i>	-	V	-	+	-	-	-	V	-	V	-	V	S
<i>C. curvus</i>	-	+	-	V	V	V	-	V	-	+	-	R	S
<i>C. rectus</i>	V	+	-	-	-	+	-	V	-	+	-	V	S
<i>C. showae</i>	+	+	-	-	-	V	-	V	-	V	-	S	S
<i>C. gracilis</i>	V	V	-	-	-	V	-	V	-	+	-	V	S

Légende : +, réaction positive; -, réaction négative; TSI, triple sugar iron agar; V, réaction variable; ND, indéterminé; S, sensible; R, résistant.

2.2.2.1 Échantillonnage

Puisque *Campylobacter* est habituellement associé aux échantillons alimentaires, et que son hôte le plus fréquent est le poulet, celui-ci est l'un des aliments les plus étudiés pour l'isolement de la bactérie. Les principales méthodes utilisées pour procéder à son échantillonnage sont principalement des frottis des carcasses de poulet destinées à l'analyse, ou un rinçage de la carcasse entière (172), (96) (111). Dans le cas du frottis, il s'agit d'imbiber un coton-tige à l'aide par exemple d'eau peptonée ou d'un bouillon nutritif de base, et d'appliquer une pression ou d'écouvillonner une partie de la carcasse à analyser. Le coton-tige est par la suite incubé directement dans le bouillon dont il était imbibé, et analysé pour détecter la présence de la bactérie.

Pour les rinçages de la carcasse entière, il s'agit de placer la carcasse dans un sac de plastique stérile contenant une certaine quantité de bouillon nutritif ou d'eau peptonée, de refermer le sac et d'agiter le tout pour environ une minute. Il est donc possible, par cette méthode, d'avoir une idée de la population bactérienne de la carcasse entière, contrairement à l'écouvillonnage qui n'est indicatif que d'une petite portion de la carcasse.

Dans le cas d'échantillons fécaux, il s'agit, pour la volaille, de récupérer les fèces se retrouvant dans les caecums des oiseaux et de les analyser en les ensemençant directement sur une gélose sélective. Des milieux d'enrichissement peuvent être utilisés, mais il a été rapporté que cette méthode est moins efficace que l'ensemencement direct des fèces sur une gélose sélective (110).

2.2.2.2 Isolement

Afin de pouvoir déterminer si les aliments ou les animaux sont contaminés ou porteurs de *Campylobacter*, l'isolement de la bactérie doit pouvoir être effectué. Pour ce faire, elle doit être cultivée sur des milieux favorisant sa croissance. Toutefois, étant donné

que *Campylobacter* est un organisme fastidieux qui requiert des conditions de croissance spécifiques, sa conservation pendant de longues périodes sur gélose est plutôt ardue.

Différents milieux de culture sélectifs ou non sélectifs permettant la culture de *Campylobacter* existent à ce jour. Des géloses utilisées de façon routinière, telle une gélose à base de sang (TSA) ou une gélose MacConkey peuvent être utilisées comme milieux non sélectifs. Toutefois, ces milieux ne permettent pas d'inhiber la croissance d'organismes indésirables, et doivent être utilisés préférentiellement lorsque les bactéries sont en culture pure ou proviennent d'environnements stériles tels le sang.

Malgré l'efficacité de ces milieux de culture, l'isolement de *Campylobacter* à partir d'aliments ou d'échantillons environnementaux peut parfois être ardu étant donné que les bactéries s'y retrouvant sont souvent présentes en faibles quantités. Elles peuvent également être altérées par les diverses étapes de production ou par des conditions atmosphériques non favorables à leur métabolisme. Dans ces situations, l'utilisation de milieux d'enrichissement avant la culture sur gélose peut permettre d'augmenter le taux de recouvrement des bactéries.

Plusieurs milieux d'enrichissement sélectifs pour *Campylobacter* existent sur le marché. Ces milieux sont habituellement basés sur l'utilisation d'antibiotiques inhibant le développement de bactéries indésirables, mais permissives à la croissance de *Campylobacter*. Ceux habituellement retrouvés dans les milieux sélectifs pour *Campylobacter* sont le cefoperazone, le cycloheximide, le triméthoprim, la rifampicine, la vancomycine et la polymyxine B (34). Dans le passé, plusieurs combinaisons de conditions de croissance ont été étudiées afin d'augmenter l'efficacité d'isolement de *Campylobacter* : Diverses concentrations et combinaisons d'antibiotiques et d'agents sélectifs, diverses températures d'incubation et ajout de divers agents dans le but de réduire les effets toxiques des dérivés d'oxygènes produits (22), (34, 70).

Suite à ces diverses analyses, des milieux sélectifs ont été développés afin de permettre un taux de recouvrement optimal des cellules endommagées. Ces milieux sont le milieu

Bolton (BB, Oxoid) et le milieu d'enrichissement *Campylobacter* (CEB, LabM), qui font compétition au milieu Preston (PB, Oxoid). Une étude comparative a permis de déterminer que le BB est le milieu permettant d'obtenir la moins grande quantité de faux positifs de même que le milieu d'enrichissement étant le moins inhibiteur pour les différentes souches de *Campylobacter* (14).

Malgré la grande efficacité de ces milieux d'enrichissement, il a été démontré que cette étape diminue le taux de recouvrement de *Campylobacter* dans le cas d'échantillons de fèces (110). Il est alors préférable d'utiliser une méthode d'ensemencement directe des fèces sur gélose sélective afin d'avoir le meilleur taux de détection possible.

Divers milieux sélectifs solides sont disponibles à l'heure actuelle sur le marché. Ceux-ci sont habituellement à base d'agar, sont riches en nutriments, et contiennent certains antibiotiques permettant d'inhiber les entérobactéries indésirables tel *Escherichia coli* et *Pseudomonas* spp. Ils peuvent par ailleurs contenir ou non du sang (13). Les milieux sélectifs les plus connus et les plus couramment utilisés incluent les milieux à base de sang Campy-BAP et Skirrow (163), les milieux à base de charbon tel le Charcoal-cefoperazone-deoxycholate agar (mCCDA) (23), le charcoal-based selective medium (CSM), aussi appelé Karmali (82) et le milieu Campy-Céfex. Un milieu semi-solide (SSM) peut aussi être utilisé (75). Diverses études ont tenté de comparer l'efficacité de ces différents milieux, la plupart obtenant des résultats similaires. Une étude du groupe de Korhonen a démontré que le milieu Skirrow avait une sélectivité plus faible et un moins bon taux d'isolement que le milieu mCCDA (91). Ils ont également observé que la période d'enrichissement préalable n'affecte pas la fréquence d'isolement, mais que son augmentation favorise la croissance de contaminants. Bien que certaines études soutiennent qu'il n'y a pas de différence entre l'efficacité des milieux Campy-Céfex, mCCDA et CSM (161), la majorité des études publiées soutient le contraire. En effet, Entz et collaborateurs ont démontré que les milieux CSM et mCCDA sont les plus sélectifs, et que les milieux Skirrow et Campy-BAP sont les plus inhibiteurs pour l'isolement de *Campylobacter* (42). Selon une étude similaire, les milieux les plus efficaces pour l'isolement de *Campylobacter* à partir d'échantillons de fèces seraient les

milieux CCDA et Karmali (ou CSM), tous deux permettant de diminuer au maximum la présence de flore indigène (61).

2.3 Identification au genre et à l'espèce

Tel que mentionné précédemment, *Campylobacter* est un organisme fastidieux qui nécessite des conditions spécifiques de croissance. Bien qu'il puisse être possible de l'identifier au moyen de tests biochimiques (phénotypiques), des techniques sérologiques, de caractérisation des acides gras de même que des techniques moléculaires d'identification peuvent être utilisées et sont de plus en plus populaires.

2.3.1 Utilisation de tests biochimiques

Il existe de nombreuses techniques d'identification phénotypique de *Campylobacter*. La plus connue demeure l'exécution de divers tests biochimiques successifs permettant, à l'aide des résultats obtenus, d'associer la bactérie obtenue à une espèce connue ayant le même profil biochimique. Ceci est souvent réalisé au moyen de tableaux de référence tel celui représenté au tableau II, où les résultats sont présentés qualitativement. Cette méthode comporte cependant des problèmes majeurs, tel que son manque de standardisation et d'objectivité (124). En effet, le résultat d'un test donné et son interprétation peuvent être influencés par la méthodologie utilisée, qui peut varier d'un manipulateur à l'autre et d'un laboratoire à l'autre. Ainsi, le niveau d'efficacité relié à l'utilisation de tables d'identification devient questionnable. Le manque d'objectivité se présente pour sa part dans les cas où une souche rare ou nouvelle se présente au manipulateur, ou lorsque des résultats non attendus se présentent à l'observateur. Par exemple, une souche de *C. jejuni* qui possède la caractéristique de ne pas dégrader l'hippurate. Il devient donc évident que cette méthode ne tient pas compte des souches mutantes ou atypiques dans son identification.

Certaines solutions ont été apportées au problème de l'identification phénotypique, tel l'utilisation de logiciels informatiques ou de matrice de probabilités comme celle

retrouvée au tableau III. Grâce à cette méthode, il est possible d'effectuer l'identification d'un isolat à une espèce donnée lorsque la probabilité des tests effectués excède 90% (124).

2.3.2 Méthodes sérologiques

Deux méthodes ayant été très utilisées par le passé et qui le sont encore peuvent être utilisées pour le sérotypage des bactéries du genre *Campylobacter* : la méthode de Penner et la méthode de Lior. La première est basée sur la présence d'antigènes solubles stables à la chaleur tandis que la seconde détecte les antigènes sensibles à de hautes températures. La technique de Penner utilise une hémagglutination passive, les antigènes y étant utilisés étant les lipopolysaccharides (LPS) de *C. jejuni*. Bien que ces méthodes soient efficaces, de nombreuses souches demeurent non caractérisées suite à leur emploi (20% des souches). Ceci peut s'expliquer par le fait que les antisérums utilisés ont été développés à partir des souches qui étaient communes dans les années 1980, et que les souches retrouvées actuellement ont évolué génétiquement et possèdent des antigènes de surface différents. (119).

D'autres tests sérologiques d'identification spécifiques à *Campylobacter* sont également disponibles. Ceux-ci utilisent des anticorps spécifiques aux antigènes cellulaires de *Campylobacter*. La technique la plus couramment employées est la technique d'agglutination où des particules de latex sont couplées à des immunoglobulines spécifiques soit à certaines espèces de *Campylobacter*, à certains sérotypes ou encore à des antigènes flagellaires de *C. jejuni* (124). Ces techniques peuvent être utiles pour un diagnostic rapide, mais la possibilité d'obtention de faux positifs demeure toujours présente.

Toutes ces méthodes immunologiques ont l'avantage d'être peu coûteuses et facilement réalisables dans une perspective de diagnostic de routine. Cependant, des analyses relatives aux possibles réactions croisées entre les antigènes des diverses souches restent encore à être effectuées.

Tableau III : Matrice de probabilités pour l'identification de *Campylobacter* (124)

Espèce	Pourcentage de souches positives pour les caractéristiques données (%) ^a													
	Croissance :										Résistance à :			
	Oxi-dase	Catalase	Hydrolyse hippurate	Uréase	Réduction sélénite	H ₂ S/TSI	Indoxyle acétate	O ₂ 25°C	O ₂ 37°C	Milieu min.	mO ₂ (37°C)	Céfoperozone (64mg/l)	Acide nalidixique	Cephalothine
<i>C. coli</i>	99	99	01	01	99	01	99	01	99	99	99	01	01	99
<i>C. concisus</i>	57	01	01	01	24	05	01	01	99	01	99	01	71	01
<i>C. fetus subsp fetus</i>	99	99	01	01	88	01	01	01	01	50	99	99	99	01
<i>C. fetus subsp venerealis</i>	99	87	01	01	07	01	01	01	01	87	99	07	67	01
<i>C. gracilis</i>	99	29	01	01	01	01	71	01	01	29	01	01	57	01
<i>C. hyointestinalis subsp hyointestinalis</i>	99	99	01	01	99	91	01	01	01	18	99	09	99	18
<i>C. jejuni subsp doylei</i>	99	70	99	01	01	01	99	01	01	01	99	10	01	01
<i>C. jejuni subsp jejuni</i>	99	99	99	01	70	01	99	01	01	10	99	99	01	95
<i>C. lari</i>	99	99	01	64	50	01	07	01	01	01	99	99	29	99
<i>C. rectus</i>	80	99	20	01	01	01	99	01	01	01	01	01	80	01
<i>C. upsaliensis</i>	01	99	01	01	99	01	99	01	01	01	99	11	01	11

^a mO₂, atmosphère microaérophile; TSI, Triple Sugar Iron Agar

2.3.3 Identification par le biais de méthodes moléculaires

2.3.3.1 Utilisation des acides nucléiques

L'utilisation d'amorces spécifiques à des séquences d'acides nucléiques est une technique d'identification de *Campylobacter* très prometteuse. La stabilité relative de l'ADN chromosomique et la composition de l'ARN ribosomal; sont en effet des bases idéales pour la mise au point de tests d'identification spécifiques et précis (124). La rapidité et l'efficacité d'identification des campylobacters sont parmi les principaux avantages de cette technique. Toutefois, ces méthodes sont relativement coûteuses et requièrent un équipement spécialisé de même qu'un personnel qualifié (124). Par ailleurs, la sensibilité des sondes actuellement disponibles sur le marché semble varier quelque peu (124).

2.3.3.2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Le PCR est disponible pour l'identification de *Campylobacter* au niveau de l'espèce. Initialement utilisée dans une optique de diagnostic, cette technique est de plus en plus utilisée dans un but d'identification à l'espèce. Sa principale fonction est alors d'amplifier de façon spécifique des séquences d'ADN ou d'ARN choisies. Ces séquences sont la plupart du temps propres à l'espèce ciblée, permettant ainsi l'identification. Depuis que les séquences des ARNr 16S et 23S sont connues et disponibles, ces dernières sont grandement utilisées pour l'identification de bactéries, notamment, *Campylobacter* (79).

Au niveau de l'ADN, les principales amorces qui permettent de détecter la présence de *C. coli* et *C. jejuni* sont des régions conservées du gène *flaA* (codant pour la flagelline) (127) ou le gène *mapA*, qui code pour une protéine de la membrane externe (173). Plus récemment, un PCR multiplexe a été mis au point pour l'identification des espèces *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* et *C. fetus* subsp *fetus* (186). Les gènes ciblés par ce PCR sont *hipO* (*C. jejuni*), *glyA* (*C. coli*, *C. lari* et *C. upsaliensis*) et *sapB2* de *C. fetus*

subsp *fetus* (186). L'amplification de ces gènes donnant des fragments de différentes tailles, il devient facile d'effectuer l'identification à l'espèce par le biais d'un seul test.

Des PCRs quantitatifs sont aussi disponibles pour la détection de *Campylobacter* thermotolérants (*C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*) (79), (154). Cette technique permet de détecter et de mesurer l'accumulation de produits PCR durant le processus d'amplification, et donc, de l'ADN présent. À l'aide de courbes standards préalablement établies, il devient ainsi possible d'estimer le niveau de bactéries présent au niveau d'un échantillon donné. Cette méthode d'identification se révèle donc être une méthode sensible et robuste, à la fois la détection et la quantification de bactéries contenues dans les échantillons destinés à l'analyse. L'analyse bactériologique peut idéalement être effectuée en parallèle afin de déterminer la viabilité des bactéries et de confirmer le résultat du PCR.

2.4 Facteurs de virulence

C. jejuni et *C. coli* sont d'importants responsables de toxi-infections alimentaires bactériennes à travers le monde, dépassant en fréquence les cas causés par *Salmonella* pour l'année 2000 aux États-Unis (30). Les symptômes les plus souvent associés aux infections causées par *Campylobacter* sont une forte diarrhée qui peut être aqueuse et parfois même sanguinolente, accompagnée de crampes abdominales sévères, de maux de tête et de fièvre. *Campylobacter* peut aussi causer des atteintes extraintestinales telles arthrite, méningites, appendicites, infections du tractus urinaire et désordres du système nerveux (syndrome de Guillain Barré (GBS), syndrome de Miller-Fisher) (37, 112) (107). Cependant, puisque le site principal d'infection est le tractus gastro-intestinal, la bactérie doit posséder divers mécanismes de virulence afin d'une part de le coloniser, et d'autre part, atteindre les sites d'infection secondaires, et c'est grâce à ses nombreux facteurs de virulence que la bactérie pourra y arriver.

2.4.1 Mobilité et flagelle

La capacité que possède *Campylobacter* de causer des infections au niveau du tractus gastro-intestinal chez l'homme et certains autres mammifères repose sur l'existence de certains facteurs de virulence. L'un des plus importants demeure sans contredit le flagelle bactérien, de par la mobilité qu'il confère à la bactérie. Le flagelle de *Campylobacter* est polaire, dénudé et se retrouve seul ou au nombre de deux à l'une ou aux deux extrémités apicales de la cellule. La mobilité produite est particulière et donne l'impression d'une vis sans fin, ce qui, ajouté à la forme recourbée de la bactérie, augmente son efficacité de déplacement dans les substances visqueuses telle la couche de mucus recouvrant le petit et le grand intestin (200) (84).

Le flagelle de *Campylobacter* est composé de deux protéines principales, soit la sous-unité majeure FlaA et la sous-unité mineure FlaB (68), (59). La première est retrouvée en plus grande proportion et joue un rôle déterminant dans l'invasion des cellules (84). En effet, l'invasion et la mobilité de la bactérie sont diminuées lorsque la protéine FlaA n'est pas exprimée (200) (59). Les gènes codant pour ces sous-unités, respectivement *flaA* et *flaB* sont arrangés en tandem dans le génome. Ils sont sous le contrôle de deux promoteurs distincts (59) et partagent une identité de séquence de 91,9% (59) (84). Il a par ailleurs été démontré qu'un flagelle composé uniquement de la sous-unité FlaA présente une longueur et une forme similaire au flagelle d'une souche sauvage de *Campylobacter* et ce, sans que la mobilité n'en soit affectée. Un flagelle composé uniquement de la sous-unité FlaB est quant à lui plus court et non fonctionnel. (59); (113) (84).

En plus d'être important pour la mobilité, le flagelle est aussi impliqué dans le phénomène de colonisation et d'invasion des cellules de l'hôte. En effet, il a été démontré que des mutants ne possédant pas ou ne possédant qu'en partie le flagelle étaient incapables de coloniser le tractus gastro-intestinal de poulets inoculés par voie orale (113). Il a également été établi que la sous-unité FlaA est nécessaire à l'invasion des cellules épithéliales intestinales (191) (57).

2.4.2 Interaction avec les cellules de l'hôte

2.4.2.1 Chimiotactisme

L'interaction entre la bactérie et les cellules de l'hôte est possible grâce à l'existence de certains facteurs de virulence. Ils peuvent être situés à la surface de la bactérie ou encore être sécrétés par cette dernière. Suite à cette interaction, il y aura adhésion puis invasion des cellules. Chez *Campylobacter*, la présence de chimiotactisme positif pour le carbohydrate L-fucose, les acides aminés L-aspartate, L-cystéine, L-glutamate, et L-sérine contenus dans le mucus de l'intestin a été mise en évidence (17, 69, 84, 99). Contrairement au mucus, la bile et ses composés auraient un effet de répulsion sur la bactérie (84). Il a été démontré par certaines études que le chimiotactisme de *Campylobacter* serait principalement codé par les gènes *cheY* et *cheA* (201), (99). Ces gènes coderaient pour deux protéines, CheA et CheY, des composantes majeures menant au processus de chimiotaxie. Par ailleurs, il a été démontré que des souches de *Campylobacter* mutantes pour ces gènes sont incapables de coloniser les intestins de modèles animaux, confirmant l'importance de ce mécanisme lors de la colonisation intestinale(175).

2.4.2.2 Protéines de la membrane externe

Tout comme les autres bactéries négatives à la coloration de Gram, *Campylobacter* possède certaines composantes typiques au niveau de sa membrane externe, tels des protéines, lipoprotéines et lipopolysaccharides. Elle dispose entre autres d'une protéine de liaison à la fibronectine, CadF, qui serait nécessaire dans les processus de liaison aux cellules épithéliales intestinales (88) (17). Cette protéine de la membrane externe (OMP) a un poids moléculaire de 37kDa (88) et elle agirait de concert avec une seconde OMP ayant un poids moléculaire de 59kDa (108). L'interaction entre ces protéines et la fibronectine de l'hôte aurait comme principal effet d'amplifier l'internalisation de la bactérie (16). Toutefois, l'internalisation complète nécessiterait également un réarrangement des microtubules et des microfilaments de la cellule hôte (20, 106). La

protéine CadF serait en outre requise pour la colonisation du tractus intestinal de poussins, un mutant dépourvu de la protéine ne possédant pas cette capacité (204)

Une autre protéine bactérienne impliquée dans l'invasion des cellules de l'hôte est Cia, une protéine d'environ 73 kDa qui présenterait des similarités avec les protéines faisant partie des systèmes de sécrétion de type III (SSTIII). Cette protéine est entre autres similaire (40 à 45% d'homologie de séquence) aux protéines SipB de *Salmonella typhimurium*, YopB de *Yersinia sp* et IpaB de *Shigella flexneri* (68, 89). Ces protéines retrouvées dans le SSTIII forment des pores lors du contact avec la membrane de la cellule hôte (158) (83). La mutation du gène *ciaB* codant pour cette protéine a permis de déterminer que les mutants obtenus étaient moins invasifs et n'avaient plus la capacité de sécréter des protéines, ce qui pourrait indiquer que cette protéine est requise dans ce processus. (89). Il a également été démontré par cette équipe de chercheurs que CiaB serait sécrétée à l'intérieur des cellules, ce qui pourrait laisser croire à l'existence d'un SSTIII. Ce dernier serait principalement exprimé lors de contact avec la cellule hôte (68).

Une protéine intracellulaire découverte récemment, Cjp29, semble elle aussi impliquée dans le mécanisme d'invasion. Afin de pouvoir interagir avec la cellule hôte, cette protéine doit être sécrétée, ce qui pourrait être possible grâce à un système de sécrétion de type IV (16).

PEB 1, PEB 2, PEB 3 et PEB 4 sont également des OMP ayant été découvertes au cours des dernières années (132). Des analyses d'homologie de séquences ont permis de démontrer que les OMP de type PEB seraient situés dans la membrane externe, et que PEB 1 serait une protéine de liaison périplasmique faisant partie d'un système de transport ABC pour les acides aminés (131).

2.4.2.3 Réarrangement des microtubules et des microfilaments des cellules de l'hôte

Le rôle des microtubules et/ou des microfilaments de la cellule hôte dans le processus d'invasion a été mis en évidence. En effet, l'internalisation de la bactérie impliquerait le réarrangement du cytosquelette de l'hôte, ce qui résulterait en la formation d'une structure endocyttaire permettant à la bactérie de pénétrer à l'intérieur de l'hôte. Selon le type cellulaire et la souche de *Campylobacter* en cause, les microtubules et/ou les microfilaments pourraient être impliqués (68) (20, 90). Lors du processus d'invasion, il y aurait d'abord contact avec la cellule hôte via la formation par cette dernière d'extensions membranaires basées sur la présence de microtubules. Par la suite, il y aurait association entre la bactérie internalisée et les microtubules, ce qui se traduirait par un transport de la bactérie de l'extérieur de la cellule vers la région périnucléaire (106).

2.4.2.4 Survie intracellulaire

Les mécanismes reliés à la survie de *Campylobacter* à l'intérieur de la cellule hôte demeurent encore mystérieux, mais il semble que l'enzyme superoxyde dismutase éliminerait les radicaux superoxydes, protégeant ainsi la bactérie des dommages oxydatifs (68). Il semble par ailleurs que la protéine SodB soit un élément important permettant la survie intracellulaire de la bactérie, les mutants *sodB* de la souche *C. jejuni* 81 176 démontrant une survie intracellulaire beaucoup moins prononcée (68).

En plus d'envahir les cellules de l'hôte, *Campylobacter* a la capacité de traverser la monocouche de cellules de l'intestin, passant du côté apical au côté basal. Les cellules humaines de carcinome de colon (CaCo-2) sont dotées d'un côté apical et d'un côté basal de même que de jonctions serrées, caractéristiques qui sont similaires à celles des cellules épithéliales intestinales. Par ailleurs, les cellules CaCo-2 possèdent une bordure en brosse semblable à celle retrouvée au niveau de l'intestin. Il a donc été possible d'observer, à l'aide de cette lignée cellulaire (CaCo-2), que *C. jejuni* a la capacité de

passer du côté apical au côté basal et ce, sans altérer les jonctions serrées et la polarisation des cellules (45). Par ailleurs, il semble que *C. jejuni* traverse la monocouche de cellules protégé à l'intérieur d'une vacuole.

2.4.3 Capsule, LPS et LOS

Ce n'est que récemment que l'existence d'une capsule chez *Campylobacter* a été proposée. Bien qu'encore controversée, sa présence a été rapportée par microscopie électronique (81). Cette capsule polysaccharidique, comme celle de nombreuses autres bactéries, pourrait faciliter la survie des bactéries se retrouvant dans des conditions hostiles de croissance. Il semble par ailleurs que les bactéries encapsulées privilégieraient une forme coccoïde.

Tout comme certaines autres bactéries négatives à la coloration de Gram, *Campylobacter* possède à sa surface des lipopolysaccharides (LPS) et des lipooligosaccharides (LOS) qui ont un rôle important dans la pathogénie et la virulence de la bactérie. Ils servent entre autres de molécules d'adhésion au mucus de l'hôte et ils possèdent des sites de liaison pour les anticorps et les facteurs sériques. Ils ont également une propriété endotoxique qui participe à la virulence de la bactérie. Il a été démontré que la composition des LPS était un déterminant important dans la sensibilité au sérum des campylobacters. (135) (68).

Par ailleurs, chez certains sérotypes de *C. jejuni*, la sialylation du résidu galactose se trouvant au niveau du corps terminal de l'oligosaccharide peut mener à un mimétisme de certains gangliosides de l'homme (GM₁, GD_{1a}, GD₃ et GT_{1a}) (68, 133). Les anticorps produits chez l'hôte contre ces molécules peuvent mener à une réaction auto-immune qui serait la cause principale du Syndrome de Guillain-Barré (GBS), un désordre du système nerveux central pouvant survenir suite à la diarrhée causée par *C. jejuni* (68).

2.4.4 Production de toxines

Tout comme la présence de capsule, la production de toxines par *Campylobacter* demeure un sujet controversé. Malgré qu'un certain nombre de toxines ait été proposé, leur mécanisme d'action nécessite encore des éclaircissements. Deux types principaux de toxines existent, soit les entérotoxines, qui jouent un rôle sur le niveau d'AMP cyclique (AMPc) relâché, et les cytotoxines, qui ont un effet létal sur les cellules cibles.

Chez *Campylobacter*, la production d'une entérotoxine a été proposée pour la première fois en 1983 par l'équipe de Ruiz-Palacios qui observa une augmentation de la quantité d'AMPc intracellulaire de même qu'une élongation des cellules CHO mises en présence de la bactérie (155) (190). L'activité entérotoxique fut confirmée par la suite par de nombreux chercheurs (46) (102), (87), et cette toxine fut nommée CJT (*C. jejuni* toxin). Elle devint par la suite « CLT » pour Choléra-Like Toxin (190). Comme cette toxine réagissait en présence d'anticorps anti-LT (*Escherichia coli* Heat-Labile toxin) et anti-CT (*Vibrio cholerae* toxin), des homologies avec ces toxines lui furent attribuées (190). Toutefois, les auteurs ne s'entendent pas sur les propriétés de cette entérotoxine de *Campylobacter* (184).

Les suggestions relatives à l'activité de la toxine proposées par diverses équipes sont qu'une protéine de 68 ou 70 kDa a la capacité de lier les gangliosides GM₁, que cette protéine produirait une réaction croisée lorsque mise en présence d'anti-sérum dirigé contre LT ou CT, qu'elle serait toxique pour les cellules CHO et Y-1 et qu'elle pourrait causer une sécrétion de liquide dans l'iléum (86). Cependant, malgré la réaction croisée se produisant entre CJT et des anticorps spécifiques à CT ou LT, peu d'homologie a été détectée au niveau de l'ADN entre les gènes codant pour ces toxines (32).

L'existence et la fonction des cytotoxines sont moins controversées que celles des entérotoxines. La principale cytotoxine reconnue est la Cytolethal Distending Toxin (CDT). Cette dernière a été décrite pour la première fois en 1988 par Johnson et Lior et fut alors nommée CytoLethal Distending Toxin (CLDT) (77). Ils notèrent que cette

toxine avait la capacité de causer un allongement puis la mort des cellules Hela, CHO, Hep-2 et Vero. Elle produit également une augmentation de la production d'AMPc intracellulaire (190). Cette toxine a la particularité de causer un arrêt du cycle cellulaire en phase G2 et de provoquer la mort des cellules sensibles (93) (140). Elle serait composée de trois protéines distinctes, soit CdtA, CdtB et CdtC (141), qui formeraient un complexe nécessaire à son activité (93). Lorsqu'utilisées individuellement, ces sous-unités n'ont aucun effet toxique sur les cellules, la toxine n'étant complètement active que lorsque les trois sont présentes (93). Le rôle de la toxine CDT dans la pathogénie de la bactérie demeure encore peu connu, mais cette toxine pourrait potentiellement être une des causes de la diarrhée associée aux infections par *Campylobacter*. En effet, cette toxine est active sur les cellules Caco-2 lesquelles ressemblent grandement aux cellules épithéliales intestinales humaines. Comme la toxine bloque leur développement en phase G2 de croissance, il se pourrait qu'un phénomène similaire se produise sur les cellules épithéliales intestinales humaines. Il y aurait alors possiblement érosion de la couche épithéliale intestinale normale, menant à la diarrhée observée (140).

2.4.5 Association avec les syndromes de Guillain-Barré et Miller-Fisher

Bien que rare, le syndrome de Guillain-Barré (GBS) se présente comme une réaction auto-immunitaire contre certaines composantes du système nerveux central (SNC) (198). Les symptômes apparents sont une certaine faiblesse ou des picotements au niveau des membres inférieurs qui peuvent s'étendre aux bras et aux parties supérieures du corps. Dans de nombreux cas, les symptômes peuvent augmenter en intensité, les muscles ne pouvant alors plus être utilisés, et le patient ressentant une paralysie partielle (178). Il arrive fréquemment que les symptômes de cette maladie se présentent suite à une infection gastro-intestinale bactérienne ou virale, une chirurgie, une immunisation, un lymphome ou une exposition à des toxines.

Les causes menant à ce désordre ont longtemps été étudiées, et certaines études ont émis l'hypothèse que les infections causées par *Campylobacter jejuni* pourraient être reliées

au syndrome de Guillain-Barré (GBS). En effet, de nombreux patients atteints du GBS avaient des antécédents de gastro-entérites causées par *C. jejuni*. L'hypothèse la plus plausible serait qu'en présence de *Campylobacter*, il y aurait production par l'hôte d'anticorps réagissant avec les gangliosides GM₁ de *C. jejuni*. Ceux-ci étant grandement homologues à ceux retrouvés chez l'homme, il y aurait réaction croisée entre les anticorps spécifiques pour *C. jejuni* et les gangliosides du soi (178).

Le syndrome de Miller-Fisher, un variant très rare du syndrome de Guillain-Barré, est un désordre secondaire à ce dernier. Il est caractérisé par une ophtalmoplégie, une ataxie et une aréflexie. Durant la phase aigue de la maladie, les anticorps IgG dirigés contre le ganglioside GQ1b (situé principalement dans les nerfs moteurs oculaires) sont retrouvés chez 90% des patients atteints. Tout comme pour le GBS, il y a mimétisme moléculaire entre les épitopes de myéline de l'hôte et ceux de *C. jejuni*, ce qui conduit à une réaction auto-immunitaire (117)

2.5 Épidémiologie

2.5.1 Prévalence chez l'humain

Chez l'homme, *Campylobacter* est généralement responsable d'infections sporadiques. La dose infectieuse est pour sa part assez faible, certaines études rapportant qu'aussi peu que 500 microorganismes causeraient la maladie (153). Des études plus récentes rapportent quant à elles qu'entre 800 et 10⁶ microorganismes seraient nécessaires à son développement (21). Toutefois, bien que fortes en désagréments, les campylobactérioses ne sont que très rarement mortelles, le taux de décès rapporté aux États-Unis n'étant que de 0,05% en 1998 (48).

Deux grandes catégories de patrons d'infections peuvent être identifiées : les épidémies et les infections sporadiques, également associées à des sources quelque peu différentes. Lorsqu'il est question d'épidémies, les responsables sont souvent l'eau contaminée, à l'échelle par exemple d'un réservoir municipal, et le lait non pasteurisé ou contaminé.

La consommation de poulet contaminé, cru ou insuffisamment cuit a aussi été rapportée comme cause importante lors d'épidémies (48).

Cependant, les épidémies ne comptent que pour un faible pourcentage des infections rapportées, les cas sporadiques de campylobactérioses étant beaucoup plus fréquents. Des études cas-contrôle effectuées dans plusieurs pays ont permis de déterminer que les principales sources d'infections sporadiques sont l'ingestion ou le contact de poulet contaminé, la transmission par le biais d'animaux domestiques et d'autres animaux, de même que l'ingestion d'eau contaminée (48). *Campylobacter* peut également être associé à des cas de diarrhée du voyageur, les causes étant également l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés.

De même, des études rapportent que certaines périodes de l'année seraient plus propices aux gastro-entérites d'origine alimentaires, notamment la période estivale (48). Une étude effectuée en 2002 au Royaume-Uni par l'équipe de Meldrum (103) a permis de mettre en évidence une augmentation des cas rapportés chez l'humain en début juin. Cette étude portait également sur la prévalence de *Campylobacter* chez le poulet au détail, où la plus forte prévalence a été rapportée pour la fin du même mois. Ceci pourrait donc indiquer que l'augmentation des cas de gastro-entérites en période estivale ne serait pas reliée directement à la consommation de poulet contaminé, du moins au Royaume-Uni (103). Il a même été suggéré par cette étude qu'une source commune de contamination pourrait être reliée à la fois aux infections de l'homme et à la contamination du poulet, comme par exemple un réservoir environnemental quelconque. Fait à noter, des résultats similaires avaient été obtenus au Danemark et en Suède (48).

Les infections à *Campylobacter* touchent des catégories d'âge particulières, soit les enfants de moins de deux ans et les personnes âgées entre 15 et 44 ans, celles-ci étant la plupart du temps de sexe masculin (48). L'incidence des infections causées par *Campylobacter* est très variable selon les pays. Ceci peut s'expliquer par les variations existant dans les systèmes de production et de transformation alimentaire, de même que par les pratiques de consommation de la nourriture. Par ailleurs, les systèmes de

surveillance de ces infections ne sont pas au point dans tous les pays, et ce ne sont pas tous les cas de gastro-entérites qui sont rapportés par la population, d'où les variations observées.

Aux États-Unis, le CDC rapportait une fréquence des campylobactérioses de 21,7/100 000 habitants en 1998 (48) et de 12,6 par 100 000 habitants en 2004 (30). Au Canada, la fréquence moyenne des gastro-entérites causées par *Campylobacter* se situait, pour l'année 1995 à 46,2 par 100 000 habitants, et à 26,9 par 100 000 habitants pour 1999 (159). Toutefois, pour estimer l'incidence réelle pour ces années, les cas non rapportés devraient aussi être considérés. Un phénomène semblable se produit pour les cas de salmonelloses, et pour cette bactérie, un coefficient de 37,7 est utilisé afin d'avoir une estimation plus réelle des cas ayant eu lieu. En appliquant ce coefficient de correction à *Campylobacter*, l'incidence annuelle grimperait à environ 2,4 millions de cas, ce qui démontre l'impact important de la bactérie du point de vue santé publique (48). Le tableau IV présente l'incidence la plus récente des cas de campylobactérioses répertoriés pour certains pays industrialisés.

Tableau IV: Prévalence de *Campylobacter* dans les principaux pays industrialisés

Pays	Cas 100 000 habitants	Année	Source
Angleterre	104,9	1999	Epi-Insight
Australie	118	2000	Communicable Diseases - Australia
Autriche	42,8	2000	World Health Organisation
Canada	26,9	1999	Santé Canada
Danemark	78	1999	National surveillance of communicable diseases
États-Unis	12,9	2004	CDC
Irlande	34	2003	Communicable Disease Surveillance Center
Suisse	109	2000	Office Fédéral de la Santé Publique

2.5.2 Prévalence chez le poulet à griller

L'espèce aviaire, contrairement à l'espèce humaine, semble être une porteuse asymptomatique de *Campylobacter*. La bactérie colonise principalement la couche de mucus des cellules épithéliales, habituellement dans la partie inférieure du tube digestif des oiseaux, soit dans les caecums et le cloaque (4, 118) (157). Elle peut aussi parfois nicher dans le petit intestin, et plus rarement dans le foie, la rate et la vessie. La prévalence varie avec l'âge des oiseaux, ceux-ci étant rarement colonisés avant l'âge de deux à trois semaines, probablement à cause des anticorps maternels retrouvés chez les poussins (169) (107). Une fois colonisés, les oiseaux le demeurent habituellement jusqu'à l'âge d'abattage (environ 36 jours) et la transmission d'oiseau à oiseau est habituellement très rapide (118). *Campylobacter* est très prévalent dans les lots de poulet d'élevage. Les données actuellement disponibles dans la littérature relatives à la prévalence de *Campylobacter* pour les lots de poulet sont très variables, ceci étant principalement dû aux divergences existant dans les méthodes d'échantillonnage, de culture, de même que dans les pratiques d'élevage (118).

2.5.3 Transmission horizontale

Il existe généralement deux principaux types de transmission des bactéries, soit la transmission horizontale et la transmission verticale. Il est question de transmission horizontale lorsqu'il y a contamination d'un individu à partir d'une source externe telle l'environnement et qu'il y a propagation d'individu à individu. Les cas de transmission verticale sont plus rares, et se produisent lorsqu'il y a contamination directe à partir du parent vers la progéniture, que ce soit lors de la gestation ou lors de la mise bas.

Chez la volaille, il semblerait que la transmission horizontale à partir de l'environnement soit la principale cause de contamination des troupeaux par *Campylobacter* (157). Comme cette bactérie est ubiquitaire dans l'environnement entourant les poulaillers et les fermes, sa présence est fortement probable, ce qui augmente les risques de

contamination des oiseaux (118). Les principales sources de contamination sont la litière souillée, l'eau et la moulée contaminés, les abreuvoirs et les mangeoires auxquels ils ont accès, la présence d'autres animaux de la ferme tel les porcs et les bovins, de même que les employés affectés à l'entretien des poulaillers (118, 157). Il est en effet fréquent que la contamination d'un lot soit due à la présence résiduelle d'isolats de *Campylobacter* provenant de lots contaminés précédemment. Ceci a été démontré dans diverses études analysant les géotypes de la bactérie présents dans des lots successifs sur une même ferme (66, 138). Il arrive aussi que la bactérie puisse être transportée de l'extérieur du bâtiment d'élevage vers l'intérieur par les employés de la ferme, d'où l'importance de mesures de biosécurité et d'hygiène.

Il semble que chez le poulet, un patron d'excrétion cyclique de la bactérie soit présent et ce, de l'éclosion de l'œuf au départ pour l'abattoir (4). Selon cette étude, seulement un faible pourcentage (16.6%) des oiseaux étudiés ne répand en aucun temps la bactérie, et 12,5% des oiseaux avaient un profil d'excrétion chronique. Par ailleurs, toujours selon cette étude, les caecums des oiseaux étaient les organes portant la plus grande quantité de bactéries, soit $3,2 \cdot 10^6$ CFU/g, suivi par le jéjunum et le jabot. Comme la majorité des poulets sont des excréteurs chroniques de *Campylobacter*, ils constituent une source importante de cette bactérie dans les élevages.

Chez l'homme, la transmission horizontale est la plus fréquemment observée, l'homme devenant porteur de la bactérie après l'ingestion de nourriture contaminée ou après un contact avec des animaux porteurs.

2.5.4 Transmission verticale

Bien que ce type de transmission soit encore controversé chez la volaille, de nombreuses études en arrivent à la conclusion que la transmission verticale serait un élément important menant à la dispersion de *Campylobacter*. Chez le poulet, ce type de transmission aurait lieu via les œufs et les différents segments du tractus reproducteur

(24). Dans cette étude de Buhr et collaborateurs, *Campylobacter* a été détecté dans 92% des tractus reproducteurs de poules pondeuses commerciales (24). Comme cette contamination serait souvent présente lorsque les fèces de l'animal sont également contaminées par la bactérie, il serait possible de penser qu'il y a colonisation ascendante des fèces vers le tractus reproducteur. L'équipe de Camarda (29) a tenté de confirmer cette option en effectuant un génotypage des *Campylobacter* isolés du caecum, du cloaque et de l'oviducte de poules pondeuses. L'analyse effectuée par une caractérisation des gènes *flaA* et *flaB* (codant pour les protéines principales du flagelle) de même que par électrophorèse en gel à champs pulsés (PFGE) a permis de démontrer qu'un même génotype peut être retrouvé à la fois dans les tractus digestif et reproducteur des oiseaux. Puisque le lieu de colonisation habituel chez les poulets est le caecum, mais que *C. jejuni* peut à l'occasion être isolé du foie ou de la rate, il est possible qu'une colonisation ascendante du cloaque vers l'oviducte se produise (29). Il pourrait ensuite y avoir transmission de la bactérie de l'oviducte vers les œufs de consommation, induisant une contamination possible du consommateur, ou encore transmission à la progéniture, élément caractéristique d'une transmission verticale.

Des conclusions différentes ont cependant été tirées d'autres recherches au sujet de la transmission verticale. En effet, certaines affirment que la présence d'une transmission du lot parental vers la progéniture semble peu probable étant donné la divergence des génotypes obtenus par PCR-RFLP (138). Certains auteurs soutiennent également que les profils génotypiques de la progéniture et du lot parental ne démontrent pas assez de similarités pour être de la même origine clonale, mais que la présence de *Campylobacter* dans le tractus reproducteur pourrait possiblement être à l'origine d'une transmission verticale. (66). D'autres équipes ont toutefois démontré que le lot parental et la progéniture avaient des profils génotypiques similaires (24, 35) et ce, même en utilisant des méthodes de génotypages différentes pour une même analyse.

Il semble par ailleurs que les études effectuées sur la perméabilité des œufs à *Campylobacter* confirment l'hypothèse que la transmission verticale par le biais des œufs est probablement un événement rare ne jouant pas un rôle majeur dans

l'introduction de cette bactérie dans les lots de poulet (156). Bien que les parois intactes des œufs soient perméables à *C. jejuni*, laissant envisager qu'un contact avec les fèces pourrait résulter en une contamination du contenu de l'œuf, il semblerait que cette contamination ne soit restreinte qu'à la portion interne de la coquille, et non à son contenu (156). Ceci corrobore les études précédentes qui affirmaient que la contamination par les fèces du contenu de l'œuf serait principalement due à la présence de fissures dans la coquille permettant aux bactéries d'atteindre le contenu de l'œuf. (41).

Des études similaires ont été effectuées au niveau de sperme de coqs. Elles ont permis de démontrer que celui-ci pouvait contenir une certaine quantité de *Campylobacter* (35) (64). Ceci permet donc de croire que le sperme pourrait jouer le rôle de vecteur de *Campylobacter* au niveau des lots de poulet à griller. En effet, respectivement 10% et 37% du sperme prélevé chez les coqs adultes était positif pour la présence de *Campylobacter* (35, 65). Toutefois, une analyse des génotypes des isolats qui y étaient retrouvés n'a démontré aucune analogie avec ceux des isolats bactériens retrouvés par exemple dans les matières fécales de ces mêmes oiseaux (65). Ceci indique que des études à ce niveau seraient nécessaires à une meilleure compréhension de la cinétique de contamination.

2.5.5 Facteurs de risque à l'abattoir

La qualité de la viande de volaille résulte des diverses conditions rencontrées par le poulet du couvoir à l'abattoir. Ces conditions d'élevage, de transport et d'abattage sont variables d'un lot à l'autre, et peuvent comporter divers éléments qui amènent un risque pour la contamination du poulet. Il s'agit de facteurs de risque et ils jouent un rôle important quant aux différentes propriétés de la viande. Ils peuvent être regroupés selon l'étape de l'élevage à laquelle ils font référence, principalement au niveau du couvoir, du poulailler, du transport et de l'abattoir.

De nombreuses études se sont penchées sur les situations et les facteurs dont la présence peut constituer un risque de contamination pour les oiseaux à l'abattoir. La majorité de ces études s'entendent sur le fait que la contamination des oiseaux et des équipements durant le transport et à l'abattoir est la plupart du temps reliée à l'excrétion de fèces contaminées par les oiseaux. Les principales sources de cette contamination sont le cloaque, les caecums ou encore un bris intestinal (168) (152, 197) (74, 120). Selon certaines de ces études, le transport des oiseaux est un élément pouvant mener à la contamination des oiseaux, principalement à cause de la proximité des poulets dans les cages et du stress engendré par l'attrapage à la ferme et par le transport lui-même (168) (120). Il a aussi été démontré par l'équipe de Slader (164) que la réutilisation des cages servant au transport pour des lots successifs de même qu'une mauvaise désinfection de ces dernières peuvent contribuer à la contamination des lots de poulet par *Campylobacter*.

Du côté de l'abattoir lui-même, il a été suggéré par les équipes de Newell et Stern (120) (168) que l'entrée à l'abattoir de carcasses positives menait à la contamination des divers équipements servant au processus d'abattage, et que ces équipements, de même que le personnel de l'abattoir, étaient une cause importante de la dissémination bactérienne à travers les différents lots abattus dans un abattoir donné. Ceci est principalement dû au fait que ces équipements sont en contact direct avec tous les oiseaux passant sur la chaîne. Il semble par ailleurs que certains isolats de *Campylobacter* puissent se retrouver sur les carcasses de lots successifs; certaines d'entre elles étant plus résistantes aux conditions environnementales hostiles et pouvant jouer un rôle important dans la contamination croisée fréquemment observée dans les abattoirs de poulet (120).

2.5.6 Contamination croisée à l'abattoir

Différentes études, réalisées dans divers pays, ont analysé l'évolution des géotypes de *Campylobacter* se retrouvant sur les carcasses des lots de poulets à l'abattoir. La plupart en arrivent à la même conclusion, soit la que la contamination croisée entre les différents lots à l'abattoir est présente (120, 152) (66). En analysant des lots successifs sur la

chaîne à l'abattoir, Newell et al. (120) ont pu constater que des lots négatifs pour *Campylobacter* existent, mais qu'ils deviennent la plupart du temps positifs à la fin du processus dans l'abattoir. Une étude semblable étudiant trois lots successifs sur la chaîne d'abattage a permis de déterminer que les génotypes du premier lot pouvaient également se retrouver sur les carcasses des deuxième et troisième lots, et que ces génotypes étaient initialement absents chez ces oiseaux (152).

Il a également été démontré, par analyse des profils génétiques des campylobacters se retrouvant sur les carcasses à l'abattoir, qu'une grande variété de profils génotypiques étaient présents (165) (152). Toutefois, cette diversité devient moindre à la fin du processus d'abattage et d'éviscération, les souches encore présentes étant probablement les plus résistantes aux conditions hostiles retrouvées dans les abattoirs (120) (138) (66).

2.6 Caractérisation des profils génétiques

Avec les récents développements et la popularité grandissante de la biologie moléculaire, *Campylobacter* peut non seulement être détecté par PCR, mais son génome peut être caractérisé, permettant la comparaison entre les souches. De nombreuses techniques existent à ce jour en vue d'effectuer des analyses génotypiques. Celles-ci sont utiles à bien des égards, les utilités les plus reconnues étant de 1) permettre de retracer les sources et les voies de transmissions des infections humaines, 2) identifier et suivre des souches spécifiques possédant des caractéristiques phénotypiques particulières et 3) développer des stratégies de contrôle des microorganismes au niveau de la chaîne alimentaire. Les plus connues et les plus utilisées sont le PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), le Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), l'Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), le Ribotyping, le Multilocus Sequence Typing (MLST) et le Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE).

2.6.1 PCR-RFLP

Campylobacter, comme de nombreuses entérobactéries, possède la propriété de se mouvoir grâce à son flagelle. Celui-ci est composé de flagelline codée par deux gènes, *flaA* et *flaB*, lesquels sont très hautement conservés chez la bactérie et ayant entre eux 91,9% d'homologie (119). Comme ces gènes varient à travers les isolats de *Campylobacter*, il est donc possible de les utiliser dans un but de caractérisation des isolats. Une comparaison des gènes *fla* de *C.coli* et de *C. jejuni* révèle qu'ils possèdent des régions communes aux extrémités carboxy et amino terminales de la protéine formée, permettant ainsi la construction d'amorces basées sur les régions conservées (119). Le PCR peut donc ensuite servir à amplifier les séquences non-conservées de ces gènes. Une fois ces séquences conservées et non-conservées amplifiées, des enzymes de restriction sont utilisées et fournissent des RFLP qui pourront être utilisés à des fins de comparaison.

À ce jour, bon nombre d'enzymes de restriction et d'amorces ont été mises au point. Le choix des amorces a relativement peu d'impact sur les variations de longueur des fragments obtenus alors que celui des enzymes de restriction a un effet considérable sur le niveau de discrimination de la technique (119). Les enzymes les plus discriminants quant au nombre de bandes obtenu semblent être *DdeI* et *HinfI* (119). Plus efficace que le sérotypage, cette méthode est toutefois moins discriminante que l'électrophorèse en gel à champs pulsés (PFGE) du génome entier, mais permet tout de même d'effectuer de bonnes comparaisons entre les souches. Toutefois, le manque de standardisation dans l'analyse des gels limite les analogies pouvant être effectuées entre les résultats obtenus par différents laboratoires (193). Par ailleurs, étant donné que les isolats de *Campylobacter* ont la capacité de faire varier leurs gènes *flaA* et *flaB* (119, 192), cette technique ne peut être considérée comme très stable, ce qui représente en soi un désavantage.

2.6.2 RAPD

Le RAPD est également une technique basée sur le PCR, à la différence qu'il utilise des amorces conçues aléatoirement à partir du génome bactérien. Ces amorces, qui comportent habituellement 10 nucléotides, sont donc capables de lier l'ADN bactérien et d'en amplifier plusieurs régions distinctes (119). L'une des plus utilisées est l'amorce 5'-CAATCGCCGT-3' (126). Le génome entier est ciblé par cette technique, le nombre et la taille des fragments pouvant être régulés entre autres par la stringence de la réaction. Les conditions les plus souvent choisies sont des températures d'appariement permettant des appariements imparfaits afin d'augmenter le nombre de sites liés par les amorces (119, 193).

Les patrons de bandes obtenus permettent d'effectuer une comparaison des différents isolats analysés, du moment que ceux-ci appartiennent à la même espèce bactérienne. Toutefois, il peut arriver que certaines bandes soient uniques à des souches de *Campylobacter* précises (119). De façon générale, le RAPD fournit un niveau de discrimination égal ou supérieur à celui du PFGE (119) (122). Dans certaines situations, comme dans le cas de *C.jejuni*, cette technique peut toutefois être trop sensible, d'où l'importance de l'utiliser en combinaison avec une autre méthode de génotypage. Bien que nécessitant peu de moyens techniques et étant moins sensible aux instabilités génomiques que le typage du gène *fla*, le RAPD possède une faible reproductibilité. (119).

2.6.3 AFLP

Initialement développé pour l'analyse génétique des plantes, l'AFLP a graduellement été adapté pour la caractérisation d'espèces bactériennes (193). Cette méthode de caractérisation est semblable au RAPD, à la différence qu'elle consiste en la digestion complète de l'ADN chromosomique au moyen de deux enzymes de restriction. Le premier enzyme coupe en des sites de 4 paires de bases (bp) et le second, en des sites de 6 bp (193). Il y a ensuite amplification des produits de digestion, de façon à ce que seuls

les fragments d'ADN flanqués des deux sites de restriction soient amplifiés par PCR (119) (193). Même si l'AFLP ne nécessite pas une connaissance précise de la séquence nucléotidique, le choix des enzymes de restriction et des nucléotides qui seront appariés doit être optimisé selon l'organisme analysé. Ceci est dû au fait que la taille des génomes des microorganismes de même que leur pourcentage en guanine et cytosine est variable. Dans le cas de *Campylobacter*, deux séries d'enzymes sont disponibles, soit *HindIII-HhaI* et *BglIII-Csp6I*. Les différents nucléotides de sélection utilisés génèrent pour leur part de 50 à 60 fragments de 35 à 500 paires de bases. Ces fragments peuvent être analysés à l'aide d'amorces marquées à un fluorochrome ou encore à l'aide d'un séquenceur d'ADN automatisé (119).

Suite à une comparaison de l'AFLP et du PFGE, il semble que ces techniques aient un niveau de discrimination semblable, à la différence que plusieurs enzymes doivent être utilisés afin que le pouvoir discriminant du PFGE atteigne sa pleine efficacité (31). Par contre, avec l'AFLP, un seul enzyme peut être utilisé. Par ailleurs, cette technique est fort utile pour déterminer le degré de parenté génétique entre des souches provenant de plusieurs populations, de même que pour déterminer les similarités génétiques existant entre plusieurs isolats de *C. jejuni* (193). Un autre élément favorisant le grand pouvoir discriminant de ces techniques est leur capacité à analyser le génome entier des bactéries étudiées (122). Cette technique est par ailleurs rapide et facile à standardiser, mais requière un équipement spécialisé qui peut s'avérer coûteux. En outre, une standardisation du protocole utilisé serait nécessaire afin de permettre la comparaison de résultats entre différents laboratoires (119).

2.6.4 MLST

Le MLST, qui emploie la même approche que le MultiLocus Enzyme Electrophoresis (MLEE), est une technique de caractérisation basée sur les séquences nucléotidiques de fragments de 500 bp de sept gènes de ménage (housekeeping genes) généralement stables et conservés à travers les différentes espèces d'un même genre bactérien. Ces gènes codent habituellement pour des fonctions métaboliques, d'où l'importance de leur

stabilité et de leur conservation à travers les isolats. Chez *C. jejuni*, les gènes de ménages utilisés sont *aspA* (codant pour l'aspartase A), *glnA* (codant pour la glutamine synthétase), *gltA* (codant pour la citrate synthase), *glyA* (codant pour la sérine hydroxyméthyltransferase), *pgm* (codant pour la phosphoglucomutase), *tkt* (codant pour la transkétoleuse), and *uncA* (codant pour la sous-unité A de l'ATP synthase)(40). Ces gènes sont d'abord amplifiés par PCR, puis une partie de chacun des amplicons obtenus est séquencée. Par la suite, un chiffre est attribué à chaque allèle unique se retrouvant dans un locus particulier. Les combinaisons de ces sept chiffres forment un profil allélique, aussi appelé séquence typique (ST) (188). Grâce aux ST obtenues, il est par la suite possible de comparer les différents échantillons entre eux.

Cette technique comporte de nombreux avantages pour *Campylobacter*. Il s'agit d'une technique adaptée pour l'investigation de populations bactériennes ayant une structure clonale instable comme c'est le cas pour *Campylobacter* et est de plus simple et très reproductible. Comme les données peuvent être conservées électroniquement, les échanges entre les laboratoires s'en trouvent facilités (39). De plus, cette technique peut être utilisée dans une optique de compréhension des routes potentielles de transmission de la bactérie à l'homme (188). Par ailleurs, le MSLT est idéal pour les études épidémiologiques globales et à long terme étant donné qu'elle identifie les variations qui s'accumulent lentement à travers une population bactérienne donnée (100).

2.6.5 Pulsed-Field Gel Electrophoresis

Initialement utilisé dans le but de déterminer la taille du génome de *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* et *C. fetus*, le PFGE est une technique de caractérisation basée sur la taille des fragments d'ADN obtenus suite à un clivage à l'aide d'enzymes de restriction (119). Elle consiste d'abord à enrober les cellules bactériennes dans des blocs d'agarose à même desquels aura lieu la lyse *in situ* des cellules. Puisque l'ADN est l'élément de base de l'analyse, ces blocs d'agarose (plugs) sont utilisés afin de prévenir la dégradation de l'ADN par les DNases exogènes. Le clivage par les enzymes de restriction sera ensuite effectué à même ces blocs d'agarose. Le choix de ces dernières

repose sur le fait qu'il doit s'agir d'enzymes ayant des sites de coupures assez rares dans le but d'obtenir des fragments d'ADN assez longs (119). Les enzymes les plus souvent utilisés pour *Campylobacter* sont *SmaI*, *Sall* et *KpnI*, la dernière mentionnée étant la plus discriminante pour cette bactérie (104). L'électrophorèse à laquelle sont soumis les brins d'ADN utilise un champ électrique pulsé et alterné qui permet de séparer les fragments d'ADN selon leur taille (119). L'efficacité de cette technique repose sur le fait que le génome bactérien complet est analysé (122), de sorte que les différences entre les isolats sont facilement détectables.

Les patrons de bandes obtenus par PFGE peuvent être analysés par différentes techniques, les plus communément utilisées étant les critères de Tenover et le coefficient de Dice. La première méthode d'analyse (177) avait initialement été mise au point pour *E.coli*, afin de comparer des isolats à des souches responsables d'épidémies. Elle dénombre les bandes des différents échantillons en comparant le nombre de bandes similaires obtenu pour chacun des échantillons. Elle requiert cependant un minimum de dix bandes par échantillon afin d'être pleinement valide. Le tableau V est un résumé des critères de Tenover utilisés afin de déterminer si l'origine clonale est la même ou non (177). Il est possible d'utiliser les critères décrits précédemment pour *Campylobacter*, spécialement lorsqu'on est en présence de peu de souches provenant d'une région isolée. Dans les autres cas, il est préférable d'utiliser le coefficient de Dice, tel que décrit plus bas.

Tableau V : Critères de Tenover utilisés pour la comparaison des patrons de bandes d'isolats bactériens analysés par PFGE

Catégorie	Différences génétiques comparativement		Interprétation épidémiologique
	à la souche de référence typique de l'épidémie	Fragments différents du patron de référence typique de l'épidémie	
Indistingables	0	0	L'isolat fait partie de l'épidémie
Très apparentées	1	2-3	L'isolat fait probablement partie de l'épidémie
Possible- ment apparentées	2	4-6	L'isolat fait peut-être partie de l'épidémie
Différentes	≥ 3	≥ 7	L'isolat ne fait pas partie de l'épidémie

Le coefficient de Dice est pour sa part une méthode basée sur la comparaison de la position des bandes. Elle repose sur l'attribution de coefficients de similarité (S_{ABs}) à chaque paire d'isolats dans le but de construire un dendogramme. Le nombre de bandes pouvant être associées entre elles parmi les patrons obtenus est ensuite divisé par le nombre total de bandes obtenu (109). Par ailleurs, la présence ou l'absence de bandes est décrite par la valeur binaire 1 ou 0.

$$\text{Dice } (S_D) = \frac{2\eta_{AB}}{2\eta_{AB}+a+b}$$

Dans cette formule, η_{AB} est le nombre de bandes communes pour deux patrons donnés (A et B; code 1,1); a est le nombre de bandes présentes dans A mais absentes dans B (codé 1,0); b est le nombre de bandes présentes dans B mais absentes de A (109). Ainsi, les conditions utilisées lors des analyses devront être similaires d'un gel à l'autre et d'une digestion à l'autre si le but est d'effectuer des comparaisons entre de nombreux isolats.

Les patrons obtenus peuvent être utilisés dans le but de construire des dendogrammes. Ceux-ci sont construits suite à la construction d'une matrice à l'aide des valeurs générées entre chaque paire d'isolats. Afin d'établir des liens entre les isolats, la méthode UPGMA (Unweighted-Pair Group Method using Arithmetic Averages) est souvent choisie, mais celle de « Neighbor-Joining » peut également être utilisés dans cette optique (109).

Comme toutes les techniques mentionnées jusqu'à maintenant, le PFGE possède lui aussi ses inconvénients. L'un des principaux est la grande période de temps nécessaire à la préparation des blocs d'agarose, de même que l'importance de la désactivation des DNases endogènes afin de protéger les fragments d'ADN obtenus. Par ailleurs, le coût de l'équipement utilisé pour effectuer l'électrophorèse est élevé et il peut arriver que les enzymes de restriction ne dégradent pas complètement l'ADN de certaines espèces bactériennes (119).

2.6.5.1 Instabilité génétique de *Campylobacter*

De façon générale, l'instabilité génétique des microorganismes peut être causée par divers éléments : mutations spontanées, réarrangement des gènes via l'insertion d'éléments mobiles, de transposons ou de phages, inversion de l'ADN ou transformation naturelle se produisant avec de l'ADN étranger (187). Tous ces événements peuvent conduire à l'obtention de profils distincts suite au génotypage des souches. Toutefois, il faut demeurer prudent dans l'appellation donnée à ces souches.

D'abord, il est question de mutation spontanée lorsqu'il y a modification d'une seule base dans l'ADN. Cette mutation, lorsque présente dans l'ADN, mènera à un profil différent dans le cas où elle s'est produite au niveau d'un site de restriction précis, empêchant la reconnaissance par l'enzyme de ce site particulier, et menant à l'obtention d'un nombre de fragments différent, par exemple suite à une analyse par PFGE. Dans ce cas, l'utilisation d'un enzyme de restriction différent pourrait permettre de déterminer le niveau de parenté entre les deux souches. Dans le cas d'insertion de gènes ou d'élément mobiles de plus grande taille, d'inversion d'ADN ou de transformation naturelle avec de l'ADN étranger, il pourrait également y avoir modification d'un site de restriction donné. Dans le cas où le morceau d'ADN nouvellement intégré possède lui aussi des sites reconnus par l'enzyme, il se pourrait que le nombre de bandes observé soit modifié.

Certains travaux ont récemment confirmé la présence d'instabilité génétique chez *Campylobacter* (125) (192) (193) (40) (162). En effet, des isolats de *C. jejuni* provenant de lots de viande ont été analysés par l'équipe de Wassenaar (192) à l'aide de la technique de PFGE. L'origine de la viande étudiée étant la même, les auteurs ont utilisé des techniques d'analyse supplémentaires afin de confirmer les résultats obtenus. Après analyse par PCR-RFLP, il apparut que les isolats avaient tous le même génotype de *fla*, de même que le même phénotype. Par ailleurs, les isolats possédant le même profil de gène *fla* avaient également le même sérotype de Penner de même que le même biotype, confirmant l'origine clonale commune des isolats. L'hypothèse la plus plausible alors émise veut que les différences observées parmi les patrons de PFGE soient

probablement attribuables à une variation génomique chez les isolats, probablement une insertion d'ADN ou encore un phénomène de mutation ponctuelle.

Une étude similaire réalisée par On et collaborateurs (125) avec des isolats de porc a également permis de confirmer l'instabilité génétique de *Campylobacter*. En effet, après un certain nombre de passages *in vitro* (jusqu'à 50 passages), les profils de macrorestriction obtenus par PFGE démontraient aussi une certaine variation génotypique. Les causes les plus plausibles pouvant selon l'auteur être attribuables aux changements observés sont un réarrangement génomique ou la recombinaison avec des éléments mobiles (125).

Plus récemment, une étude effectuée par le biais du MLST a démontré des échanges horizontaux au niveau des gènes de ménage intra et inter-espèces étaient fréquents chez *Campylobacter* (40). De même, le phénomène de recombinaison à l'intérieur du loci codant pour la flagelline semble être fréquent (137). Il faut donc être prudent lors de l'utilisation de la méthode de typage PCR-RFLP du gène *fla*, car ce gène est reconnu pour être instable.

Toutefois, d'autres études semblent pencher pour une certaine stabilité du génome de *Campylobacter* malgré un certain nombre de passages *in vitro* et *in vivo* (121). En effet, des profils génotypiques similaires ont été obtenus par cette équipe par les méthodes de PFGE, de ribotyping et de sérotypage, et ce, après un total de 50 passages. Selon cette équipe, il pourrait être possible que l'instabilité génétique soit plutôt due à des isolats de *Campylobacter* regroupés ensemble et passant pour un seul isolat.

Une étude effectuée récemment à l'aide de puces à ADN (microarrays) a quant à elle permis de démontrer que la plasticité du génome de *Campylobacter* serait faible par rapport à ce qui avait été démontré précédemment par d'autres études. En effet, cette étude de Taboada et collaborateurs a permis de démontrer que la variabilité des gènes serait limitée à un petit nombre de régions du génome et donc, que la majorité du génome est stable (174). Cette étude est également en accord avec celle de Wassenaar et

al. qui rapportait que la stabilité du génome était habituellement associée à une faible quantité d'éléments mobiles et de séquences répétées (192). En outre, l'étude de Taboada et al. a également permis de confirmer la présence de gènes possédant un haut degré de variabilité intra-espèce(174). Ces gènes pourraient donc éventuellement être utilisés dans une optique de génotypage.

Ces diverses études démontrent que *Campylobacter* possède un génome stable, mais que celui-ci peut facilement acquérir du matériel exogène provenant du milieu extérieur ou encore d'autres pathogènes. Ainsi, afin de pouvoir affirmer hors de tout doute que deux souches de *Campylobacter* sont différentes génétiquement, il est conseillé d'effectuer des analyses génotypiques supplémentaires, afin de s'assurer que les différences initialement observées n'étaient pas dues, par exemple, à la seule présence par exemple d'une mutation ponctuelle. Le choix de la technique de génotypage sera donc déterminant dans les analyses.

2.6.5.2 Diversité génétique de *Campylobacter* chez le poulet de chair

À ce jour, de nombreuses études moléculaires ont été effectuées au niveau de la caractérisation d'isolats de *Campylobacter* provenant de poulet à griller tant à la ferme qu'à l'abattoir. À la ferme, il a été démontré qu'il peut exister certains clones de *Campylobacter* spécifiques à une ferme donnée (138). Cette étude effectuée au Danemark met également en évidence que certains des clones présents peuvent persister durant de nombreux lots successifs au niveau d'une même ferme (138). Aux États-Unis, il a été démontré que généralement, plusieurs clones de *Campylobacter* peuvent coexister au niveau d'un lot donné à la ferme, et que ces clones se retrouvent également au niveau du produit fini, d'où l'importance du respect des mesures d'hygiène (66). Cette équipe a également démontré que des clones apparentés se retrouvaient au niveau de l'industrie aviaire, indépendamment de la localisation ou du producteur. Une étude effectuée au Québec au niveau du matériel cécal prélevé à l'abattoir a quant à elle mis en évidence qu'au niveau d'un lot donné, un nombre limité de clones différents peut

exister, et que généralement, lorsque plusieurs clones coexistent, l'un d'entre eux est prédominant (114).

Les études effectuées au niveau de la contamination des carcasses de poulet sont quant à elles plus rares, aucune n'ayant été encore effectuée au Québec. Parmi les études effectuées à ce sujet, une étude effectuée au Royaume-Uni démontre qu'au niveau d'un lot donné, les génotypes de *Campylobacter* retrouvés sur les carcasses de poulet à l'abattoir étaient similaires à ceux retrouvés dans les caecums correspondants (120). Cette équipe a également soulevé la présence de contamination croisée entre différents lots abattus au cours d'une même journée pour un établissement d'abattage donné. En effet, certains lots portant un sous-type donné de *Campylobacter* échantillonnés à l'arrivée à l'abattoir ont démontré un ou des sous-types différents sur leurs carcasses une fois abattus. Incidemment, ces sous-types différents correspondaient au génotype retrouvé sur les carcasses et dans les caecums du lot abattu précédemment sur la chaîne, ce qui permet de confirmer l'existence de contamination croisée au niveau des abattoirs, de même que l'importance de la contamination cécale sur la contamination des carcasses.

Une étude effectuée au Japon a démontré que les génotypes retrouvés sur les carcasses des oiseaux à l'abattoir correspondaient aux génotypes retrouvés dans les caecums de ces mêmes oiseaux (105). Cette équipe a par ailleurs établi que lorsqu'un lot exempt de *Campylobacter* entre à l'abattoir, il en ressort contaminé par les génotypes du ou des lots abattus précédemment sur la chaîne.

En France, l'équipe de Rivoal et collaborateurs a également mis en évidence la présence de contamination croisée à l'abattoir (152). Selon les résultats obtenus par cette équipe, la contamination des carcasses à l'abattoir par *Campylobacter* serait principalement causée par les matières fécales. Des évidences de contamination croisée ont également été retrouvées. En effet, certains génotypes de *Campylobacter* ont été retrouvés sur les carcasses de poulet de plusieurs lots consécutifs à l'abattoir, alors que ces génotypes

n'avaient auparavant pas été isolés chez ces lots à la ferme. Les auteurs ont également confirmé que plusieurs génotypes pouvaient co-exister au niveau d'un lot donné.

2.7 Résistance aux antibiotiques chez *Campylobacter*

Les antibiotiques sont produits par des organismes vivants, probablement de façon à ce que ceux-ci puissent évoluer dans leur habitat naturel et survivre à la sélection naturelle. Les organismes produisant ces composés, principalement des moisissures et des champignons, ont également développé des mécanismes de résistance leur permettant de survivre à cette production. Ainsi, les mécanismes de résistance aux antibiotiques et leurs gènes ont évolué au développement et à l'adaptation au milieu des organismes les produisant, et ce, bien avant l'ère des antibiotiques de synthèse telle que connue actuellement. Toutefois, c'est durant cette nouvelle ère des antibiotiques que la majeure partie du développement de résistances aux antimicrobiens par les microorganismes a eu lieu. À présent, un grand nombre de résistances sont connues et partagées par une multitude de bactéries et autres microorganismes, *Campylobacter* n'y faisant pas exception. Au tableau 2.9, il est possible de visualiser l'évolution des diverses résistances aux antibiotiques (185).

Tableau VI : Évolution des résistances bactériennes aux différents antibiotiques

Classes d'antibiotique	Année d'apparition du composé	Émergence de la résistance chez les microorganismes
Sulfonamides	1930	1940
Pénicillines	1943	1946
Streptomycine	1943	1959
Chloramphénicol	1947	1959
Tétracycline	1948	1953
Érythromycine	1952	1988
Vancomycine	1956	1988
Méthicilline	1960	1961
Ampicilline	1961	1973
Céphalosporines	1960	Fin des années 60

Selon (185)

Bien qu'habituellement les gastro-entérites à *Campylobacter* soient auto-limitantes, il peut arriver que des cas plus sévères ou récurrents surviennent, nécessitant alors une prise d'antibiotiques par le patient. Les antibiotiques les plus souvent utilisés dans ces situations sont les macrolides et les fluoroquinolones, le ciprofloxacine étant présentement le traitement de choix (107) (2). L'émergence de résistance à ces antibiotiques chez divers isolats de *Campylobacter* pourrait donc devenir un important problème pour les autorités médicales. C'est la raison pour laquelle la surveillance de l'émergence de résistance à divers antibiotiques chez *Campylobacter* doit être effectuée, de façon à prévenir une expansion de résistances.

2.7.1 Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *Campylobacter*

Avec le temps, les bactéries ont développé divers mécanismes de résistance aux antibiotiques. Ceux-ci peuvent être séparés en 4 grandes classes principales, soit l'inactivation enzymatique de l'antibiotique, les pompes à efflux acheminant l'antibiotique à l'extérieur de la cellule, la modification de la cible de l'antibiotique de même que la régulation des gènes de résistance.

2.7.1.1 Résistance aux fluoroquinolones

Les fluoroquinolones sont des antibiotiques initialement développés comme antiseptique urinaire. Leur cible principale est l'ADN gyrase (une topoisomérase II) qui est essentielle dans les processus de réplication, de recombinaison et de réparation de l'ADN (109). Les antibiotiques les plus récemment développés ciblent également la topoisomérase IV. Les topoisomérases II et IV sont composées de deux sous-unités principales qui s'assemblent pour former une holoenzyme de type A_2B_2 ; GyrA et GyrB chez la gyrase, et ParC et ParF pour la topoisomérase IV (202). Chez les bactéries à Gram négatif, la sous-unité A de la gyrase est la cible principale, alors que chez les bactéries positives à la coloration de Gram, il s'agit de la topoisomérase IV. L'inhibition de ces enzymes cause un relâchement dans le surenroulement de l'ADN, entraînant ainsi l'arrêt de la réplication, ce qui interfère par le fait même avec la division

cellulaire et l'expression des gènes (109). Ainsi, ces composés sont bactéricides. Par ailleurs, leur action est diminuée en conditions de bas pH et en présence de cations divalents tels Mg^{+2} et Ca^{+2} (109).

Chez *Campylobacter*, différents mécanismes peuvent être responsables de la résistance aux fluoroquinolones. Le premier est une mutation ponctuelle au niveau du gène *gyrA*. Ceci a pour résultat de rendre l'enzyme gyrase insensible à l'action de l'antibiotique (109, 202), (185). Cette mutation a lieu dans l'ADN aux positions Thr-86, Asp-90 et Ala-70 qui se retrouvent dans la région déterminante de résistance aux quinolones (aussi appelée QRDR). La mutation dans Thr-86-Ile est quant à elle associée à de hauts niveaux de résistance aux fluoroquinolones chez des isolats cliniques de *Campylobacter* (202). Les mutations dans les régions Asp-90-Asn et Thr-86-Lys sont quant à elles associées à des niveaux intermédiaires de résistance.

À ce jour, des mutations dans *gyrB* n'ont pas été rapportées, mais une étude a mis en évidence la contribution d'une mutation dans le gène *parC* à la résistance aux fluoroquinolones observée chez *Campylobacter* (53). Puisque ce gène code pour la protéine ParC de la topoisomérase IV, cette mutation pourrait elle aussi être impliquée dans le phénotype de résistance (43).

Le second mécanisme de résistance aux fluoroquinolones chez *Campylobacter* est une pompe à efflux récemment caractérisée, soit CmeABC (148) (94). Les gènes codant pour cette pompe à efflux, respectivement *cmeA*, *cmeB* et *cmeC*, sont situés sur le chromosome de *Campylobacter* et codent respectivement pour une protéine de fusion membranaire (CmeA), la pompe à efflux elle-même (CmeB) et une protéine canal dans la membrane externe (CmeC) (94, 147). La pompe fonctionnerait de façon énergie-dépendante et contribuerait à la résistance intrinsèque de la bactérie aux fluoroquinolones et aux sels biliaires en pompant les composés à l'extérieur de la cellule (202) (98). CmeABC serait en outre importante dans le maintien de hauts niveaux de résistances aux fluoroquinolones, mais sa surexpression chez *Campylobacter* ne serait pas requise à la présence de résistance (202). Il a également été démontré que *cmeB*

code pour une protéine appartenant à la famille de transporteurs à efflux appelés Resistance nodulation cell division. Cette famille de pompes à efflux contribuerait à la résistance intrinsèque à certains antibiotiques, de même qu'à de nombreuses multi-résistances (146).

Une autre pompe à efflux retrouvée chez *Campylobacter* est la pompe CmeDEF. Mise en évidence récemment, elle contribuerait elle aussi à la résistance multiple de *C. jejuni* à certains antibiotiques, notamment l'ampicilline, le bromure d'éthidium, l'acridine, le sodium dodécyl sulfate (SDS), le triclosan et le cétrimide (147). Très semblable à CmeABC, CmeDEF serait composée d'une pompe dans la membrane interne, CmeF, d'une protéine de membrane externe, CmeD, et d'une protéine fusionnée à la membrane (147).

Le dernier mécanisme de résistance aux antibiotiques connu chez *Campylobacter* est une porine codée par le gène *porA* qui est une protéine majeure de la membrane externe. PorA est une protéine-canal de 45 kilodaltons appartenant à la famille des porines trimériques dont font aussi partie les protéines OmpF et OmpC de *E. coli*. Chez *Campylobacter*, PorA serait impliquée principalement dans les phénotypes de résistance intrinsèque aux fluoroquinolones (148).

2.7.1.2 Résistance aux macrolides-lincosamides-streptogramines de groupe B

La structure chimique des macrolides, dont le représentant exemplaire est l'érythromycine, consiste en un anneau lactone macrocyclique attaché à la désosamine et la cladinose. Les macrolides se différencient entre eux par la taille (de 14 à 16 atomes) et par les diverses substitutions de l'anneau lactone (109).

Les macrolides sont bactériostatiques et inhibent la synthèse protéique de façon ARN dépendante. Ils peuvent également être bactéricides, mais seulement à de hautes concentrations. Les macrolides se lient de façon réversible à l'ARN 23S de la sous-unité

50S du ribosome des micro-organismes susceptibles, bloquant ainsi la translocation du ribosome lors du processus d'élongation de la chaîne polypeptidique (109).

De façon générale, plusieurs mécanismes différents peuvent causer la résistance aux macrolides, soit une modification de la cible par le biais d'une mutation ponctuelle ou par une méthylation de l'ARNr 23S, une modification de la perméabilité de la membrane face à l'antibiotique, une modification de l'anneau lactone du macrolide, ou encore la présence de pompes à efflux pompant l'antibiotique à l'extérieur de la cellule (2), (101). Chez *Campylobacter*, la résistance à cette classe d'antibiotique est habituellement causée par une mutation chromosomale se produisant au niveau de deux résidus adénine du site de liaison de l'érythromycine de l'ARNr 23S (43). Plus spécifiquement, la mutation est retrouvée au niveau des résidus A2058 et A2059 du domaine V de l'ARNr 23S, où l'adénine est modifiée en une guanine. Il peut également arriver que des méthylases (codées par les gènes *erm*) produisent une méthylation de certains résidus de l'ARNr 23S, empêchant ainsi la liaison de l'antibiotique à son site spécifique sur l'ARNr 23S. Chez *Campylobacter*, on note également la présence de pompes à efflux qui seraient impliquées dans les phénotypes de multirésistance aux antibiotiques (52)

Un élément inquiétant de l'émergence de résistance aux macrolides est la résistance croisée se produisant entre les antibiotiques de cette classe et ceux appartenant aux familles des lincosamides et des streptogramines de groupe B. Ce phénotype est d'ailleurs nommé MLS_B (101). Malgré leur variété de structures, ces antibiotiques ont des mécanismes d'action similaires, soit principalement de bloquer la synthèse protéique. Comme les sites de la mutation ponctuelle donnant lieu au phénotype de résistance sont très rapprochés dans le génome, il arrive souvent que des bactéries démontrent une résistance pour des antibiotiques appartenant à ces trois classes, et ce, de façon simultanée. Cette résistance croisée peut être inquiétant pour les autorités médicales, puisqu'elle indique que les bactéries peuvent développer une résistance pour un antibiotique donné, et que cette résistance peut se propager à d'autres antibiotiques.

2.7.1.3 Résistance aux β -Lactames et aux céphalosporines

La famille des β -lactames est un groupe d'antibiotiques synthétiques contenant un noyau chimique 6-amino-penicillin acide lui-même formé d'un anneau β -lactam fusionné à un anneau thiazolidine (109). L'action antibactérienne de ces composés repose sur leur capacité à lier les « Penicillin binding-proteins » qui sont essentielles à la synthèse du peptidoglycan (109). Elles sont donc bactéricides, et principalement actives contre les bactéries positives à la coloration de Gram.

La majorité des souches de *C. jejuni* et *C. coli* sont résistantes aux β -lactamines, de façon plus spécifique aux pénicillines et aux céphalosporines. Le phénotype de résistance à cette classe d'antibiotique est habituellement dû à la présence de β -lactamases qui ont comme effet de cliver l'anneau β -lactame de l'antibiotique (2). Un autre mécanisme de résistance régulièrement observé est l'absence de protéines de liaison à la pénicilline, ou une incapacité de l'antibiotique à pénétrer à l'intérieur de la cellule bactérienne. Chez *Campylobacter*, la présence de β -lactamases ne serait efficace que pour l'amoxicilline, l'ampicilline et le ticarcillin. Dans les cas de la pénicilline G et de la piperacilline, la résistance serait plutôt causée par la faible capacité de l'antibiotique à se lier au site de liaison à la pénicilline, de même qu'à une faible perméabilité de la cellule bactérienne à ce type de molécules (2).

Les céphalosporines contiennent un noyau 7-amino cephalosporine acide qui consiste en un anneau β -lactam fusionné à un anneau dihydrothiazine. De façon similaire aux pénicillines, cette classe d'antibiotique agit en interférant avec la liaison aux Protéines de liaison à la pénicilline (PBP) des organismes susceptibles, inhibant donc la synthèse du peptidoglycan de la paroi bactérienne (109).

La résistance à cette classe de composés serait causée elle aussi par une faible capacité de l'antibiotique à se lier au site de liaison à la pénicilline, de même qu'à une faible perméabilité de la cellule bactérienne à ce type de molécules (2).

2.7.1.4 Résistance au chloramphénicol

Le chloramphénicol contient habituellement un anneau nitrobenzène et est un antimicrobien à large spectre. Bactériostatique, il agit au niveau de l'inhibition de la synthèse protéique, de façon plus précise en se liant de façon réversible au composant peptidyl-transférase de la sous-unité 50S du ribosome, prévenant ainsi le processus de transpeptidation de l'étape d'élongation du peptide en formation (109).

La résistance à cet antibiotique est principalement due à la production d'enzymes ajoutant un groupement acétyl à la molécule initiale, inactivant ainsi le composé (109). Ces enzymes portent le nom de chloramphénicol-acétyl-transférases (ou CAT), et sont souvent codés par un plasmide (2), (109). Toutefois, cette résistance n'est que très peu répandue au niveau du genre *Campylobacter*.

2.7.1.5 Résistance aux aminoglycosides

Les aminoglycosides sont des agents bactéricides qui inhibent la synthèse protéique bactérienne en se liant de façon irréversible à la sous unité ribosomale 30S. Ainsi, le lien aminoglycoside du ribosome bactérien devient inaccessible pour la traduction de l'ARNmessenger (ARNm) durant la synthèse protéique, ce qui mène à la mort cellulaire (109). Cette classe d'antibiotique peut également causer des erreurs de cadre de lecture du code génétique, ce qui mène à la production de protéines non fonctionnelles.

Une modification enzymatique du composé antibactérien est habituellement à la source de la résistance observée chez les aminoglycosides. En effet, trois types d'enzymes peuvent participer à cette modification, soit les aminoglycosides adényl-transférases (AAD), les aminoglycosides acétyl-transférases (AAC) et les aminoglycosides phosphotranférases (APH). Retrouvés chez *Campylobacter*, les gènes codant pour ces enzymes sont aussi retrouvés chez des bactéries Gram positives et chez quelques *Enterobacteriaceae*. Ceci pourrait indiquer que *Campylobacter* aurait pu les acquérir par transfert horizontal de gènes par le biais des bactéries Gram positives (2).

2.7.1.6 Résistance à la tétracycline

Les tétracyclines sont des antibiotiques bactériostatiques à large spectre divisés en trois sous catégories selon leur demi-vie dans l'organisme. Elles agissent contre les microorganismes susceptibles en inhibant la synthèse protéique, précisément en se liant de façon réversible à la sous unité 30S du ribosome bactérien, ce qui bloque l'accès de l'ARN de transfert (ARNt)-aminoacyl au complexe ribosome-ARN (109).

Quatre principaux mécanismes sont associés à la résistance à la tétracycline, soit les pompes à efflux, une modification de l'antibiotique lui-même, la protection du site de liaison au ribosome spécifique à la tétracycline de même que des mutations dans l'ARNr 16S (2, 109) (158). Toutefois, il semble que *Campylobacter* présente plutôt une résistance causée par un plasmide auto-transférable (12). Les gènes codant pour cette résistance ont été décrits comme des gènes de protection du ribosome, et sont nommés *tet(O)*. La protéine codée par ce gène agit par ailleurs comme un facteur d'élongation et inhibe la synthèse protéique en entraînant le relargage de l'antibiotique de son site de liaison sur le ribosome et ce, d'une façon GTP dépendante (33). La dissociation entre l'antibiotique et son site de liaison sur le ribosome se produirait quant à elle à cause d'un changement de conformation se produisant à même le ribosome (33).

Tet(O) fait en outre partie d'un groupe de protéines appelées les protéines de protection ribosomales (RPPs); en font aussi partie les protéines Tet(M), (S), (Q), (W), (T) et Otr(A). Ces protéines partagent des homologues de séquence avec les protéines de liaison au ribosome impliquées dans la synthèse protéique (33).

Chez *Campylobacter*, le gène *tet(O)* est très répandu, et a aussi été découvert chez les bactéries positives à la coloration de Gram comme les entérocoques et les streptocoques, ce qui suggère qu'il puisse y tirer son origine.

2.7.1.7 Résistance aux sulphonamides

Les sulphonamides sont des analogue structuraux de l'acide p-aminobenzoïque (PABA) et sont donc en compétition avec ce dernier pour l'enzyme dihydropteroate synthétase (DHPS). Cette enzyme permet la modification du PABA en dihydrofolate. Le PABA ne peut donc pas être incorporé à l'acide folique, ce qui prévient la synthèse de l'ADN bactérien. En outre, ce composé est habituellement utilisé en synergie avec le triméthoprim (109) (2).

Chez les bactéries Gram négatives, la résistance à cet antibactérien est la plupart du temps due à l'acquisition via transfert horizontal de gènes, de plasmides ou de transposons codant pour un DHPS modifié provenant de bactéries résistantes aux sulfonamides. Chez les bactéries Gram positives, la résistance est due à des mutations dans le gène codant pour le DHPS. Chez *Campylobacter*, il a été démontré que la résistance est associée avec une mutation de substitution de quatre résidus d'acides aminés dans DHPS, ce qui résulte en une faible affinité de cet enzyme pour les sulphonamides (2).

2.7.1.8 Résistance au triméthoprim

Le triméthoprim est un analogue des pyrimidines qui inhibe l'enzyme dihydrofolate réductase, interférant donc lui aussi dans le métabolisme de l'acide folique et empêchant par le fait même la synthèse des pyrimidines (109).

Cet antibiotique agit principalement en se liant et en inhibant l'activité de l'enzyme dihydrofolate réductase (codée par les gènes *dfr*). La résistance à cet antibiotique serait principalement due à une acquisition, ici aussi par transfert horizontal, de gènes *dfr* modifiés auxquels le triméthoprim ne pourrait plus se lier. Chez *Campylobacter*, il a été démontré de façon spécifique que les gènes *dfr1* et *dfr9* étaient responsables de la résistance (53). Ces gènes ont été retrouvés sur le chromosome bactérien, sur des transposons et sur des intégrons (54). Les enzymes codées par ces deux gènes ont aussi

été retrouvées chez d'autres bactéries Gram négatives, principalement chez des *Enterobacteraceae*, ce qui pourrait indiquer que *Campylobacter* pourrait avoir acquis sa résistance de représentants de ce groupe.

2.7.1.9 Résistance à la bacitracine

Contrairement aux composés décrits plus haut, la bacitracine est peptidique et consiste en des acides aminés liés à des peptides (109). Son action repose sur sa capacité à former un complexe avec le C55-isoprenyl pyrophosphate, un transporteur des intermédiaires du N-acetylmuramyl pentapeptide impliqué dans la synthèse du peptidoglycan. La déphosphorylation du C55-isoprenyl pyrophosphate est inhibée par la bacitracine, empêchant le recyclage des transporteurs et inhibant la synthèse de la paroi cellulaire (25) (109).

Initialement, le mécanisme de résistance à cet antibiotique a été décrit chez les bactéries Gram positives, principalement chez l'agent producteur du composé, soit *Bacillus licheniformis* (25). Il a récemment été démontré que le gène *bacA* code pour une protéine augmentant l'activité isoprénol kinase. Ce gène, retrouvé sur le chromosome, conférerait la résistance à l'antibiotique en phosphorylant l'undécaprenol, augmentant ainsi le niveau de transporteur C₅₅-isoprenyl phosphate (28). Il a également été suggéré que le produit du gène *bacA* pourrait être impliqué dans le recyclage du C55-isoprenyl phosphate (25). Cependant, étant donné que ce gène se retrouve de façon naturelle chez des souches sensibles à la bacitracine, il est impossible de confirmer son implication dans la résistance à ce composé. Il pourrait toutefois être impliqué au niveau de la résistance naturelle chez certaines souches bactériennes.

Chez *B.licheniformis*, la résistance est quant à elle codée par les gènes de la région *bcr*. Les protéines codées par cette région (Bcr) sont des composantes d'un système de transport ABC qui pomperait la bacitracine à l'extérieur de la cellule (25). Chez *Campylobacter*, aucun mécanisme précis de résistance n'a encore été décrit. Il semble plutôt que cette bactérie soit intrinsèquement résistante au composé.

2.7.2 Utilisation d'antimicrobiens chez la volaille

Chez la volaille, les antibiotiques sont utilisés de façon thérapeutique ou en prophylaxie. Les programmes thérapeutiques ont été conçus afin de minimiser les pertes économiques reliées à la présence de maladies, tandis que la prophylaxie est utilisée avant que des signes cliniques de maladie n'apparaissent, dans le but d'éviter toute perte additionnelle. Ainsi, l'ajout d'antimicrobiens à la nourriture, appelés promoteurs de croissance, est principalement effectué dans le but de prévenir l'entérite nécrotique chez le poulet de chair.

2.7.3 Patrons de résistance observés chez des isolats de *Campylobacter* chez la volaille

De plus en plus d'études portent sur la résistance aux antibiotiques chez *Campylobacter* (1, 11, 27, 38, 43, 49, 50, 97, 128). Il est possible de constater par ces études et dans le tableau VII l'importance de la résistance aux antibiotiques, et ce, à l'échelle mondiale. Par ailleurs, comme certaines de ces résistances touchent des antibiotiques utilisés pour le traitement de gastro-entérites chez l'humain, des problèmes de santé publique importants pourraient être engendrés dans les années à venir.

Chez le poulet de chair, pas moins de 11 antibiotiques différents sont associés à des résistances chez *Campylobacter*. Les résistances à ces composés varient en importance. La tétracycline, le ciprofloxacine, l'acide nalidixique et l'ampicilline étant les antibiotiques touchés par les plus hauts taux de résistance. Par ailleurs, les degrés de résistance des antibiotiques sont très variables selon les régions à l'étude, tel que le démontre le tableau 2.9.3. Le phénomène de résistance à plus d'un antibiotique est lui aussi présent, certaines souches pouvant être résistantes à 4 antibiotiques à la fois (149), (142).

Certaines études se sont par ailleurs penchées sur les relations existant entre l'utilisation d'antibiotiques à la ferme et la résistance aux antibiotiques portée par les souches de

Campylobacter (11, 38). À la lumière de la première étude, seule une faible relation a pu être mise en évidence entre l'utilisation de l'oxytétracycline à la ferme et la résistance à la tétracycline portée par les souches étudiées par cette équipe (11). Par ailleurs, cette équipe semble suggérer un lien entre l'utilisation de facteurs de croissance et une augmentation de la résistance, sans pouvoir confirmer cette tendance.

La seconde équipe française a également tenté de comparer les niveaux de résistance observés avant et après le bannissement des promoteurs de croissance (38). Toutefois, seule une diminution de la résistance à l'ampicilline a pu être mise en évidence suite au bannissement des promoteurs de croissance, alors qu'une augmentation significative des niveaux de résistance des souches de *C. coli* pour l'ampicilline, l'acide nalidixique, l'enrofloxacin, la tétracycline et l'érythromycine fut observée(38).

L'émergence importante de la résistance aux fluoroquinolones observée par de nombreuses équipes de recherche (tableau VII) est quant à elle inquiétante. Détectée de façon plus importante dans les pays européens et aux États-Unis, il serait possible qu'elle soit reliée à l'utilisation massive de cet antibiotique de façon thérapeutique, et ce même si aucune équipe de recherche n'a pu encore le prouver. Une étude américaine a par ailleurs démontré que le maintien de souches résistantes aux fluoroquinolones chez *Campylobacter* ne constituait pas un coût énergétique supérieur, de sorte que les isolats résistants demeuraient présents chez l'hôte en absence de toute pression de sélection comme l'utilisation de l'antibiotique durant l'élevage (202).

Certaines études ont par ailleurs comparé les profils d'antibiorésistance de souches de *Campylobacter* isolées de poulet de chair et d'humains (3, 8, 43). Cependant, ces études n'ont pas permis à ce jour de mettre en évidence une relation entre les souches résistantes retrouvées chez le poulet de chair et celles retrouvées chez l'homme.

Tableau VII : Résistance aux antibiotiques de *Campylobacter* tel qu'observée dans divers pays chez le poulet de chair à l'abattoir et/ou chez le marchand.

Pays	Source	Résistance aux antibiotiques (%)											
		Amp	Azi	Chl	Cip	Cli	Enro	Ery	Gen	NAA	Str	Tet	
France ^b	Abattoir	23	-	-	-	-	17	0,3	0	25	-	-	57
Irlande du Nord ^c	Abattoir	33,2	-	0,4	2,9	-	-	-	0,4	10,1	-	-	13
Europe ^d	Abattoir	-	-	-	14,9	-	-	1	0	15,1	-	-	35,4
Hollande ^d	Abattoir	-	-	-	34,5	-	-	3,4	0	34,5	-	-	30,2
Suède ^d	Abattoir	-	-	-	0	-	-	0	0	0	-	-	0
Royaume-Uni ^d	Abattoir	-	-	-	6	-	-	6,5	0	6,5	-	-	35
Allemagne ^e	Commerce	-	6	0	24	5	-	6	0	29	-	-	69
Suisse ^f	Abattoir	3,5	-	-	1,5	-	-	9,2	-	-	-	27,7	-
Autriche ^g	Commerce	8,6	-	0,7	40,7	-	-	4	1,5	40,7	9,7	9,7	16,4
Canada ^h	Commerce	-	25	-	4	25	-	25	2	4	-	-	72
États-Unis ⁱ	Commerce	-	6	0	24	5	-	6	0	29	-	-	69

^a Amp, ampicilline; Azi, azithromycine; Chl, chloramphénicol; Cip, ciprofloxacine; Cli, clindamycine; Enro, enrofloxacin; Ery, erythromycine; Gen, gentamicine; NAA, acide nalidixique; Str, streptomycine; Tet, tétracycline.

^b (11), ^c (128), ^d (27), ^e (97), ^f Frediani-Wolf et Stephan, 2003, ^g Mayrhofer et al, 2004, ^h (142), ⁱ Gupta et al, 2004

CHAPITRE 3.

Evidence of cross-contamination by *Campylobacter* spp. of broiler carcasses using genetic characterization of isolates

Valérie Normand¹, Martine Boulianne² and Sylvain Quessy^{1*}

Département de Pathologie et Microbiologie¹ et département de Sciences Cliniques²,
Faculté Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200, rue Sicotte, St-Hyacinthe,
Québec J2S 7C6, Canada

Manuscrit soumis à Journal of Food Protection

ABSTRACT

Of the 65 *Campylobacter*-positive broiler chicken flocks at slaughter, 22 were selected for further analysis. *Campylobacter* isolates recovered from carcasses and ceca were analysed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using *KpnI* enzyme, to evaluate their genetic diversity, and to identify potential sources of carcass contamination at slaughter. Little diversity was found among *Campylobacter* strains isolated from a given carcass, with a maximum of two different genotypes being present. At lot level, the maximum number of different profiles found was 4. A total of 39 different macrorestriction profiles were obtained and two main sources of contamination were identified: *ante mortem* and *post mortem* contamination. Dendogram showed that strains isolated from ceca were similar to those isolated from corresponding broiler carcasses. Surprisingly, some flocks shared related genotypes both with and without sharing similar rearing practices. There were also evidences of *Campylobacter* cross-contamination between broiler flocks in slaughterhouses in Quebec.

INTRODUCTION

Campylobacter spp., is one of the leading cause of human bacterial foodborne infections, with an isolation rate of 12,9 cases per 100 000 in 2004 in USA (30). There are many evidences that poultry meat is a frequent source of human infection although many other sources are suspected (48). Indeed, *Campylobacter* is frequently isolated from normal chicken small intestines and ceca microflora, and gut colonization is well documented (15, 62, 118, 157). Intestinal content is therefore suspected to be the main source of broiler carcass contamination at slaughter (19). Even if many efforts have been deployed to decrease bacterial carcass contamination at slaughter with the implementation of HACCP programs, a significant proportion of broiler carcasses is still contaminated with *Campylobacter* (119) (114). However, diversity degree of *Campylobacter* on broiler carcasses and in broiler ceca is not fully determined, as only some studies mentioned it (120) (67). Many studies in USA and Europe have evaluated the importance of cross-contamination at the slaughterhouse level (105, 120, 152). However, occurrence and importance of cross-contamination is highly dependant of slaughter practices and may vary from one country to another. To our knowledge, no study has been performed in the province of Quebec to assess the importance of cross-contamination at slaughter.

Our first objective was to verify for the presence of *Campylobacter* on chicken broiler carcasses and in corresponding pooled ceca. The second was to evaluate genotypic diversity of those isolates within individual carcasses and pooled ceca, within lots and within slaughterhouse for a given slaughter day, using Pulsed-Field Gel Electrophoresis genotyping on recovered isolates.

MATERIALS AND METHODS

Rearing, transportation and slaughter conditions. For each slaughtered flock, a questionnaire was sent to producers and slaughterhouse's foremen. Questions were relative to hatchery, rearing practices, feed mill origin and transportation.

Bacteriological samples. A convenient sample of broiler chicken flocks with *Campylobacter* isolated from both carcasses and ceca in a minimum of five birds were used for this study. These flocks were initially part of a larger study on *Campylobacter* prevalence and risk factors conducted on 82 broiler chicken flocks slaughtered in Quebec, Canada (Arsenault et al, submitted for publication). A total of 2372 carcasses were sampled by carcass rinsing as previously described (36, 96). Briefly, each carcass was taken following evisceration, right after the 20 ppm chlorinated shower, placed in a plastic sterile bag containing 400 ml of buffered peptone water (Beckton-Dickinson (BD), Franklin Lakes, NJ, USA) and were vigorously shaken for 45 to 60 seconds. Each corresponding ceca was taken after evisceration process, placed in a identified sterile plastic bag, stored on ice and analysed for the presence of *Campylobacter* in the next 3 hours.

***Campylobacter* isolates.** For carcass samples, 25ml of each carcass rinse were mixed with the same volume of double-strength Bolton broth (Oxoid Ltd, Hampshire, U.K.) supplemented with cefoperazone (20mg/l), vancomycine (20mg/l), trimethoprim (20mg/l) and cycloheximide (50mg/l) (SR0183, Oxoid Ltd), and incubated for 24 h at 42°C. 10 µL of each sample was then inoculated on mCCDA medium (Oxoid Ltd) supplemented with cefoperazone (32mg/l) and amphotericine B(10mg/l) (SR0155, Oxoid Ltd) and incubated microaerobically (CampyEzPak, BD) for 48 h at 42°C in jars (BD GasPak EZ Container Systems, BD). Ceca were pooled in three groups of 10 ceca each, and the surface of each one was sterilized by heat searing with a hot spatula. Cecal contents was collected from one ceca of each bird with a sterile swab and put in a sterile stomacher bag (M-Tech Diagnostic, Warrington, Cheshire, England) containing 10 ml of PBS and gently homogenized. Media used for cultivation were the same as described by Gun-Munro et al. (61). Cecal content was put directly on a selective mCCDA medium

and incubated under microaerobic conditions as described above. For each carcass and cecal pool, presumptive *Campylobacter* colonies were analysed by Gram stain morphology and mobility under phase-contrast microscopy. Typical colonies were then inoculated on 5% sheep blood agar (Quelab Laboratories, Montreal, Quebec, Canada) at 42°C for 48 h under microaerobic conditions. In order to achieve identification at the species level, routine biochemical tests (oxidase and catalase reactions (Remel, Lenexa, KS, USA) and indoxyl acetate and hippurate hydrolysis (BD)) were done on colonies as previously described (166). *Campylobacter* isolates were freeze-stored at -80°C in a brucella broth (BD) with 15% glycerol (BD) until further analysis.

***Campylobacter* diversity analysis.** To better define *Campylobacter* genotypic diversity on each positive carcass and corresponding pooled ceca, three to five individual colonies of *Campylobacter* were analyzed by the PFGE technique for every positive carcass and pooled ceca.

Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). Between July 2003 and February 2004, twenty-two lots were selected (out of 82) according to the number of positive carcasses in a flock, a minimum of five positive carcasses being necessary in at least one lot on a slaughter day. DNA preparation was done in accordance with the protocol established by Michaud et al. (104), with some modifications. Briefly, *Campylobacter* were grown for 48 h on 5% sheep blood agar (Quelab Laboratories) at 42°C under microaerobic atmosphere. Colonies were harvested and resuspended in 1000 µL of cold cell suspension buffer (100mM Tris, 100mM EDTA, [pH 8,0]), and optical density (O.D.) was adjusted at a value of 2,0 at 405 nm. 340 µl of each adjusted suspension were then transferred in 1,5 ml vials containing 12,5 µl of 20 mg/ml proteinase K (Qiagen, Mississauga, Canada), gently mixed and kept on ice until the next step. 170 µl of 1,5% SeakemGold agarose (Cambrex, East Rutherford, NJ, USA) prepared in 9 mL TE (10mM TRIs, 1mM EDTA) were mixed with 1ml of SDS 10% (Sigma Chemical Co., St-Louis, Mo, USA), added to the 352,5 µl of bacterial suspension, dispensed in plug moulds and allowed to solidify for 20 minutes at 4°C. Plugs were then incubated in 5ml cell lysis buffer (50mM Tris, 50mM EDTA, [pH 8,0], 1% N-Lauroyl Sarcosine)

containing 25 µl of 20mg/ml proteinase K (Qiagen) in a shaking water bath (150rpm) for 2 h at 54°C. Plugs were then washed 6 times in a 54 °C shaking water bath: twice with 20 ml of preheated (54°C) sterile water and four times with 15 ml of preheated (54°C) sterile TE (10mM Tris, 0,1mM EDTA [pH 8,0]). After the last wash, plugs were stored at 4°C in 5 ml TE (10mM Tris, 0,1mM EDTA) until digestion was conducted. According to previous observations (195), a 45 minutes under 60V tension step of preelectrophoresis was done on each plug. Plugs were then placed in 1,5 ml vials containing 267 µl of sterile water, 3 µl of bovine serum albumin (BSA) (100mg/ml) and 30 µl of NEB buffer I 10X (New England Biolabs Inc, Beverly, Ma, USA) and incubated for 1 h at 37°C. Plugs were then transferred in new 1,5 ml vials containing the same as mentioned above, 30 Units of *KpnI* enzyme (New England Biolabs Inc) were added and the DNA was digested for 5 h at 37°C. Fragments were then separated by electrophoresis under 200 V for 14h at 14°C in 1% SeakemGold agarose gel (Cambrex) and in 0,5X TBE (Tris-borate-EDTA) with Gene Navigator apparatus (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) with interpolation pulse time of 4 s for 7 h and 13,6 s for 7 h. As suggested by Hunter et al. (73), a *Salmonella* serotype Braenderup (strain H9812) digested with restriction enzyme *XbaI* (New England Biolabs Inc) was used as molecular weight and placed in lanes 1, 8, 14 and 21 of a 21 lane gel. Lanes number 2 and 20 were filled with a *Campylobacter jejuni* (LSPQ 3234) as reproducibility strain.

Gels analysis. Macrorestriction profiles were analysed with Bio Numerics Software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Restriction fragments were identified visually, and normalized by interpolation to the nearest reference lane. Optimization of 1% and a position tolerance of 2% were applied. Dice Coefficients were established on the basis of pairwise comparisons of the PFGE patterns of isolates. Coefficients matrix was used to generate dendrograms based on the unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA).

RESULTS

***Campylobacter* isolation from broiler chicken carcasses and pooled ceca.** Sixty-nine percent (57/82) of sampled broiler flocks were *Campylobacter* positive at carcass level (approximately 30 carcasses per lot), with a prevalence of 25% of them higher than 50%, while 27,2% of flocks were *Campylobacter* positive at the pooled ceca level (approximately 3 pools of 10 ceca per lot). *C. jejuni* were isolated from 89% of the carcasses and 100% of the *Campylobacter* positive pooled ceca, and *C. coli*, from 11% of *Campylobacter* positive carcasses.

Diversity of PFGE fingerprinting patterns on 97 broiler chicken carcasses and 16 pooled ceca. A limited number of different genotypes were isolated on carcasses or in pooled ceca. Of the 365 colonies analysed to determine diversity level on 97 carcasses, only six of them found on six different carcasses presented a profile different from the others (Table VIII: Flock 128, profile R; flock 129 profile B; flock 160 profile AA; flock 175, profile I I; flock 191, profile CC; flock 198, profile LL). For pooled ceca, the same genotype was obtained for all five isolates in 15 out of 16 pools. The other pooled ceca showed 2 out of 5 colonies associated to a different genotype (Flock 160, pool 178, profile AA; table 2).

Diversity of PFGE genotypes recovered from different slaughtered flocks at slaughterhouse. Thirty-nine different genotypes were obtained from 21 chicken lots (Table VIII; A to MM), regardless of sample source (carcasses or pooled ceca). Within a given flock, it was possible to identify up to four different profiles on a chicken carcass (flock 197, Table VIII). Generally, when there was more than one genotype within a flock, one of them was found at a higher frequency than the others (Table VIII). For a given slaughter day, carcasses genotypes were most of the time shared by two flocks when they were slaughtered consecutively (Table VIII: flocks 109 and 112 (S), 175 and 176 (GG), 187 and 188 (EE), 190 and 191 (JJ); Figure 1: flocks 128 and 129 (W)). Furthermore, flocks slaughtered on a same day, but on a non-consecutive way expressed different genotypes on their carcasses (Table VIII; flocks 160 and 164, 196 and 197).

In most of “ceca positive flocks”, macrorestriction profiles found in the ceca were the same than those found on carcasses (Figure 1: lot 128 (R)). Exceptions were flocks 82, 128 and 187, which appear to be colonized by different subtypes for their respective carcasses and ceca (Table VIII; 82: G and O vs. K; 128: W vs. R; 187: EE vs. T).

Some flocks slaughtered on different days and slaughterhouses can also be colonized by similar *Campylobacter* genotypes. This fact was observed twice during the study: flocks 109, 112 and 149 and flocks 164, 175 and 176 (figure 1). Interestingly, birds from flocks 109 and 149 came from the same hatchery (A), and were fed with feed purchased from the same feed mill (C) (Table VIII).

DISCUSSION

Poultry colonization with *Campylobacter* is a well recognized and reported observation (119) (71) (168) (136) (118). Even if *Campylobacter* has been isolated from chicken feces at both poultry farm and slaughterhouses (138) (66) (136), only limited data are available regarding level of chicken carcass contamination or carriage at slaughterhouse (105) (120) (152) (66). Some authors have suggested the existence of cross-contamination between slaughtered lots (114). However, it has been seldom demonstrated (105, 120) (152). Those studies have reported that *Campylobacter* isolates found in feces of chicken were the same than those found on birds carcasses at slaughterhouse in Japan, United Kingdom and France respectively.

As shown in table VIII, the number of different PFGE profiles recovered from carcasses and pools of ceca was as many as 39. There was little diversity present on each carcass and in pooled ceca from individual broilers at slaughter. The maximum number of different isolates observed on a given carcass or pooled ceca was two, which is similar to another study (120). However, even if we detected as much as four different genotypes in a given flock, one profile seemed to prevail over the others. These findings could help understanding of previous inconsistent studies from Nadeau et al. (114) and Hiatt et al. (66). The first one observed only one single dominant genotype in feces of positive lots in Québec, whereas Hiatt et al. reported as many as six distinct clones within a flock. Our results suggest that recovery of only one genotype is not necessarily indicative of a unique source of contamination, as a dominant genotype can be present with different minor ones. Moreover, Hiatt et al. (66) also reported that while one predominant clone was observed, diversity found on final products seemed reduced relatively to the high number of clones found on the farm. Since our protocol and the one use by Nadeau et al. strictly involved slaughterhouse sampling, this could explain the low level of diversity recovered within the majority of studied flocks.

Rivoal et al. (152), Newell et al. (120) and Hiatt et al. (66) have previously shown that carcasses at slaughter were mainly contaminated by *Campylobacter* originating from chicken ceca. Our results concur with those observations. Indeed, one can note in table

VIII that genotypes found in pooled ceca were, in six out of 8 lots, also found on chicken carcasses of respective flocks. This is strongly suggestive of a *post mortem* contamination of birds occurring at the slaughterhouse. Another fact sustaining this hypothesis was the recovery of common genotypes on carcasses of consecutive slaughtered lots. As shown in table VIII, this phenomenon was observed every time flocks were slaughtered in a consecutive manner (flocks 109,112; 128,129; 175,176; 187,188; 190 and 191). This carriage of strains from one flock to another have been shown by previous studies (66, 120, 152), and this is the first report of cross-contamination for *Campylobacter* in the province of Québec.

Another finding suggested by this study is an *ante mortem* contamination of broiler chickens originating from independent farms. One can observe in table VIII and figure 3 that some genotypes (S and GG) were found on carcasses of flocks not slaughtered on a same day and at different slaughterhouses (109,112 and 149 and 164, 175 and 176). After further analysis of rearing conditions for these lots, it appears that only the hatchery and the feed mill were the common links for two of these flocks (109 and 149). However, as the first two flocks were slaughtered on a consecutive way and that the genotype of lot 109 was also "S", it would be possible that strains carriage occurred from flock 109 to flock 112, but that flocks 109 and 149 were contaminated from a common source, hatchery, feed mill, trucks or slaughter staff. There were however also flocks supplied with common hatcheries and feed mill in our study which did not share similar genotypes. Nevertheless, those observations have suggested that some flocks can be colonized with similar strains, without showing evidence of common rearing origins (flocks 164, 175 and 176; 196 and 198). Other authors (66, 114, 120, 138, 152, 162) have also suspected the existence of external sources of contamination, such as hatchery, breeder hens or transport. However, none of those studies proved any of those hypotheses.

The enrichment media we used could have influenced genotypes found on broiler carcasses. Since enrichment was used only for carcass rinses, and that similar genotypes

were found both on carcasses and in pooled ceca, this variable does not seem to have had an important impact on strain selection and diversity.

This study has shown that a large diversity of strains can exist among broiler flocks, and that there are multiple sources of broiler carcasses contamination at slaughterhouse, the major one being fecal contamination of carcasses. Even if it was impossible to identify a single and most important source, *ante mortem* contamination could occur either before or during rearing or transport, and *post mortem* contamination of birds could happen before, during or following evisceration process. As we tested after evisceration, it is impossible to assess if contamination happened before, during or following evisceration. Moreover, these sources may coexist in a given flock. Further typing studies of hatcheries, farm environment and transport practices might be helpful to elucidate the kinetics of broiler chicken *Campylobacter* contamination at slaughter.

AKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant from the Canadian Food Safety Adaptation program of the Agriculture and Agrifood Canada and the Canadian Poultry and Egg Processors Council and its Quebec members with the help of the Fédération des Producteurs de Volaille du Québec, The Association Québécoise des Industries de Nutrition Animale et Céréalière et The Association des Couvoiriers du Québec. We thank all the team of Research Chair in Meat Safety and the Research Chair of Poultry Research of the Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal. A special thank to Dre Sophie Michaud from Sherbrooke University for her precious help and collaboration for molecular typing.

TABLE VIII. Genotypes of *Campylobacter* isolates recovered from broiler carcasses and pools of ceca for different broiler flocks and slaughter days in Québec, using *KpnI* digestion and PFGE.

Flock number	Slaughter dates ^a	Slaughterhouse	Carcasses genotypes ^{b,c}	Pooled ceca genotypes ^{b,c}	Hatchery ^d	Floor-milling ^d
82	21/08/2003	D	G(5/25),O(20/25)	K (15/15)	H	C
88	28/08/2003	C	X(5/10),DD(5/10)	^e	H	mixmill
93	04/09/2003	B	Q(25/25)		K	F
109	25/09/2003	D	S (25/25)	S (10/10)	A	C
112	25/09/2003	D	S (25/25)		J	J
128	16/10/2003	A	R (11/30),W (19/30)	R (15/15)	K	V
129	16/10/2003	A	B(1/14),V(3/14), W(9/14)		C	I
149	12/11/2003	C	S (12/15)		A	C
150	18/11/2003	A	HH (15/15)		A	Z
160	03/12/2003	D	AA(1/15),BB(14/15)	BB(8/10),AA (2/10)	H	W
164	03/12/2003	D	GG (15/15)	GG(15/15)	H	C
175	07/01/2004	B	GG (14/15), II (1/15)		A	I
176	07/01/2004	B	MM(3/15),GG(11/15)		C	D
183	14/01/2004	C	D (3/15),N (12/15)		F	R
187	21/01/2004	D	EE (14/15)	T (5/5)	H	W
188	21/01/2004	D	EE (15/15)		A	C
190	26/01/2004	A	U(6/15),Z(3/15),JJ(6/15)	Z (5/5)	A	N
191	26/01/2004	A	CC (1/15),JJ(14/15)		J	J
196	03/02/2004	D	L(3/15),Y(6/15), M(3/15)	M (5/5)	H	G
197	03/02/2004	D	A(3/15),F(6/15),I(3/15),J(3/15)		H	P
198	05/02/2004	D	E (3/9),KK(2/9), LL(1/9)		J	J

^a Slaughter date (dd/mm/year)

^b Fractions between brackets represent the number of isolates associated with the given genotype

^c Each letter or group of letters represents a different genotype

^d Each letter under hatchery and floor-milling represents different hatchery and floor milling. Hatchery and floor-milling are not related.

^e Grey boxes represent pools of ceca negative for *Campylobacter*

^f For same slaughter dates, flocks with a vertical line on their left side were slaughtered consecutively at slaughterhouse.

^g Each number represents different transport company.

CHAPITRE 4.

Antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. strains isolated from broiler chickens at slaughterhouse and description of previous antimicrobial use

Manuscrit en preparation

SUMMARY

Use of antibiotics as therapeutics or preventives in food animals is often pointed out as a possible cause of antibiotic resistance among bacteria. The aim of this study was to describe resistance profiles for *Campylobacter* isolates recovered from broiler chicken at slaughter, and to verify for a possible association between previous antibiotic use in broiler chicken farms and occurrence of resistance among *Campylobacter* spp. Isolates were recovered from broiler chicken carcasses (n=97) and pooled ceca isolates(n=17) from a total of 22 different flocks raised in Quebec. Information pertaining to medication was obtained with a questionnaire filled by the producer. Data was validated with veterinarians at the hatchery and the feedmill. Antibiotic resistance analyses were done by an agar dilution method using 12 antibiotics. Isolates showed resistance to seven different antimicrobials, with 100% and 98% of bacteria being resistant to zinc bacitracin and ceftiofur, respectively. Multiresistance was also observed; one strain was resistant to seven drugs, and nine were resistant to six different antibiotics. The majority of the other strains (65) were resistant to three antibiotics. Resistance to ceftiofur was often (100% and 98% of strains isolated from pooled ceca and carcasses respectively). Since 100% of the sampled flocks received ceftiofur at the hatchery, we have no control group which could allow us to conclude that there is an association between previous use of antibiotics and observed resistance. No link between use of antibiotics at the farm level and resistance was observed among *Campylobacter* isolates.

INTRODUCTION

Campylobacter has been recognized as an important cause of human bacterial gastroenteritis during last decades with contaminated and undercooked chicken often being associated with clinical cases (48, 107)). Numerous studies have demonstrated that *Campylobacter* is often isolated from broiler chicken carcasses (Normand et al., submitted for publication) (71) (76) (63) (120) (157), hence increasing chances for human exposure to this pathogen. Antimicrobials currently used in humans to treat campylobacterosis are mainly macrolides and fluoroquinolones (107). However, development of resistance to these antimicrobials is on the rise. European studies have reported that this trend has also been observed for *Campylobacter* isolates recovered from poultry (2, 107) (27, 38).

Many antibiotics can be used in poultry whether as preventives or therapeutics (25), but the impact of this antimicrobial use on resistance is not fully understood. At farm level, antimicrobial are also routinely used at therapeutic level to prevent reoccurrence of pathological conditions. Even if *Campylobacter* does not cause any significant clinical condition in poultry, it causes acute gastro-enteritis when transmitted to human. Some studies have suggested that resistance mechanism present in microorganisms could be transferred through the food chain to human (8, 9).

The past few years, increased antibiotic resistance rates observed among bacteria, especially *Campylobacter*, have raised public health concern. As human treatments available are limited, emergence of antibiotic resistance could reduce efficacy of these compounds. Antibiotics are also used in poultry wheter for preventive or curative purposes. It is thus not clear which type of antimicrobial use can affect antimicrobial resistance profiles of microorganisms. Objectives of this study were to describe antibiotic resistance among *Campylobacter* strains isolated from broiler chicken carcasses and pools of ceca, and to verify for a possible relationship between observed resistance profiles in pooled ceca and previous antimicrobial use in corresponding flocks.

MATERIALS AND METHODS

Sampling procedures. A convenient sample of broiler chicken flocks with *Campylobacter* isolated from both carcasses and ceca in a minimum of five birds were used for this study. These 21 flocks were initially part of a larger study on *Campylobacter* prevalence and risk factors conducted on 82 broiler chicken flocks slaughtered in Quebec, Canada (10). Carcasses were sampled by carcass rinsing (36, 96). Briefly, each chosen carcass were placed in a sterile plastic bag with 400 ml of Difco buffered peptone water (Beckton-Dickinson (BD), Franklin Lakes, NJ, USA) and were vigorously shaken for 60 seconds. Ceca were aseptically removed from the birds and placed in a identified sterile plastic bag until further analysis. Samples were stored on ice and analysed for the presence of *Campylobacter* within the next 3 hours.

Rearing conditions and birds treatments information. For each slaughtered flock, a questionnaire was sent to producers. This questionnaire included a section on medication, and data pertaining to drug use was validated with veterinarians at hatchery and feedmill.

Isolation and identification of *Campylobacter* isolates. Media used for culture were the same as described by Gun-Munro et al. (61). For carcass samples, 25 ml of carcass rinses were first incubated for 24 h at 42°C with an equal volume of double-strength Bolton broth (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK.) supplemented with cefoperazone (20 mg/l), cycloheximide (50 mg/l), trimethoprim (20 mg/l) and vancomycin (20 mg/l) (SR0183, Oxoid Ltd). 10 µL of each sample was then streaked on mCCDA medium (Oxoid Ltd) supplemented with cefoperazone (32 mg/ml) and amphotericin B (10 mg/l) (SR0155, Oxoid Ltd) and incubated microaerobically for 48 h at 42°C. Contents of the first ten ceca were then plated on a selective mCCDA plate (Oxoid Ltd) and incubated under microaerophilic atmosphere as described above. For each sample, presumptive *Campylobacter* colonies were analysed by Gram stain morphology and mobility under phase-contrast microscopy. Typical colonies were then inoculated on 5% sheep blood agar (Quelab Laboratories, Montreal, Quebec, Canada) at 42°C for 48 h under microaerophilic conditions and routine biochemical tests (oxidase and catalase reactions

(Remel, Lenexa, KS, USA) and indoxyl acetate and hippurate hydrolysis (BD)) were done on colonies as described previously (166). *Campylobacter* strains were freeze-stored at -80°C in a Brucella broth (BD) with 15% glycerol (BD) for further analysis.

Antimicrobial susceptibility testing. Antimicrobial susceptibility testing was done on 22 broiler chicken flocks where a minimum of five carcasses were positive for *Campylobacter*. In a previous study, we observed that genetic profiles of five different colonies found on broiler carcasses at slaughter were, in most cases, similar to those found in bird's ceca (123). Thus, one representative isolate by carcass and pooled ceca was further characterized. Analyses were conducted by agar dilution according to the National Comity for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) documents M31-A2 and M31-S1 (115, 116).

Antimicrobials tested were ampicillin (amp), azithromycin (azm), zinc bacitracin (bac), ceftiofur (cef), chloramphenicol (chl), ciprofloxacin (cip), clindamycin (cli), erythromycin (ery), gentamicin (gen), nalidixic acid (nal), tetracycline (tcy) and trimethoprim-sulfamethoxazole (STX). Dilutions used were 0,125 µg/mL to 256 µg/mL for each antibiotic. Reference strains used were *Campylobacter jejuni* (ATCC 33560), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). Breakpoints used for *Campylobacter* spp resistance are cited in table 1 (115, 116) (142).

RESULTS

Antimicrobial susceptibility analysis of *Campylobacter* strains isolated from broiler carcasses and pooled ceca. A total of 124 *Campylobacter* isolates recovered from 97 broiler carcasses and 17 pooled ceca were analysed for antibiotic susceptibility. As much as seven different antibiotic resistance profiles were found among carcass and pooled ceca isolates (Figure 1, Table X). None of the tested isolates were resistant to neither ciprofloxacin nor nalidixic acid. Highest resistance levels were obtained for zinc bacitracin, ceftiofur and tetracycline, with respectively 100%, 97% and 80% of tested isolates being resistant (Figure 2). Percentage of resistance to azithromycin, clindamycin and erythromycin were similar (Figure 2). Resistance to ampicillin was found in only 18% of *Campylobacter* isolates recovered from pooled ceca and carcasses.

Multidrug resistance. Resistance to two or more antimicrobials was observed for 100% of tested strains. When a *Campylobacter* strain was found resistant to one antimicrobial, it was resistant to a minimum of two other antimicrobials (Table XI). The resistance profile most frequently encountered was zinc bacitracine-ceftiofur-tetracycline. Respectively 70% and 65% of strains recovered from pooled ceca and carcasses strains were resistant to that antibiotic group (data not shown). In most cases, azithromycin resistance was present along with clindamycin and erythromycin resistance (Table XI).

Antibiotic resistance according to previous antimicrobial use in the corresponding flock. Ceftiofur-resistant *Campylobacter* isolates were found in 98% of pooled ceca isolates in this study. Since all sampled flocks in the present study received a ceftiofur injection at the hatchery at one day of age or *in ovo* (Table XI), there was no control group to compare results with. No other association between presence of drug resistance and previous use of antimicrobials in flocks was demonstrated.

DISCUSSION

The use of antimicrobials in food animals has raised concerns with the emergence of resistance. Possible existence of selective pressure applied by antibiotics on resistant bacteria, and potential transfer on human infection has been suggested by some authors (8, 9). There is no study available pertaining to *Campylobacter* antimicrobial resistance in relationship with previous antimicrobial use in Quebec. Objectives of our study were to describe observed antimicrobial resistance in *Campylobacter* isolated from broiler chicken carcasses and pooled ceca, and then to verify any possible correlations with previous use.

Resistance was observed for seven different antimicrobials (Table XI), which is consistent with data already present in literature for *Campylobacter* isolated from poultry ceca or carcass at slaughter (11), (128), (27), (38) (142). In most of those studies, tetracycline was the antimicrobial showing the highest level of resistance, followed by ampicillin and ciprofloxacin. Tetracycline resistance was also important in our study (more than 80% of all isolates, figure 2), which is consistent with these studies. Other Canadian studies also reported a high level of resistance for this antibiotic in human clinical cases (55) (49) and in retail chicken (142).

Ampicillin resistance was present in only three pooled ceca isolates out of 17, whereas resistance to ciprofloxacin was not detected in any of our isolates. Resistance to ampicillin (11, 27, 38, 128) has only been reported in Europ. One can wonder about possible differences observed in antimicrobial use in poultry between Europe and Canada, which could explain differences observed in antimicrobial resistance patterns. However, no other Canadian studies have found very high level of ciprofloxacin resistance in *Campylobacter* isolates, the highest reported level being 4% for *Campylobacter* isolated from retail chicken (142).

Revision of treatment records showed that in studied broiler chicken flocks, zinc bacitracin and ceftiofur resistance were very common, with almost 100% of *Campylobacter* isolates being resistant for both antibiotics (Table X). For bacitracin,

some authors suggest to refer to non sensitivity or intrinsic resistance. However, since this growth promoter was used in nine of the 21 flocks under study, it is still possible that exposition of isolates to that product could have increase their insensitivity, leading to resistance levels observed here.

To our knowledge this is the first report of ceftiofur resistance for *Campylobacter*. High percentages of resistant isolates observed in this study could probably be explained by the fact that every chicks sampled in this study was injected with antibiotic either *in ovo* or at one day of age. *Campylobacter* isolates ancestors were thus exposed to this drug, which could have led to development of resistance. This resistance could thus have been transmitted along with generations. We cannot rule out the fact that media used to isolate strains contained cefoperazone, another cephalosporin (32mg/l in mCCDA and 20mg/l in Bolton Broth). Resistant or non-sensitive *Campylobacter* isolates to this antibiotic could have been selected during isolation process. However, as isolates are resistant to relatively high antimicrobial concentrations (until 256mg/l), it does not seems very probable that antimicrobial present in media could have led to that level of resistance development. As control strains were all susceptible to ceftiofur, impact of this antibiotic in the media does not seem important. Yet, further analysis is needed to confirm whether observed resistance is caused by presence of resistance genes, or if it is intrinsic. Exact resistance mechanism will also have to be demonstrated. As every flock of this study received ceftiofur at hatchery or *in ovo*, it is impossible to compare results with negative flock. It could however be interesting to compare actual *Campylobacter* resistance with strains isolated from chicken several years ago.

A Canadian report has also noted an increase in *Salmonella* isolates resistant to ceftiofur (142). Following these observations, the Association Québécoise des Couvoiriers voluntary stopped the systematic injection of ceftiofur (Excenel®) to chicks. It could be interesting, in the future, to investigate the effects of this decision on resistance profiles of bacteria, mainly *Campylobacter* and *Salmonella*.

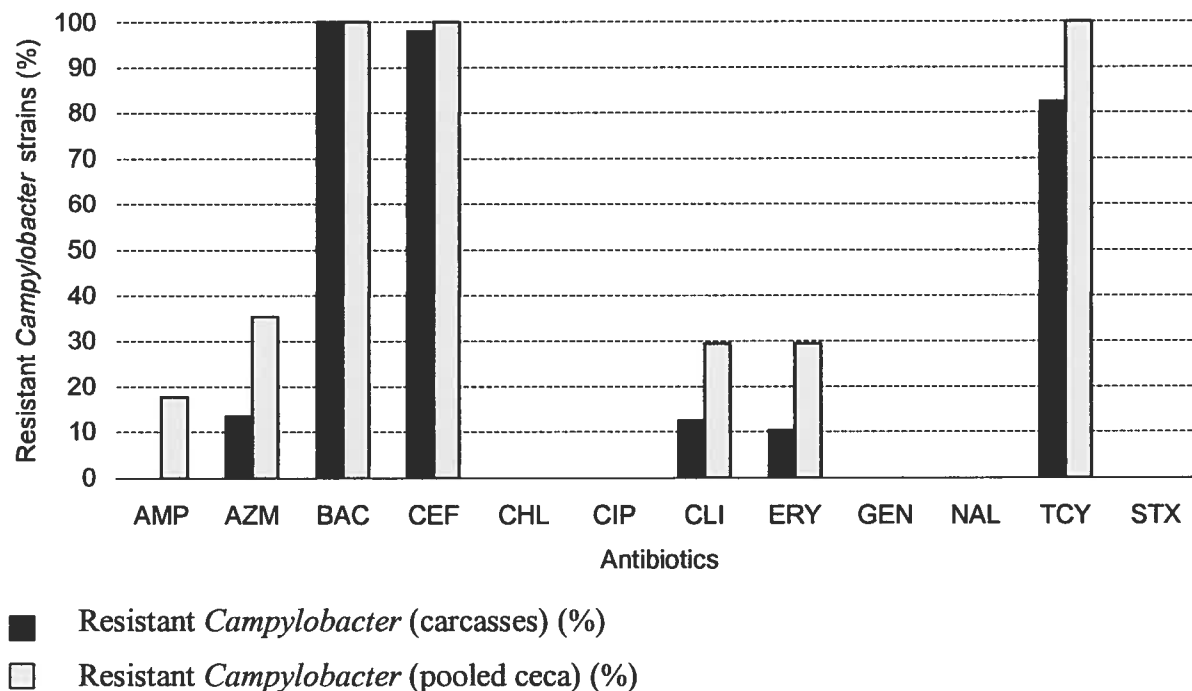
Similar levels of azithromycin, clindamycin and erythromycin resistance were also reported (Figure 2), previously in the literature for retail chicken (142). These antimicrobials are part of Macrolides-Lincosamids-Streptogramins B family (MLS_B), and some bacteria are recognized to use analogous resistance mechanism for drugs of this group, more precisely a point mutation in alanine residues 2058 and 2059 of rRNA 23S (43) (143). This could explain similar resistance percentages observed. Even if those antimicrobials were not given to chickens during the study, drugs belonging to the same class, tylosin and virginiamycin have been used (table XI). It raises the possibility that observed resistance could have emerged from the use of those products. However, this hypothesis has to be investigated further more.

Multi-resistance observed by this study is of concern for the medical authorities, given the fact that some of those antibiotics are used to treat human campylobacteriosis cases (55). Our results demonstrate the complexity of antimicrobial resistance acquisition by bacteria and the need for further studies to verify overtime the effects of antimicrobial use and the development of resistance. Further characterization of strains at the molecular level is needed to better understand molecular epidemiology of antimicrobial resistance observed in this study.

AKNOLEDGMENTS

We thank members of the team of Research Chair in Meat Safety of the Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal. A special thank to Dre Évelyne Guévremont for technical advices.

FIGURE 2: Antibiotic^a resistance of *Campylobacter* strains recovered from broiler chicken carcasses (n=97) and pooled ceca (n=17) at time of slaughter between July 2003 and February 2004.



^aAMP, ampicillin; AZM, azithromycin; Bac, zinc bacitracin; CEF, ceftiofur; CHL, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TCY, tetracycline; STX, trimethoprim sulfamethoxazole.

TABLE IX : MICs distribution of *Campylobacter* strains recovered from broiler chicken carcasses (n=97) at time of slaughter between July 2003 and February 2004, at four big Quebec slaughterhouses.

Antibiotics	Breakpoints (mg/L)	MICs(mg/L) distribution (%) ^a													
		<0,125	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
Ampicillin	≥32		3,1	1,0		2,1	17,5	47,4	28,9						
Azithromycin	≥2	34,0		40,2	10,3	1,0		1,0	0	8,2	5,2				
Zinc bacitracin	*													22,7	77,3
Ceftiofur	≥8			2,1	0	2,1	0	1,0	28,9	18,6	47,4				
Chloramphenicol	≥32			3,1	19,6	34,0	42,3	1,0							
Ciprofloxacin	≥4	51,0	3,1	22,9	18,8	3,1	1,0								
Clindamycin	≥8	2,1		6,2	34,0	34,0	11,3			1,0	11,3				
Erythromycin	≥8	14,4		9,3	26,8	38,1	2,1	1,0		2,1	6,2				
Gentamicin	≥16	26,8		11,3	28,9	33,0									
Nalixic acid	≥32								52,6	34,0	13,4				
Tetracycline	≥16	10,3		7,2	1,0	3,1	1,0	1,0	3,1	4,1	24,7	38,1	4,1	1,0	
Trimethoprim-sulfamethoxazole	≥4/76	5,1	8,9	34,7	22,6	18,2	10,5	1,0							

^aBold numbers indicate resistant strains

* No precise breakpoint was available for *Campylobacter*

TABLE X: Use of antimicrobials for broiler flocks sampled between July 2003 and February 2004 and corresponding antimicrobial resistance profiles (n=21)

Flock number	Hatchery ^a	Feed (therapeutics) ^d	Feed (preventive) ^a	Antibiotic resistance
				(Pooled ceca) ^a
82	Cef		Tyl Vir	Bac,Cef,Tcy
88	Cef		Bac	
93	Cef		Vir	Amp, Azm, Bac, Cef, Cli, Ery, Tcy
109	Cef		Tyl	Bac, Cef, Tcy
112	Cef		Aci Bac Vir	
128	Cef		Bac Vir	Bac, Cef, Tcy
129	Cef		Aci Tyl	
149	Cef		Tyl Vir	
150	Cef		Aci Bac Vir	
160	Cef		None ^b	Bac, Cef, Tcy
164	Cef		None	Bac, Cef, Tcy
175	Cef		Aci Bac	
176	Cef		Aci Vir	
183	Cef		Aci Bac	
187	Cef		None	Azm, Bac, Cef, Cli, Ery, Tcy
188	Cef		Aci Tyl Vir	
190	Cef	STX	Vir	Amp, Azm, Bac, Cef, Cli, Ery, Tcy
191	Cef		Bac	
196	Cef		Tyl Vir	Bac, Cef, Tcy
197	Cef		Aci Bac	
198	Cef		Bac	

^aAMP, ampicillin; AZM, azithromycin; Bac, zinc bacitracin; CEF, ceftiofur; CHL, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; GEN,

gentamicin; NAL, nalidixic acid; TCY, tetracycline; STX, trimethoprim-sulfamethoxazole ; Tyl, tylosin; Vir, virginiamycin;

^bNone : No growth promoter used

^cGrey cases indicate *Campylobacter*-negative pooled ceca

^dGrey cases indicate no use of growth promoters

CHAPITRE 5. DISCUSSION GÉNÉRALE

5.1 Isolement de *Campylobacter* à partir de carcasses de poulets à griller à l'abattoir

La colonisation de la volaille par *Campylobacter* est un phénomène courant et bien documenté (62, 157) (129) (18) (71) (80) (118) (7) (168). Bien que cette bactérie ne soit pas un pathogène à proprement parler pour cette espèce animale, elle se retrouve souvent associée à son tractus gastro-intestinal comme partie intégrante de la flore bactérienne normale (15) (167) (62) (118). Ainsi, la présence de *Campylobacter* dans les fèces de volaille, et en particulier dans celles du poulet de chair, a souvent fait l'objet d'études dans divers pays, tant à la ferme (74, 168) (18) (66, 151, 162) qu'à l'abattoir (18, 71, 74, 80) (194) (19) (76, 138) (114, 136)

Chez l'homme, *Campylobacter* cause des gastro-entérites sévères, la plupart du temps dues à l'ingestion de viande de volaille contaminée par la bactérie. Il est donc d'une grande importance d'avoir un aperçu du niveau de risque encouru par l'homme, et de façon plus précise, de déterminer quelle est l'importance de la contamination des carcasses de volaille à l'abattoir par *Campylobacter*. Ces dernières années, l'implantation de systèmes HACCP au sein des abattoirs a entraîné une diminution de la contamination par les pathogènes alimentaires tels *E. coli*, *Salmonella* et *Campylobacter*. Toutefois, ce dernier pathogène n'est encore que partiellement contrôlé, d'où l'importance d'une meilleure compréhension de la cinétique de contamination par cette bactérie.

Certaines études ont été effectuées à ce sujet (18, 19, 76, 105, 120, 168, 172) mais aucune n'a encore été menée au Canada, et de façon plus précise, au Québec. L'objectif premier de cette portion de l'étude était donc d'évaluer la prévalence de *Campylobacter* sur les carcasses de poulet à l'abattoir, de façon à obtenir des données permettant de caractériser le risque pour l'homme. Nos travaux avaient également comme objectifs de vérifier si les isolats de *Campylobacter* retrouvés au niveau des carcasses de poulet de chair à l'abattoir étaient génétiquement similaires à ceux provenant des cæcums des carcasses correspondantes, de vérifier la variabilité génétique des isolats de

Campylobacter étudiés et, finalement, d'évaluer l'importance de la contamination croisée dans les abattoirs étudiés.

5.1.1 Prévalence de *Campylobacter* sur les carcasses de poulet à griller à l'abattoir

Les résultats obtenus pour cette partie de l'étude sont intéressants, car ils confirment que la prévalence de *Campylobacter* sur les carcasses de poulet à griller à l'abattoir est importante. En effet, 68% des lots échantillonnés se sont révélés positifs pour la présence de *Campylobacter*. Ceci est en accord avec ce qui est retrouvé dans la littérature, où l'on rapporte des proportions de lots de poulet de chair positifs variant de 42% à 100% des lots en Islande (171), de 57% à 63% en Hollande (181) de 87,5% à 90% aux États-Unis (66, 168) et de 100% en Californie et au Japon (76, 105). Il existe toutefois des pays, tel la Norvège, où la prévalence de *Campylobacter* à l'abattoir est aussi faible que 18% (80).

D'autre part, les résultats obtenus lors de cette étude démontrent que la contamination intra-lot au Québec est importante, car plus de 25% des lots positifs pour *C. jejuni* ont une prévalence supérieure à 50% des individus. Ceci est en accord avec certaines études qui rapportent des prévalences intra-lot variant de 50% à plus de 80% (71) (44). Par ailleurs, étant donné que les abattoirs visités étaient répartis dans diverses régions de la province et que les oiseaux abattus provenaient de régions variées, il est possible de croire que les résultats obtenus sont représentatifs de l'ensemble du Québec et ce même si la méthode d'échantillonnage n'avait pas au départ été conçue en ce sens. La technique d'échantillonnage choisie, soit l'utilisation de rinçages des carcasses de poulet, nous semble un choix judicieux, car elle permet d'avoir une idée de la contamination globale de la carcasse (78). La méthode d'isolement utilisée pour les échantillons de carcasses nous apparaît quant à elle justifiée, étant donné que de nombreuses études ont démontré la sensibilité des différentes techniques et milieux de cultures utilisés (14, 61). Suite à ces études, il semble que la combinaison d'un milieu d'enrichissement (tel le bouillon Bolton) à l'utilisation d'une gélose à base de charbon (telle la gélose mCCDA) soit idéale, offrant la meilleure balance entre l'inhibition de la croissance de microorganismes compétiteurs et la croissance de *Campylobacter* (14)

(130). Il serait donc très peu probable qu'un nombre significatif d'isolats de *Campylobacter* présents sur les carcasses n'aient pas été détectés par les techniques utilisées.

5.1.2 Présence de *Campylobacter* dans les cæcums des carcasses échantillonnées

Pour ce volet de l'étude, les résultats obtenus sont également en accord avec les études effectuées précédemment qui ont observé la présence de *Campylobacter* dans les fèces de poulet de chair à l'abattoir (18, 71, 80, 105, 114) (136, 138, 194). La prévalence de lots positifs au niveau des caecums retrouvée dans le cadre de notre étude (27% des lots) se situe avantageusement parmi les prévalences retrouvées dans la littérature, où elles varient de 2,9% (136), à 22% (105), 46% (194), 60,2% (114), 87% (138) et 100% (18).

Toutefois, la divergence entre les prévalences des études faites à même notre laboratoire (27% pour notre étude et 60,2% pour l'étude de Nadeau *et al.* (114)) pourrait s'expliquer par une différence entre les méthodes d'isolement utilisées. En effet, la méthode choisie au début de notre projet fut celle de pré-enrichissement des fèces avec le bouillon Bolton. Ce choix avait initialement été fait dans le but d'obtenir des isolats de carcasses et de fèces cultivés avec les mêmes paramètres, étant donné qu'ils auraient à être analysés par des méthodes moléculaires. Voyant le peu d'efficacité de l'isolement dans les fèces par rapport aux autres études effectuées chez *Campylobacter*, la méthode a été modifiée après quelques mois et l'isolement par ensemencement direct des fèces sur la gélose sélective a été adopté, tel que proposé par un article de Musgrove *et al.* (110). Celui-ci mentionne que l'utilisation de milieux de pré-enrichissement pour les échantillons fécaux résulte en une diminution du taux de détection des *Campylobacter* présents. Cette équipe conseille donc l'utilisation d'ensemencement direct des fèces sur la gélose sélective (110). Les échantillons initialement analysés par la méthode d'enrichissement ont donc été repris, mais la congélation des cæcums semble avoir été létale pour de nombreux échantillons, tel que déjà décrit dans la littérature (189) (56).

Par ailleurs, la technique de regroupement des cæcums en pools de dix pourrait avoir empêché une détection optimale des bactéries. Étant donné la dilution 1:10 qui est faite à partir du contenu de chaque cæcum, il est possible que des échantillons ayant été trouvés négatifs suite à l'analyse bactériologique soient en fait des échantillons positifs. Il pourrait donc s'agir de faux négatifs.

5.1.3 Comparaison entre les cæcums et les carcasses pour la présence de *C. jejuni*

Cette étude a permis d'établir un lien entre la présence de *Campylobacter* sur les carcasses et dans les cæcums des oiseaux échantillonnés à l'abattoir. En se concentrant sur les lots dont le statut des cæcums était positif pour *Campylobacter*, il est possible d'observer que le statut des carcasses était lui aussi positif (chapitre 3). Ceci suggère que la contamination des carcasses est, tout comme celle des cæcums, indicatrice de la contamination du lot. Par ailleurs, puisqu'un statut de pool positif combiné à un statut de carcasses négatif pour un lot donné n'a jamais été observé, il est possible de penser que les pools négatifs associés à des carcasses négatives étaient bel et bien négatifs, ce qui diminuerait les possibilités de faux négatifs. Toutefois, l'utilisation de la méthode d'ensemencement direct des fèces fraîches sur la gélose pourrait permettre d'avoir une meilleure idée du statut réel de l'oiseau. Par ailleurs, la combinaison d'une méthode de détection moléculaire telle le PCR (79, 186) à une méthode de détection classique (par exemple, enrichissement et ensemencement sur gélose) pourrait confirmer les résultats obtenus par cette dernière.

5.2 Caractérisation génétique des isolats de *Campylobacter*

La présence de *Campylobacter* chez les isolats provenant de carcasses de poulets de chair à l'abattoir a été démontrée dans la première partie de cette étude ainsi que dans de nombreuses autres études (19, 120, 168, 171, 172) (76, 105). *C. jejuni* a également été retrouvé dans notre étude au niveau des cæcums de ces carcasses de poulet. Du seul

point de vue bactériologique, il était cependant impossible de déterminer si les isolats provenant des carcasses et des cæcums correspondants étaient les mêmes, et encore moins s'ils étaient de source commune. Les méthodes de caractérisation moléculaire telle l'électrophorèse en gel à champs pulsés (PFGE) offrent donc une avenue intéressante permettant de répondre à ces questions.

Bien que des isolats de *Campylobacter* provenant de cæcums de poulet aient fait l'objet d'analyses moléculaires à maintes reprises (66, 105, 114, 120, 136, 138), seules quelques études se sont penchées sur la comparaison des isolats retrouvés sur les carcasses et dans les cæcums des poulets à griller à l'abattoir (105, 120). Bien que rapporté dans des études européennes et asiatiques (105, 120), le phénomène de transport des bactéries d'une carcasse à une autre et même d'un lot à un autre n'a pas fait l'objet d'analyses plus poussées au Canada. Les données présentes dans la littérature suggèrent que la contamination des carcasses pourrait être due principalement à une rupture du tractus gastro-intestinal des oiseaux (18, 19, 105), aux pratiques d'abattage des oiseaux (18, 194), ou encore à une source externe de contamination (114, 120, 138, 164, 168). Toutefois, aucune n'a encore permis de confirmer l'une ou l'autre de ces hypothèses au Québec.

Cette portion de l'étude visait donc dans un premier temps à déterminer le niveau de diversité génétique des isolats de *Campylobacter* retrouvés sur les carcasses et dans les cæcums des oiseaux à l'abattoir et, dans un second temps, à effectuer une comparaison des isolats retrouvés sur les carcasses et dans les cæcums de poulet à griller, ceci dans le but de tenter de déterminer quelle est la source la plus probable de la contamination des carcasses. Par ailleurs, un objectif secondaire était de confirmer ou d'infirmer la présence de contamination croisée au niveau de l'environnement de la chaîne d'abattage des abattoirs visités.

5.2.1 Étude de la diversité génétique des isolats de *Campylobacter* au niveau des carcasses de poulet à griller à l'abattoir, à l'échelle de l'individu.

Les résultats obtenus suite au sous échantillonnage effectué pour déterminer le niveau de diversité génétique des *C. jejuni* retrouvés sur les carcasses suggèrent que la variabilité génétique des isolats sur une carcasse donnée est très faible. En effet, en se référant au chapitre 3, il est possible de se rendre compte que seules six carcasses sur les 105 analysées possédaient une colonie ayant un profil de PFGE différent des autres colonies analysées pour les carcasses respectives. Il y aurait donc une faible variabilité génétique au niveau des isolats de *C. jejuni* retrouvés sur une carcasse donnée à l'abattoir, de l'ordre de 6%.

Cette faible diversité génétique des campylobacters retrouvés sur des carcasses de poulet a également été mise en évidence dans une autre étude qui n'avait cependant analysé qu'un maximum de trois colonies par échantillon positif (120). Cette même équipe mentionne également qu'une analyse de la diversité a été effectuée au Royaume-Uni sur 150 colonies de *Campylobacter* réparties sur 20 poulets. Le niveau de diversité résultant pour cette situation était le même que celui retrouvé lorsque seulement quelques colonies étaient analysées par individu, soit très faible (120). Une autre équipe a pour sa part testé environ huit colonies par échantillon positif, pour un total de 153 isolats différents, sans toutefois faire allusion au niveau de diversité des carcasses (152). On ne peut cependant pas écarter la possibilité que le peu de diversité observé puisse être en partie dû aux milieux d'enrichissement et de culture utilisés dans le cadre de notre étude, ceux-ci ayant possiblement favorisé la sélection d'une lignée clonale en particulier.

5.2.2 Étude de la diversité génétique des isolats de *C. jejuni* retrouvés dans les cæcums de poulets à griller échantillonnées à l'abattoir, à l'échelle de l'individu.

Tout comme au niveau des carcasses de poulet, les résultats obtenus pour cette partie de l'étude ont permis de déterminer que la variabilité génétique de *Campylobacter* au sein

d'un cæcum donné s'avère minime. En effet, il est possible de constater dans le chapitre 3 du présent document que pour seize des dix-sept pools de cæcums positifs, les cinq colonies analysées pour chacun avaient un profil identique au PFGE. Pour l'autre pool, deux des cinq colonies avaient un profil distinct (AA) des trois autres, qui elles avaient le même profil (BB). Ce peu de diversité observé coïncide avec ce qui est retrouvé dans la littérature (114, 120), où l'on soutient qu'au niveau des cæcums d'un lot, la diversité génétique est habituellement très faible. Toutefois, dans la majeure partie des cas, ces études ne se basent que sur une seule colonie provenant d'un seul cæcum, mais analysent plusieurs cæcums d'un même lot.

5.2.3 Étude de la variabilité génétique des isolats de *C. jejuni* retrouvés sur les carcasses de poulets à griller, à l'échelle du lot

Dans la première portion de cette étude, il a été démontré que pour un individu donné, il existe peu de diversité génétique parmi les isolats de *Campylobacter*. Il est cependant intéressant de pouvoir déterminer si cette faible variabilité génétique est retrouvée à l'échelle du lot, ou, à l'inverse, si les profils des isolats retrouvés à l'abattoir sur les carcasses de poulet sont variables.

À la lecture du chapitre 3, il est possible d'observer jusqu'à quatre profils distincts chez les isolats des carcasses échantillonnées. Lorsque plus d'un profil est retrouvé au niveau d'un lot, il est intéressant de noter que l'un de ceux-ci est habituellement retrouvé à une fréquence plus importante que les autres. Par ailleurs, 39 profils différents ont été observés au niveau des carcasses pour l'ensemble des 22 lots à l'étude, ce qui pourrait suggérer l'existence de sources de contamination des carcasses lors du processus d'abattage. Des études précédentes ont, elles aussi, noté une grande diversité dans les génotypes retrouvés sur les carcasses, certaines retrouvant jusqu'à onze profils différents pour un lot donné (152).

Une des explications possible est que la contamination des carcasses de poulet à l'abattoir pourrait être étroitement liée à l'abattoir et donc, que certains isolats pourraient

persister dans l'environnement immédiat de celui-ci. Selon cette hypothèse, les isolats retrouvés devraient donc être les mêmes pour un abattoir donné. Cette hypothèse est cependant infirmée par les résultats de la présente étude. En effet, pour un abattoir donné, des profils distincts ont été retrouvés lors des différentes périodes d'échantillonnage pour l'ensemble de l'étude. Malgré cette observation, il est possible de remarquer que certains génotypes ont été retrouvés au niveau de plus d'un lot. Ces profils similaires sont, dans la majorité des cas, retrouvés lors d'une même journée d'abattage au sein d'un abattoir donné. Il serait donc possible de croire que les isolats de *Campylobacter* retrouvés sur les carcasses de poulet pourraient être reliés dans un premier temps à l'abattoir, mais qu'ils seraient également associés à la journée d'abattage proprement dite.

En analysant plus en profondeur les données relatives à l'abattage recueillies au cours de la présente étude, il a été possible de mettre en évidence qu'en plus d'être retrouvés au cours d'une même journée d'abattage, certains profils similaires étaient associés à des lots abattus de façon consécutive sur la chaîne (chapitre 3, table VIII); la fin de l'abattage du premier lot correspondait au début de l'abattage du second lot. Il serait donc plausible de croire que les isolats retrouvés à l'abattoir sur les carcasses de poulet seraient non seulement reliés entre eux pour une journée d'abattage donnée, mais qu'une transmission de ces isolats de lot en lot se produirait. Cette transmission des isolats avait précédemment été observé par Miwa *et al.*, Rivoal *et al.* et Newell *et al.* (105, 120, 152). Ces groupes ont étudié l'évolution à l'abattoir d'isolats de *Campylobacter* chez des lots de poulet à griller initialement négatifs ou positifs pour la bactérie. Ils ont également inclus dans leurs études des lots positifs dont le profil des isolats bactériens était connu à l'arrivée à l'abattoir. Ces études effectuées respectivement au Japon, en France et au Royaume-Uni ont démontré que la contamination des carcasses de poulet de chair à l'abattoir était principalement due à la contamination par les matières fécales du premier lot abattu lors d'une journée d'abattage donnée. L'équipe de Miwa et collaborateurs a établi que les carcasses d'un lot initialement exempt de *Campylobacter* devenaient positives une fois abattues, et que les isolats alors retrouvés étaient de profil similaire à ceux du lot positif abattu précédemment (105). Par ailleurs, les travaux de Newell *et al.*

et Rivoal *et al.* ont démontré qu'il y avait un transport des isolats entre les différentes carcasses au niveau d'un lot donné, de même qu'entre les carcasses de lots consécutifs sur la chaîne (120, 152). Toutefois, cette situation de contamination croisée n'avait encore jamais été démontrée au Canada, d'où l'intérêt des présents résultats.

Par ailleurs, l'analyse des lots non consécutifs ayant été abattus au cours d'une même journée a permis d'observer que les profils des isolats présents sur les carcasses de ces lots sont distincts (chapitre 3, table VIII). Bien qu'il puisse y avoir une transmission des souches de carcasses en carcasses, ainsi que de lots en lots, cette transmission serait somme toute limitée. Étant donné qu'un maximum de deux lots a été analysé pour une date d'abattage donnée, il est cependant impossible de déterminer le nombre de lots pouvant être contaminés par des isolats communs, ou encore le temps nécessaire à la disparition d'un profil donné. Finalement, il semble que des profils non apparentés puissent être présents de façon ponctuelle au niveau d'un lot sans pour autant affecter la diversité des profils des isolats retrouvés par la suite.

5.2.4 Étude de la variabilité génétique des isolats de *C. jejuni* retrouvés à l'intérieur des caecums de carcasses de poulets à griller à l'abattoir, à l'échelle du lot

Par cette étude, il a également été possible d'étudier la variabilité des isolats de *Campylobacter* se retrouvant au niveau des caecums des carcasses de poulets abattus dans les différents établissements. Dans une étude précédente effectuée au sein de notre laboratoire, il avait été possible de déterminer qu'il existait une grande diversité au niveau des souches de *C. jejuni* retrouvées dans les caecums, mais que plus de 75% des lots étaient colonisés par un génotype unique (114). Le but de cette portion de l'étude était donc d'approfondir la précédente étude de variabilité génétique des isolats de *Campylobacter* provenant des caecums de poulet de chair.

Les résultats obtenus dans ce volet de l'étude permettent de confirmer l'une des deux observations effectuées précédemment dans notre laboratoire, soit qu'il existe un grand nombre de profils distincts d'isolats de *C. jejuni* dans les lots de poulets de chair au Québec. Pour les sept lots de poulet dont le statut des caecums était positif, huit profils distincts ont été observés, parmi lesquels deux se retrouvaient à l'intérieur d'un même lot. Ces données confirment les observations précédentes voulant que dans la majorité des cas, un seul génotype soit retrouvé chez les lots de poulets.

5.2.5 Comparaison des isolats de *Campylobacter* retrouvés sur les carcasses et dans les caecums de poulets à griller à l'abattoir.

Par les résultats obtenus dans le cadre de cette étude, il est possible d'émettre certaines hypothèses quant à la source la plus probable de contamination des poulets de chair à l'abattoir. En se référant au tableau 1 du chapitre 3, il est possible de déterminer qu'il existe une grande similitude entre les profils des isolats de *Campylobacter* des pools de caecums et des carcasses. En effet, pour six des huit lots positifs à *Campylobacter* au niveau du pool, le profil génotypique des isolats y étant retrouvés était similaire à au moins un des profils d'isolats retrouvés sur les carcasses de ce lot. Ces résultats laissent donc supposer que la contamination d'une carcasse de poulet à l'abattoir serait principalement due à la contamination par les fèces du même oiseau, que ce soit par le biais des équipements procédant à l'éviscération, ou encore par le biais d'une rupture de leur tractus gastro-intestinal. Cette hypothèse avait déjà été proposée par plusieurs auteurs (152) (105) (120) (19), mais à ce jour, la démonstration et la confirmation de cette idée au niveau moléculaire n'avait été effectuée qu'au Royaume-Uni, en France et au Japon (105, 120, 152).

5.2.6 Présence de contamination croisée entre les carcasses de poulet à griller à l'abattoir

Une autre information intéressante qu'il a été possible de mettre en évidence par cette étude est la présence de contamination croisée au sein de l'abattoir. En effet, il apparaît en de nombreuses occasions que les profils retrouvés pour des lots consécutifs à l'abattoir soient les mêmes. Ce transport des souches d'un lot à l'autre a également été mis en évidence par des études précédentes effectuées en France, au Royaume-Uni et au Japon (105, 120, 152). C'est toutefois à ce jour la première démonstration de contamination croisée d'isolats de *Campylobacter* entre des carcasses de différents lots de poulet de chair au niveau des abattoirs québécois.

5.2.7 Existence potentielle d'une source commune de contamination des lots de poulet de chair

Une donnée intéressante réside dans le fait que les profils de certains isolats, en plus d'être retrouvés sur les carcasses de lots consécutifs à l'abattoir, sont également retrouvés sur des carcasses de lots n'ayant en apparence aucun lien direct entre eux. En effet, en se référant à la table 1 du chapitre 3, il est possible de remarquer que pour les lots [109, 112, 149] et [164, 175, 176], les profils retrouvés sur les carcasses sont les mêmes. Dans chacune des deux situations, deux des lots sont consécutifs sur la chaîne, le troisième ayant été abattu non seulement lors d'une autre journée, mais également dans un abattoir différent. Il serait donc possible de croire qu'il existe, pour ces lots, une source commune de contamination. En analysant les informations relatives à la provenance des oiseaux disponibles pour cette étude, il est possible de se rendre compte, pour la première série de trois lots (109-112-149), que le couvoir et la meunerie sont les mêmes pour deux des trois lots, soit 109 et 149. Il apparaît également, tel que décrit précédemment, que les deux premiers lots de cette série ont été abattus de façon consécutive sur la chaîne. L'explication la plus plausible serait donc qu'il existerait une source commune de contamination des souches pour les lots 109 et 149, et que les

carcasses du lot 112 auraient été contaminées par les souches du lot 109, par le biais des équipements de l'abattoir.

Pour ce qui est des lots 164, 175 et 176, les données relatives aux conditions d'élevage ou de transport ne sont en aucun cas similaires entre elles. Par ailleurs, étant donné que le profil des pools des lots 175 et 176 n'est pas disponible (ils étaient négatifs suite à l'analyse bactériologique), il est impossible de déterminer quelle pourrait être la source la plus probable de contamination. De façon similaire à ce qui a été décrit plus haut, comme les lots 175 et 176 ont été abattus sur la chaîne de façon consécutive, il est possible qu'il y ait eu contamination croisée entre les souches de ces lots, et que seul le premier des deux partage une source commune de contamination avec le lot 164.

5.3 Résistance aux antibiotiques en lien avec leur utilisation à la ferme

L'émergence de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries et en particulier chez *Campylobacter* est un phénomène bien documenté (2) (27) (107). Il a été démontré par la présente étude que *C. jejuni* est fortement prévalent chez le poulet à griller, confirmant ainsi l'exposition de l'homme à cette bactérie. Bien que les infections à *Campylobacter* chez l'homme ne nécessitent pas une médication dans tous les cas, une résistance à certains des antibiotiques utilisés pour faire face à cette bactérie commence à être observée (107) (2). Certaines études suggèrent par ailleurs que cette apparition de résistance chez *C. jejuni* pourrait être reliée aux antimicrobiens auxquels la volaille est exposée (2) (107) (11).

Au Canada et au Québec, seulement quelques études ont porté sur la résistance aux antimicrobiens chez *Campylobacter* (55) (49-51). Ces études, effectuées dans une optique de dépistage des bactéries résistantes, ne portaient pas de façon précise sur celles associées au poulet, la plupart ayant plutôt été effectuées sur des isolats cliniques. Le poulet étant l'une des principales sources de contamination par la bactérie, il est primordial d'analyser le degré de résistance des campylobacters aviaires. En

déterminant le niveau de résistance aux différents antibiotiques des isolats de *Campylobacter* retrouvés chez le poulet de chair, les solutions à apporter pour contrer cette problématique seront plus faciles à cibler.

Certaines données de la littérature suggèrent que l'utilisation d'antibiotiques dans les troupeaux animaux et chez l'homme causeraient une pression sélective favorisant le développement de résistance chez les pathogènes (25) (139, 182). En étudiant les résistances observées chez les pathogènes aviaires et les médicaments ayant été administrés aux oiseaux, il pourrait être possible de déterminer s'il y a un lien entre l'exposition et la résistance. Puisque tous les renseignements nécessaires à une telle analyse étaient disponibles, il devenait facile de l'intégrer à ce projet.

À l'inverse de ce qui était rapporté dans la littérature, peu d'antimicrobiens et de promoteurs de croissance ont été utilisés dans les lots à l'étude. Certains anticoccidiens ont été utilisés, mais étant donné le mécanisme d'action de cette classe de produits, soit l'inhibition des pompes à sodium potassium (176), aucun lien ne peut être fait avec les résistances aux divers antibiotiques.

La seconde portion de cette étude visait donc à mettre en évidence les principales résistances aux antibiotiques retrouvées chez les isolats de *Campylobacter* provenant de carcasses de poulet de chair dans les abattoirs du Québec. Nous voulions également déterminer si leur présence était liée à l'utilisation d'antimicrobiens à la ferme.

5.3.1 Résistance aux antibiotiques des isolats de *Campylobacter* retrouvés sur les carcasses et dans les caecums de poulet de chair à l'abattoir.

Les résultats obtenus pour cette portion de l'étude sont plutôt inattendus, car ils indiquent la présence de taux élevés de résistance à certains antibiotiques chez des isolats de *Campylobacter* provenant de carcasses et de caecums de poulet de chair dans les abattoirs du Québec. À la figure 1 du chapitre 4, il est possible d'observer qu'une résistance aux antimicrobiens est retrouvée chez les *C. jejuni* isolés de carcasses et de caecums à pas moins de sept antibiotiques différents. Ces données concordent avec

celles de nombreuses études qui ont aussi soulevé un vaste éventail de résistances (11, 27, 38, 128, 199) (145) (72) (149). Les antibiotiques pour lesquels les résistances ont été mises en évidence varient toutefois, tout comme les pourcentages de souches résistantes à ces antibiotiques. En effet, selon nos résultats, il est possible de remarquer que les niveaux de résistance les plus importants sont observés pour la tétracycline (82,47%), la bacitracine de zinc (100%) et le ceftiofur (97,94%). Le haut taux de résistance pour la tétracycline avait précédemment été rapporté au Canada chez des isolats humains de *Campylobacter* (49, 55), de même que chez des isolats de *Campylobacter* isolés de poulet vendu au détail (142).

Dans les études effectuées dans d'autres pays, l'antibiotique pour lequel on retrouve les plus haut taux de résistance est également la tétracycline, suivi de l'ampicilline, du ciprofloxacine et de l'acide nalidixique (11, 27, 38). Les pourcentages d'isolats de *Campylobacter* résistants observés varient cependant selon les pays. La Suède possède des taux de résistance de 0 à 8% pour tous les antibiotiques nommés (27, 95) alors qu'en France, des résistances de 23% pour l'ampicilline, de 31,5% pour le ciprofloxacine, et variant de 25 à 31,9% pour l'acide nalidixique et de 26 à 58% pour la tétracycline (27) (11) (38) sont remarqués.

Par ailleurs, en comparant les résultats que nous avons obtenus (chapitre 4, figure 2) à ceux d'études canadiennes (142), il est possible de se rendre compte que les taux de résistances rencontrés sont semblables, à la différence que ces études ont mis en évidence la présence de résistance au ciprofloxacine (4%) et à l'acide nalidixique (4%), ce qui ne fut pas le cas dans la présente étude.

5.3.1.1 Résistance au ceftiofur en lien avec son utilisation à la ferme

La forte résistance au ceftiofur obtenue chez un grand nombre de souches pour la présente étude est quant à elle surprenante. En fait, aucune autre étude n'a mentionné à ce jour de résistance à cet antibiotique pour *Campylobacter*, alors que la résistance à cette classe d'antibiotiques n'est que rarement rapportée. Une résistance à cet

antimicrobien a aussi été rapportée chez *Salmonella* (142, 203) (144) (196). Le ceftiofur est un dérivé de troisième génération de la famille des céphalosporines, lesquelles interfèrent principalement avec la synthèse du peptidoglycan. Elles sont donc principalement actives contre les bactéries positives à la coloration de Gram. Avec le temps et l'émergence de résistance aux antibiotiques appartenant à cette classe, des céphalosporines de seconde, troisième et quatrième génération ont été mises au point. Ces composés possèdent des chaînes « acyl » latérales chargées, ce qui permet la pénétration du composé à l'intérieur des porines de la membrane externe des bactéries négatives à la coloration de gram (185). Ceci a donc permis d'élargir le spectre d'action à ce groupe de microorganismes, et donc, à *Campylobacter*. La résistance observée s'avère donc intéressante, et pourrait être expliquée par quelques hypothèses.

Tout d'abord, les souches de *Campylobacter* de ce projet ont initialement été enrichies puis cultivées à l'aide de milieux contenant des antibiotiques de la classe des céphalosporines, soit le céfoperazone. Les concentrations de cet antibiotique dans les divers milieux de culture utilisés étaient de l'ordre de 20mg/L et de 32 mg/L. Il est donc possible que ceci puisse avoir d'abord contribué à la sélection de souches résistantes au détriment de souches sensibles. Toutefois, étant donné les forts niveaux de résistances des souches de ce projet (aussi élevées que 256mg/L), il semble peu probable que les milieux aient entraîné le développement très rapide de ce niveau de résistance après deux passages en milieu de culture. L'utilisation du ceftiofur dans les couvoirs québécois était quant à elle très répandue lors de notre échantillonnage et pourrait avoir contribué au développement de résistance. En effet, tous les poussins des lots sélectionnés pour les besoins de notre étude ont été injectés avec cet antibiotique (Excenel®) soit à un jour d'âge, soit *in ovo* au couvoir. Ainsi, les ancêtres des bactéries isolées ont toutes été exposées à cet antibiotique. Il serait donc possible que l'existence d'une résistance chez ceux-ci, qu'elle soit plasmidique ou chromosomale, ait pu se développer par le passé et avoir été transmise de génération en génération, ce qui pourrait expliquer la résistance observée.

Afin de pouvoir confirmer l'impact de l'utilisation du ceftiofur sur le développement de résistance à cet antibiotique, un groupe négatif aurait été nécessaire. En ayant par exemple plusieurs lots de poulet n'ayant pas été exposés à l'antibiotique, il aurait pu être possible de comparer le développement de résistance chez les souches de *Campylobacter* exposées aux antibiotiques à celles n'y ayant pas été exposé. Des analyses statistiques auraient par la suite pu être effectuées, de façon à démontrer si la différence observée entre le groupe contrôle et le groupe testé est ou non significative.

Certaines études rapportent l'existence d'une β -lactamase semblable à AmpC de *Citrobacter freundii* qui aurait comme action d'hydrolyser les céphalosporines (6). Codée par le gène plasmidique *bla_{CMY}*, elle serait notamment retrouvée chez des isolats de *Salmonella* résistants au ceftiofur (58). Il pourrait donc être intéressant d'analyser les isolats de *Campylobacter* résistants au ceftiofur de façon à déterminer s'ils possèdent ou non ce gène sur un plasmide, ceci dans l'optique de confirmer le mécanisme de résistance des isolats.

5.3.1.2 Résistance à la bacitracine en lien avec son utilisation à la ferme

Le taux très élevé de résistance à la bacitracine observé peut à première vue sembler étonnant, étant donné que la résistance à cet antibiotique n'a encore été rapportée par aucune autre étude chez *Campylobacter*. Chez *Escherichia coli*, la résistance à cet antibiotique serait due à un système de transport ABC exportant la bacitracine à l'extérieur de la cellule (185). Étant donné que la bacitracine agit principalement au niveau de la synthèse du peptidoglycan et que tel que mentionné précédemment, *Campylobacter* est une bactérie négative à la coloration de Gram, il serait donc possible que la bactérie soit tout simplement insensible à l'activité de l'antibiotique. Par ailleurs, une étude récente a confirmé la présence d'une pompe à efflux, CmeABC, présente dans la membrane externe de *Campylobacter* (94). Il serait donc possible que cette pompe exporte la bacitracine à l'extérieur de la cellule. Comme cette pompe serait responsable de la résistance intrinsèque de la bactérie à plusieurs antibiotiques, il serait possible que ce soit également le cas pour la bacitracine. Ceci

pourrait donc expliquer la forte croissance observée pour les diverses concentrations de cet antibiotique. Toutefois, des analyses moléculaires plus poussées seraient nécessaires afin de confirmer soit l'insensibilité, soit la résistance, intrinsèque ou non, face à cet antibiotique.

Bien que l'utilisation de la bacitracine dans huit des vingt-deux lots puisse avoir contribué au développement de résistance, les bactéries isolées de tous les lots se sont avérées résistantes à cet antibiotique. Il semblerait donc que l'hypothèse d'une résistance intrinsèque face à ce composé soit l'explication la plus plausible. Cependant, il serait également possible que l'exposition antérieure et répétée des ancêtres des isolats puisse avoir contribué au développement d'une résistance maintenant omniprésente. Il est donc apparu impossible d'établir quelque corrélation que ce soit entre l'utilisation de cet antibiotique à la ferme et la présence de résistance. Pour pouvoir établir entre l'utilisation de l'antibiotique et la résistance observée, un lot de poulet ne recevant pas l'antibiotique serait nécessaire, de façon à pouvoir comparer les lots exposés à l'antibiotique à des lots ne le recevant pas, servant dans ce cas de contrôle négatif.

5.3.1.3 Résistance à la tétracycline en lien avec son utilisation à la ferme.

Le taux élevé de résistance à la tétracycline retrouvé chez les isolats de *Campylobacter* permet quant à lui de confirmer les résultats obtenus par de nombreuses études (11, 27, 38, 55, 128, 149). Mise en évidence chez *Campylobacter* au Canada (55) et dans de nombreux autres pays (27), cette résistance est portée par un plasmide auto-transférable et codée principalement par les gènes *tet(O)* et *tet(M)*. (12, 33) (2). Dans une étude effectuée précédemment dans notre laboratoire chez des isolats de *Campylobacter* résistants à la tétracycline isolés chez le porc (60), il a été démontré que Tet(O) serait le principal responsable de la résistance à la tétracycline. L'existence d'un tel mécanisme chez nos isolats pourrait donc expliquer la forte résistance retrouvée dans notre étude. Toutefois, une confirmation par PCR pourrait permettre de confirmer la présence de *tet(O)* et/ou *tet(M)* chez les isolats de cette étude.

Étant donné que cet antibiotique n'a pas été utilisé dans les lots à l'étude, que ce soit de façon prophylactique ou thérapeutique, il s'avère impossible de pouvoir établir quelque corrélation que ce soit entre l'utilisation à la ferme et la présence de résistance.

5.3.1.4 Résistance à l'azithromycine, la clindamycine et l'érythromycine en lien avec leur utilisation à la ferme.

Les résistances retrouvées pour l'azithromycine, la clindamycine et l'érythromycine, bien que moins fréquentes que celles décrites précédemment, sont toutefois également rapportées dans la littérature (51) (179, 180). L'érythromycine est l'antibiotique pour lequel le plus de résistance a été citée parmi les trois (52) (150) (38). Toutefois, le niveau de résistance observé chez les isolats de la présente étude est beaucoup plus élevé (12%) que le niveau observé lors d'études effectuées dans d'autres pays, où les pourcentages de résistance varient de 0,3% à 6%. La résistance à l'érythromycine étant chromosomique, elle peut être facilement transférable de générations en générations (52). Par ailleurs, ces antibiotiques appartiennent à la classe «Macrolides-Lincosamides-Streptogramines de groupe B» (MLS_B). Il serait donc possible que la résistance à l'érythromycine induise aussi une résistance à l'azithromycine et à la clindamycine. Comme les taux de résistance observés sont assez similaires pour ces trois agents antimicrobiens, cette hypothèse apparaît plausible. Il est cependant impossible de déterminer laquelle de ces résistances est apparue en premier et ainsi, laquelle est responsable des autres résistances rencontrées. Il serait en outre possible de confirmer, par le biais de l'analyse de l'ADN des isolats résistants, quel est le mécanisme en cause.

Aucun des antibiotiques azithromycine, clindamycine ou érythromycine n'a été administré aux oiseaux. Il est cependant possible de retrouver, parmi les promoteurs de croissance utilisés, la présence de tylosine et de virginiamycine, deux antimicrobiens appartenant à la classe des macrolides. Il serait donc possible qu'un certain niveau de résistance se soit développé pour l'un ou l'autre des deux antibiotiques mentionnés, et qu'il y ait une résistance croisée. En effet, la résistance pour la classe MLS_B est due à une mutation ponctuelle dans le domaine V de l'ARN 23S du ribosome, aux sites

A₂₀₅₈. et A₂₀₅₉ (52) (2). Ceci expliquerait les pourcentages de résistance obtenus pour l'azithromycine, la clindamycine et l'érythromycine dans le cadre de notre étude. Il serait également possible que la résistance se soit développée chez les ancêtres de nos isolats, suite à des expositions répétées ou prolongées, et qu'elle ait été transmise de génération en génération au fil du temps.

5.3.1.5 Résistance à l'ampicilline et lien avec son utilisation à la ferme

La résistance à l'ampicilline observée chez les isolats de *Campylobacter* de la présente étude isolés de poulet de chair est quant à elle intéressante et avait déjà été mise en évidence dans le passé pour des isolats de *Campylobacter* de même provenance. (11, 38, 128) (97). Appartenant à la famille des Pénicillines, l'ampicilline comprend un anneau β -lactam qui inhibe les protéines de liaison à la pénicilline qui elles, sont essentielles à la synthèse du peptidoglycan. Il semble que la présence de β -lactamases chez *Campylobacter* pourrait être responsable de la résistance à cet antibiotique (5, 92).

L'ampicilline n'a par ailleurs pas été administrée aux oiseaux ayant été échantillonnés au cours de la présente étude. Il est donc impossible d'établir quelque association que ce soit entre son utilisation à la ferme et la présence de résistance.

CHAPITRE 6. CONCLUSIONS

Les analyses effectuées dans le cadre de ce projet de maîtrise ont permis d'élargir les connaissances actuelles reliées à la prévalence de *Campylobacter* chez le poulet de chair au niveau des abattoirs du Québec et à la diversité génétique des isolats retrouvés sur les carcasses de poulet de chair. Elles ont également permis de confirmer l'existence de contamination croisée entre les lots abattus. Ce projet a en outre permis d'accroître les connaissances quant à la résistance aux antibiotiques des isolats de *Campylobacter*, et d'évaluer l'impact de l'utilisation d'antimicrobiens à titre de promoteurs de croissance dans les élevages de poulet de chair au Québec. De façon plus précise, les conclusions de ce projet sont :

- La prévalence observée de *Campylobacter* sur les carcasses de poulet de chair dans les abattoirs commerciaux du Québec étudiés est élevée, plus des deux tiers des lots étant contaminés par la bactérie.
- Il existe une grande diversité génétique au niveau des isolats de *Campylobacter* retrouvés chez l'ensemble des lots analysés, et chacun de ces lots est habituellement porteur d'un profil génétique lui étant propre.
- À l'échelle de l'individu, la diversité est faible et est formée d'un profil dominant se retrouvant à la fois sur la carcasse et dans le pool de caecums respectif.
- Lorsque des lots sont abattus de façon consécutive à l'abattoir, les isolats présents au niveau premier lot sont également retrouvés sur les carcasses du lot suivant.
- Certains lots, n'ayant à première vue aucun lien entre eux et provenant de régions différentes, peuvent être contaminés par des isolats identiques, ce qui suggère l'existence d'une source de contamination commune.

- Plusieurs isolats de *Campylobacter* provenant de poulet de chair présentent des résistances à de nombreux antibiotiques. Certains d'entre eux sont résistants à un total de sept antibiotiques différents; plus de soixante-dix pourcent d'entre eux étant sont résistants à la bacitracine de zinc, au ceftiofur et à la tétracycline.
- L'utilisation sur une ferme donnée d'antibiotiques sous forme de promoteurs de croissance, prophylactique ou thérapeutique n'est pas directement associée à la présence de résistance aux antibiotiques.

Perspectives

Suite à ce projet, des analyses plus poussées pourraient être effectuées afin d'approfondir les résultats obtenus. Tout d'abord, il serait intéressant de mettre en évidence la source principale de contamination des poulets de chair. Par la présente étude, il a été possible de démontrer que la contamination des carcasses à l'abattoir était principalement due à une contamination croisée par le biais des matières fécales des oiseaux. Toutefois, l'origine de cette contamination des fèces par la bactérie n'est pas claire. Afin de pouvoir la déterminer, il serait intéressant d'effectuer un échantillonnage à la ferme, au niveau des cageots servant au transport ainsi qu'au couvoir, et de comparer les souches ainsi isolées à celles retrouvées à l'abattoir sur les carcasses. Toutefois, un obstacle majeur demeure la présence d'anticorps maternels chez le poussin jusqu'à l'âge de deux semaines. Ces anticorps semblent empêcher la détection des bactéries, ou du moins empêcher leur développement.

Par la suite, étant donné que *Campylobacter* est pathogène pour l'humain et qu'il se retrouve en grande proportions sur les carcasses de poulet, il pourrait être intéressant de tenter de mettre sur pieds des stratégies visant à diminuer la présence de la bactérie dans les élevages de poulet de chair.

Au niveau de la résistance aux antibiotiques, de nombreuses expérimentations pourraient être effectuées afin de confirmer l'importance de l'impact de l'utilisation des antimicrobiens en élevage sur le développement de résistance chez *Campylobacter*. Tout d'abord, les élevages ciblés devraient pouvoir être suivis dès l'arrivée des poussins au poulailler. Il serait également nécessaire d'avoir parmi les lots à l'étude, un lot négatif, ou contrôle, auquel aucun antibiotique ni promoteur de croissance ne serait administré. Ainsi, les souches isolées dans cet élevage contrôle ne devraient théoriquement pas développer de résistance aux antibiotiques utilisés. Il serait ainsi possible de mettre en évidence l'apparition de résistance chez les souches de *Campylobacter* des autres lots qui elles, seraient exposées aux antibiotiques utilisés en élevage. En parallèle, des tests statistiques pourraient être effectués, de façon à confirmer l'impact de l'utilisation des antibiotiques sur la présence de résistance, lorsque comparée avec l'absence ou la présence de résistance chez un groupe témoin n'étant pas exposé aux antibiotiques.

Il existe toutefois un obstacle majeur à la réalisation de ce genre d'étude, soit l'exposition des poulets reproducteurs et des poules pondeuses aux antibiotiques. Étant donné que ces oiseaux ont habituellement une durée de vie plus longue que les poulets destinés à la consommation, la quantité d'antibiotiques à laquelle ils sont exposés est par le fait même plus grande. Par ailleurs, comme il serait possible que les souches de *Campylobacter* retrouvées au niveau des fermes d'élevage proviennent de ces mêmes oiseaux reproducteurs, les efforts mis en place au niveau de l'élevage pourraient s'avérer inutiles. Il serait donc important d'évaluer en parallèle la contamination par *Campylobacter* des oiseaux reproducteurs, et d'évaluer leur niveau d'antibiorésistance, afin de pouvoir comparer ces données avec les données recueillies au niveau du poulailler. Les niveaux de résistance obtenus dans ce projet pour les souches de *Campylobacter* sont préoccupants, mais intéressants. Comme certaines résistances sont portées par une proportion similaire de souches, il serait intéressant, dans un futur rapproché, de déterminer, par des analyses plus poussées au niveau moléculaire, les mécanismes exacts menant aux résistances obtenues. Ainsi, il serait possible de confirmer l'existence de résistance croisée entre certains antibiotiques.

REFERENCES

1. **Aarestrup, F. M., F. Bager, N. E. Jensen, M. Madsen, A. Meyling, and H. C. Wegener.** 1998. Surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from food animals to antimicrobial growth promoters and related therapeutic agents in Denmark. *Apmis* **106**:606-22.
2. **Aarestrup, F. M., and J. Engberg.** 2001. Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. *Vet Res* **32**:311-21.
3. **Aarestrup, F. M., E. M. Nielsen, M. Madsen, and J. Engberg.** 1997. Antimicrobial susceptibility patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. from humans, pigs, cattle, and broilers in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:2244-50.
4. **Achen, M., T. Y. Morishita, and E. C. Ley.** 1998. Shedding and colonization of *Campylobacter jejuni* in broilers from day-of-hatch to slaughter age. *Avian Dis* **42**:732-7.
5. **Alfredson, D. A., and V. Korolik.** 2005. Isolation and expression of a novel molecular class D beta-lactamase, OXA-61, from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2515-8.
6. **Allen, K. J., and C. Poppe.** 2002. Occurrence and characterization of resistance to extended-spectrum cephalosporins mediated by beta-lactamase CMY-2 in *Salmonella* isolated from food-producing animals in Canada. *Can J Vet Res* **66**:137-44.
7. **Altekruse, S. F., N. J. Stern, P. I. Fields, and D. L. Swerdlow.** 1999. *Campylobacter jejuni*--an emerging foodborne pathogen. *Emerg Infect Dis* **5**:28-35.
8. **Anderson, A. D., J. M. Nelson, S. Rossiter, and F. J. Angulo.** 2003. Public health consequences of use of antimicrobial agents in food animals in the United States. *Microb Drug Resist* **9**:373-9.
9. **Angulo, F. J., N. L. Baker, S. J. Olsen, A. Anderson, and T. J. Barrett.** 2004. Antimicrobial use in agriculture: controlling the transfer of antimicrobial resistance to humans. *Semin Pediatr Infect Dis* **15**:78-85.
10. **Arsenault, J., Letellier, A., Quessy, S., Boulianne, M.** Prevalence and risk factors for *Salmonella* enteritis and *Campylobacter* spp. carcass contamination in broiler chickens slaughtered in Quebec, Canada. Article en préparation.
11. **Avrain, L., F. Humbert, R. L'Hospitalier, P. Sanders, C. Vernozy-Rozand, and I. Kempf.** 2003. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* from broilers: association with production type and antimicrobial use. *Vet Microbiol* **96**:267-76.
12. **Avrain, L., C. Vernozy-Rozand, and I. Kempf.** 2004. Evidence for natural horizontal transfer of tetO gene between *Campylobacter jejuni* strains in chickens. *J Appl Microbiol* **97**:134-40.
13. **Bartelt, M. A.** 2000. Diagnostic bacteriology: a study guide. F.A. Davis, Philadelphia.
14. **Baylis, C. L., S. MacPhee, K. W. Martin, T. J. Humphrey, and R. P. Betts.** 2000. Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* spp. from foods. *J Appl Microbiol* **89**:884-91.

15. **Beery, J. T., M. B. Hugdahl, and M. P. Doyle.** 1988. Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* **54**:2365-70.
16. **Bereswill, S., and M. Kist.** 2002. Molecular microbiology and pathogenesis of *Helicobacter* and *Campylobacter* updated: a meeting report of the 11th conference on *Campylobacter*, *Helicobacter* and related organisms. *Mol Microbiol* **45**:255-62.
17. **Bereswill, S., and M. Kist.** 2003. Recent developments in *Campylobacter* pathogenesis. *Curr Opin Infect Dis* **16**:487-91.
18. **Berndtson, E., M. L. Danielsson-Tham, and A. Engvall.** 1996. *Campylobacter* incidence on a chicken farm and the spread of *Campylobacter* during the slaughter process. *Int J Food Microbiol* **32**:35-47.
19. **Berrang, M. E., R. J. Buhr, J. A. Cason, and J. A. Dickens.** 2001. Broiler carcass contamination with *Campylobacter* from feces during defeathering. *J Food Prot* **64**:2063-6.
20. **Biswas, D., K. Itoh, and C. Sasakawa.** 2003. Role of microfilaments and microtubules in the invasion of INT-407 cells by *Campylobacter jejuni*. *Microbiol Immunol* **47**:469-73.
21. **Black, R. E., M. M. Levine, M. L. Clements, T. P. Hughes, and M. J. Blaser.** 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J Infect Dis* **157**:472-9.
22. **Bolton, F. J., D. Coates, and D. N. Hutchinson.** 1984. The ability of *Campylobacter* media supplements to neutralize photochemically induced toxicity and hydrogen peroxide. *J Appl Bacteriol* **56**:151-7.
23. **Bolton, F. J., D. N. Hutchinson, and G. Parker.** 1987. Isolation of *Campylobacter*: what are we missing? *J Clin Pathol* **40**:702-3.
24. **Buhr, R. J., N. A. Cox, N. J. Stern, M. T. Musgrove, J. L. Wilson, and K. L. Hiatt.** 2002. Recovery of *Campylobacter* from segments of the reproductive tract of broiler breeder hens. *Avian Dis* **46**:919-24.
25. **Butaye, P., L. A. Devriese, and F. Haesebrouck.** 2003. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clin Microbiol Rev* **16**:175-88.
26. **Butzler, J.-P.** 2001, posting date. *Campylobacteriosis in humans (A historical review)*. [Online.]
27. **Bywater, R., H. Deluyker, E. Deroover, A. de Jong, H. Marion, M. McConville, T. Rowan, T. Shryock, D. Shuster, V. Thomas, M. Valle, and J. Walters.** 2004. A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. *J Antimicrob Chemother* **54**:744-54.
28. **Cain, B. D., P. J. Norton, W. Eubanks, H. S. Nick, and C. M. Allen.** 1993. Amplification of the *bacA* gene confers bacitracin resistance to *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**:3784-9.
29. **Camarda, A., D. G. Newell, R. Nasti, and G. Di Modugnoa.** 2000. Genotyping *Campylobacter jejuni* strains isolated from the gut and oviduct of laying hens. *Avian Dis* **44**:907-12.
30. **CDC** 2000, posting date. *CDC. FoodNet Surveillance Report for 2000: Final Report*. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention;2000. [Online.]

31. **Champion, O. L., E. L. Best, and J. A. Frost.** 2002. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism techniques for investigating outbreaks of enteritis due to *Campylobacter*. *J Clin Microbiol* **40**:2263-5.
32. **Collins, S., E. O'Loughlin, J. O'Rourke, Z. Li, A. Lee, and M. Howden.** 1992. A cytotoxic, cholera toxin-like protein produced by *Campylobacter jejuni*. *Comp Biochem Physiol B* **103**:299-303.
33. **Connell, S. R., C. A. Trieber, G. P. Dinos, E. Einfeldt, D. E. Taylor, and K. H. Nierhaus.** 2003. Mechanism of Tet(O)-mediated tetracycline resistance. *Embo J* **22**:945-53.
34. **Corry, J. E., D. E. Post, P. Colin, and M. J. Laisney.** 1995. Culture media for the isolation of *Campylobacter*. *Int J Food Microbiol* **26**:43-76.
35. **Cox, N. A., N. J. Stern, K. L. Hiett, and M. E. Berrang.** 2002. Identification of a new source of *Campylobacter* contamination in poultry: transmission from breeder hens to broiler chickens. *Avian Dis* **46**:535-41.
36. **Cox, N. A., J. E. Thomson, and J. S. Bailey.** 1981. Sampling of broiler carcasses for *Salmonella* with low volume water rinse. *Poult Sci* **60**:768-70.
37. **Crushell, E., S. Harty, F. Sharif, and B. Bourke.** 2004. Enteric *Campylobacter*: purging its secrets? *Pediatr Res* **55**:3-12.
38. **Desmonts, M. H., F. Dufour-Gesbert, L. Avrain, and I. Kempf.** 2004. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* strains isolated from French broilers before and after antimicrobial growth promoter bans. *J Antimicrob Chemother* **54**:1025-30.
39. **Dingle, K. E., F. M. Colles, R. Ure, J. A. Wagenaar, B. Duim, F. J. Bolton, A. J. Fox, D. R. Wareing, and M. C. Maiden.** 2002. Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* clones: a basis for epidemiologic investigation. *Emerg Infect Dis* **8**:949-55.
40. **Dingle, K. E., F. M. Colles, D. R. Wareing, R. Ure, A. J. Fox, F. E. Bolton, H. J. Bootsma, R. J. Willems, R. Urwin, and M. C. Maiden.** 2001. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* **39**:14-23.
41. **Doyle, M. P.** 1984. Association of *Campylobacter jejuni* with laying hens and eggs. *Appl Environ Microbiol* **47**:533-6.
42. **Endtz, H. P., G. J. Ruijs, A. H. Zwinderman, T. van der Reijden, M. Biever, and R. P. Mouton.** 1991. Comparison of six media, including a semisolid agar, for the isolation of various *Campylobacter* species from stool specimens. *J Clin Microbiol* **29**:1007-10.
43. **Engberg, J., F. M. Aarestrup, D. E. Taylor, P. Gerner-Smidt, and I. Nachamkin.** 2001. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg Infect Dis* **7**:24-34.
44. **Evans, S. J., and A. R. Sayers.** 2000. A longitudinal study of *Campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain. *Prev Vet Med* **46**:209-23.
45. **Everest, P. H., H. Goossens, J. P. Butzler, D. Lloyd, S. Knutton, J. M. Ketley, and P. H. Williams.** 1992. Differentiated Caco-2 cells as a model for enteric invasion by *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *J Med Microbiol* **37**:319-25.

46. **Florin, I., and F. Antillon.** 1992. Production of enterotoxin and cytotoxin in *Campylobacter jejuni* strains isolated in Costa Rica. *J Med Microbiol* **37**:22-9.
47. **Frei, A., D. Goldenberger, and M. Teuber.** 2001. Antimicrobial susceptibility of intestinal bacteria from Swiss poultry flocks before the ban of antimicrobial growth promoters. *Syst Appl Microbiol* **24**:116-21.
48. **Friedman, C. R., Neimann, J., Wegener, H.C., Tauxe, R.V.** 2000. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* Infections in the United States and other Industrialized Nations, p. 121-138. *In* I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
49. **Gaudreau, C., and H. Gilbert.** 2003. Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* strains isolated from humans in 1998 to 2001 in Montreal, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:2027-9.
50. **Gaudreau, C., and H. Gilbert.** 1998. Antimicrobial resistance of clinical strains of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* isolated from 1985 to 1997 in Quebec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:2106-8.
51. **Gaudreau, C., and S. Michaud.** 2003. Cluster of erythromycin- and ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* from 1999 to 2001 in men who have sex with men, Quebec, Canada. *Clin Infect Dis* **37**:131-6.
52. **Gibreel, A., V. N. Kos, M. Keelan, C. A. Trieber, S. Levesque, S. Michaud, and D. E. Taylor.** 2005. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: molecular mechanism and stability of the resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2753-9.
53. **Gibreel, A., E. Sjogren, B. Kaijser, B. Wretling, and O. Skold.** 1998. Rapid emergence of high-level resistance to quinolones in *Campylobacter jejuni* associated with mutational changes in *gyrA* and *parC*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:3276-8.
54. **Gibreel, A., and O. Skold.** 2000. An integron cassette carrying *dfr1* with 90-bp repeat sequences located on the chromosome of trimethoprim-resistant isolates of *Campylobacter jejuni*. *Microb Drug Resist* **6**:91-8.
55. **Gibreel, A., D. M. Tracz, L. Nonaka, T. M. Ngo, S. R. Connell, and D. E. Taylor.** 2004. Incidence of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* isolated in Alberta, Canada, from 1999 to 2002, with special reference to *tet(O)*-mediated tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3442-50.
56. **Gorman, R., and C. C. Adley.** 2004. An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of -20 degrees C and -85 degrees C for long-term preservation of *Campylobacter jejuni*. *Lett Appl Microbiol* **38**:306-10.
57. **Grant, C. C., M. E. Konkell, W. Cieplak, Jr., and L. S. Tompkins.** 1993. Role of flagella in adherence, internalization, and translocation of *Campylobacter jejuni* in nonpolarized and polarized epithelial cell cultures. *Infect Immun* **61**:1764-71.
58. **Gray, J. T., L. L. Hungerford, P. J. Fedorka-Cray, and M. L. Headrick.** 2004. Extended-spectrum-cephalosporin resistance in *Salmonella enterica* isolates of animal origin. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3179-81.
59. **Guerry, P., R. A. Alm, M. E. Power, S. M. Logan, and T. J. Trust.** 1991. Role of two flagellin genes in *Campylobacter* motility. *J Bacteriol* **173**:4757-64.

60. **Guévremont, E.** 2005. Caractérisation génétique et étude de l'antibiorésistance d'isolats de *Campylobacter* retrouvés chez le porc, la volaille et l'humain.
61. **Gun-Munro, J., R. P. Rennie, J. H. Thornley, H. L. Richardson, D. Hodge, and J. Lynch.** 1987. Laboratory and clinical evaluation of isolation media for *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* **25**:2274-7.
62. **Hendrixson, D. R., and V. J. DiRita.** 2004. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. *Mol Microbiol* **52**:471-84.
63. **Herman, L., M. Heyndrickx, K. Grijspeerdt, D. Vandekerchove, I. Rollier, and L. De Zutter.** 2003. Routes for *Campylobacter* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiol Infect* **131**:1169-80.
64. **Hiett, K. L., N. A. Cox, R. J. Buhr, and N. J. Stern.** 2002. Genotype analyses of *Campylobacter* isolated from distinct segments of the reproductive tracts of broiler breeder hens. *Curr Microbiol* **45**:400-4.
65. **Hiett, K. L., G. R. Siragusa, N. A. Cox, R. J. Buhr, M. T. Musgrove, N. J. Stern, and J. L. Wilson.** 2003. Genotype analyses of *Campylobacter* isolated from the gastrointestinal tracts and the reproductive tracts of broiler breeder roosters. *Avian Dis* **47**:406-14.
66. **Hiett, K. L., N. J. Stern, P. Fedorka-Cray, N. A. Cox, M. T. Musgrove, and S. Ladely.** 2002. Molecular subtype analyses of *Campylobacter* spp. from Arkansas and California poultry operations. *Appl Environ Microbiol* **68**:6220-36.
67. **Hook, H., M. A. Fattah, H. Ericsson, I. Vagsholm, and M. L. Danielsson-Tham.** 2005. Genotype dynamics of *Campylobacter jejuni* in a broiler flock. *Vet Microbiol* **106**:109-17.
68. **Hu, L., Kopecko, J.** 2000. Interactions of *Campylobacter* with Eucaryotic Cells: Gut Luminal Colonization and Mucosal Invasion Mechanisms., p. 191-215. *In* I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
69. **Hugdahl, M. B., J. T. Beery, and M. P. Doyle.** 1988. Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* **56**:1560-6.
70. **Humphrey, T. J.** 1986. Techniques for the optimum recovery of cold injured *Campylobacter jejuni* from milk or water. *J Appl Bacteriol* **61**:125-32.
71. **Humphrey, T. J., A. Henley, and D. G. Lanning.** 1993. The colonization of broiler chickens with *Campylobacter jejuni*: some epidemiological investigations. *Epidemiol Infect* **110**:601-7.
72. **Humphrey, T. J., F. Jorgensen, J. A. Frost, H. Wadda, G. Domingue, N. C. Elviss, D. J. Griggs, and L. J. Piddock.** 2005. Prevalence and subtypes of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* spp. in commercial poultry flocks before, during, and after treatment with fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:690-8.
73. **Hunter, S. B., P. Vauterin, M. A. Lambert-Fair, M. S. Van Duynne, K. Kubota, L. Graves, D. Wrigley, T. Barrett, and E. Ribot.** 2005. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. *J Clin Microbiol* **43**:1045-50.

74. **Jacobs-Reitsma, W. F.** 1997. Aspects of epidemiology of *Campylobacter* in poultry. *Vet Q* **19**:113-7.
75. **Jeffrey, J. S., A. Hunter, and E. R. Atwill.** 2000. A field-suitable, semisolid aerobic enrichment medium for isolation of *Campylobacter jejuni* in small numbers. *J Clin Microbiol* **38**:1668-9.
76. **Jeffrey, J. S., K. H. Tonooka, and J. Lozanot.** 2001. Prevalence of *Campylobacter* spp. from skin, crop, and intestine of commercial broiler chicken carcasses at processing. *Poult Sci* **80**:1390-2.
77. **Johnson, W. M., and H. Lior.** 1988. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb Pathog* **4**:115-26.
78. **Jorgensen, F., R. Bailey, S. Williams, P. Henderson, D. R. Wareing, F. J. Bolton, J. A. Frost, L. Ward, and T. J. Humphrey.** 2002. Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. *Int J Food Microbiol* **76**:151-64.
79. **Josefsen, M. H., P. S. Lubeck, F. Hansen, and J. Hoorfar.** 2004. Towards an international standard for PCR-based detection of foodborne thermotolerant *campylobacters*: interaction of enrichment media and pre-PCR treatment on carcass rinse samples. *J Microbiol Methods* **58**:39-48.
80. **Kapperud, G., E. Skjerve, L. Vik, K. Hauge, A. Lysaker, I. Aalmen, S. M. Ostroff, and M. Potter.** 1993. Epidemiological investigation of risk factors for *Campylobacter* colonization in Norwegian broiler flocks. *Epidemiol Infect* **111**:245-55.
81. **Karlyshev, A. V., and B. W. Wren.** 2001. Detection and initial characterization of novel capsular polysaccharide among diverse *Campylobacter jejuni* strains using alcian blue dye. *J Clin Microbiol* **39**:279-84.
82. **Karmali, M. A., A. E. Simor, M. Roscoe, P. C. Fleming, S. S. Smith, and J. Lane.** 1986. Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. *J Clin Microbiol* **23**:456-9.
83. **Kenjale, R., J. Wilson, S. F. Zenk, S. Saurya, W. L. Picking, W. D. Picking, and A. Blocker.** 2005. The needle component of the type III secretion of *Shigella* regulates the activity of the secretion apparatus. *J Biol Chem*.
84. **Ketley, J. M.** 1997. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology* **143 (Pt 1)**:5-21.
85. **Kist, M.** 1986. [Who discovered *Campylobacter jejuni/coli*? A review of hitherto disregarded literature]. *Zentralbl Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene [A]* **261**:177-86.
86. **Klipstein, F. A., and R. F. Engert.** 1985. Immunological relationship of the B subunits of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. *Infect Immun* **48**:629-33.
87. **Klipstein, F. A., and R. F. Engert.** 1984. Properties of crude *Campylobacter jejuni* heat-labile enterotoxin. *Infect Immun* **45**:314-9.
88. **Konkel, M. E., S. G. Garvis, S. L. Tipton, D. E. Anderson, Jr., and W. Cieplak, Jr.** 1997. Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol* **24**:953-63.
89. **Konkel, M. E., B. J. Kim, V. Rivera-Amill, and S. G. Garvis.** 1999. Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Mol Microbiol* **32**:691-701.

90. **Kopecko, D. J., L. Hu, and K. J. Zaal.** 2001. *Campylobacter jejuni*--microtubule-dependent invasion. *Trends Microbiol* **9**:389-96.
91. **Korhonen, L. K., and P. J. Martikainen.** 1990. Comparison of some enrichment broths and growth media for the isolation of thermophilic *campylobacters* from surface water samples. *J Appl Bacteriol* **68**:593-9.
92. **Lachance, N., C. Gaudreau, F. Lamothe, and F. Turgeon.** 1993. Susceptibilities of beta-lactamase-positive and -negative strains of *Campylobacter coli* to beta-lactam agents. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:1174-6.
93. **Lara-Tejero, M., and J. E. Galan.** 2001. CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. *Infect Immun* **69**:4358-65.
94. **Lin, J., L. O. Michel, and Q. Zhang.** 2002. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2124-31.
95. **Lindmark, H., B. Harbom, L. Thebo, L. Andersson, G. Hedin, B. Osterman, T. Lindberg, Y. Andersson, A. Westoo, and E. Olsson Engvall.** 2004. Genetic characterization and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from meats, water, and humans in Sweden. *J Clin Microbiol* **42**:700-6.
96. **Line, J. E., N. J. Stern, C. P. Lattuada, and S. T. Benson.** 2001. Comparison of methods for recovery and enumeration of *Campylobacter* from freshly processed broilers. *J Food Prot* **64**:982-6.
97. **Luber, P., J. Wagner, H. Hahn, and E. Bartelt.** 2003. Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated in 1991 and 2001-2002 from poultry and humans in Berlin, Germany. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:3825-30.
98. **Luo, N., O. Sahin, J. Lin, L. O. Michel, and Q. Zhang.** 2003. In vivo selection of *Campylobacter* isolates with high levels of fluoroquinolone resistance associated with *gyrA* mutations and the function of the CmeABC efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:390-4.
99. **Lux, R., and W. Shi.** 2004. Chemotaxis-guided movements in bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* **15**:207-20.
100. **Maiden, M. F., A. C. Tanner, P. J. Macuch, L. Murray, and R. L. Kent, Jr.** 1998. Subgingival temperature and microbiota in initial periodontitis. *J Clin Periodontol* **25**:786-93.
101. **Maravic, G.** 2004. Macrolide resistance based on the Erm-mediated rRNA methylation. *Curr Drug Targets Infect Disord* **4**:193-202.
102. **McCardell, B. A., J. M. Madden, and E. C. Lee.** 1984. Production of cholera-like toxin by *Campylobacter jejuni/coli*. *Lancet* **1**:448-9.
103. **Meldrum, R. J., J. K. Griffiths, R. M. Smith, and M. R. Evans.** 2005. The seasonality of human *Campylobacter* infection and *Campylobacter* isolates from fresh, retail chicken in Wales. *Epidemiol Infect* **133**:49-52.
104. **Michaud, S., R. D. Arbeit, and C. Gaudreau.** 2001. Molecular strain typing of *Campylobacter jejuni* by pulsed-field gel electrophoresis in a single day. *Can J Microbiol* **47**:667-9.
105. **Miwa, N., Y. Takegahara, K. Terai, H. Kato, and T. Takeuchi.** 2003. *Campylobacter jejuni* contamination on broiler carcasses of *C. jejuni*-negative

- flocks during processing in a Japanese slaughterhouse. *Int J Food Microbiol* **84**:105-9.
106. **Monteville, M. R., J. E. Yoon, and M. E. Konkel.** 2003. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiology* **149**:153-65.
 107. **Moore, J. E., D. Corcoran, J. S. Dooley, S. Fanning, B. Lucey, M. Matsuda, D. A. McDowell, F. Megraud, B. C. Millar, R. O'Mahony, L. O'Riordan, M. O'Rourke, J. R. Rao, P. J. Rooney, A. Sails, and P. Whyte.** 2005. *Campylobacter*. *Vet Res* **36**:351-82.
 108. **Moser, I., and W. Schroder.** 1997. Hydrophobic characterization of thermophilic *Campylobacter* species and adhesion to INT 407 cell membranes and fibronectin. *Microb Pathog* **22**:155-64.
 109. **Murray, P. R., E. J. Baron, and American Society for Microbiology.** 2003. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.
 110. **Musgrove, M. T., M. E. Berrang, J. A. Byrd, N. J. Stern, and N. A. Cox.** 2001. Detection of *Campylobacter* spp. in ceca and crops with and without enrichment. *Poult Sci* **80**:825-8.
 111. **Musgrove, M. T., N. A. Cox, M. E. Berrang, and M. A. Harrison.** 2003. Comparison of weep and carcass rinses for recovery of *Campylobacter* from retail broiler carcasses. *J Food Prot* **66**:1720-3.
 112. **Nachamkin, I.** 1997. *Campylobacter jejuni*, p. 159-170. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville (ed.), *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. ASM Press, Washington, D.C.
 113. **Nachamkin, I., X. H. Yang, and N. J. Stern.** 1993. Role of *Campylobacter jejuni* flagella as colonization factors for three-day-old chicks: analysis with flagellar mutants. *Appl Environ Microbiol* **59**:1269-73.
 114. **Nadeau, E., S. Messier, and S. Quessy.** 2002. Prevalence and comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry and sporadic cases of campylobacteriosis in humans. *J Food Prot* **65**:73-8.
 115. **NCCLS.** 2002. Performance Standards for Antimicrobial Dis and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. NCCLS document M31-A2 **22**; **Approved Standard-Second Edition**.
 116. **NCCLS.** 2004. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. NCCLS document M31-S1 **24**; **Informational Supplement**.
 117. **Neisser, A., H. Bernheimer, T. Berger, A. P. Moran, and B. Schwerer.** 1997. Serum antibodies against gangliosides and *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides in Miller Fisher syndrome. *Infect Immun* **65**:4038-42.
 118. **Newell, D. G., and C. Fearnley.** 2003. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* **69**:4343-51.
 119. **Newell, D. G., Frost, J.A., Duim, B., Wagenaar, J.A., Maiden, R.H., van der Plas, J., On, S.L.W.** 2000. New Developments in the Subtyping of *Campylobacter* Species, p. 27-44. In I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
 120. **Newell, D. G., J. E. Shreeve, M. Toszeghy, G. Domingue, S. Bull, T. Humphrey, and G. Mead.** 2001. Changes in the carriage of *Campylobacter*

- strains by poultry carcasses during processing in abattoirs. *Appl Environ Microbiol* **67**:2636-40.
121. **Nielsen, E. M., J. Engberg, and V. Fussing.** 2001. Genotypic and serotypic stability of *Campylobacter jejuni* strains during in vitro and in vivo passage. *Int J Med Microbiol* **291**:379-85.
 122. **Nielsen, E. M., J. Engberg, V. Fussing, L. Petersen, C. H. Brogren, and S. L. On.** 2000. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry, and cattle. *J Clin Microbiol* **38**:3800-10.
 123. **Normand, V., Boulianne, M., Quessy, S.** Evidence of cross-contamination by *Campylobacter* spp. of broiler carcasses using genetic characterization of isolates. Submitted for publication.
 124. **On, S. L.** 1996. Identification methods for *campylobacters*, *helicobacters*, and related organisms. *Clin Microbiol Rev* **9**:405-22.
 125. **On, S. L.** 1998. In vitro genotypic variation of *Campylobacter coli* documented by pulsed-field gel electrophoretic DNA profiling: implications for epidemiological studies. *FEMS Microbiol Lett* **165**:341-6.
 126. **Ono, K., T. Kurazono, H. Niwa, and K. Itoh.** 2003. Comparison of three methods for epidemiological typing of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Curr Microbiol* **47**:364-71.
 127. **Oyofe, B. A., S. A. Thornton, D. H. Burr, T. J. Trust, O. R. Pavlovskis, and P. Guerry.** 1992. Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **30**:2613-9.
 128. **Oza, A. N., J. P. McKenna, S. W. McDowell, F. D. Menzies, and S. D. Neill.** 2003. Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* spp. isolated from broiler chickens in Northern Ireland. *J Antimicrob Chemother* **52**:220-3.
 129. **Park, S. F.** 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* **74**:177-88.
 130. **Paulsen, P., P. Kanzler, F. Hilbert, S. Mayrhofer, S. Baumgartner, and F. J. Smulders.** 2005. Comparison of three methods for detecting *Campylobacter* spp. in chilled or frozen meat. *Int J Food Microbiol*.
 131. **Pei, Z., and M. J. Blaser.** 1993. PEB1, the major cell-binding factor of *Campylobacter jejuni*, is a homolog of the binding component in gram-negative nutrient transport systems. *J Biol Chem* **268**:18717-25.
 132. **Pei, Z. H., R. T. Ellison, 3rd, and M. J. Blaser.** 1991. Identification, purification, and characterization of major antigenic proteins of *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem* **266**:16363-9.
 133. **Penn, C. W.** 2001. Surface components of *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*:25S-35S.
 134. **Penner, J. L.** 1988. The genus *Campylobacter*: a decade of progress. *Clin Microbiol Rev* **1**:157-72.
 135. **Perez Perez, G. I., and M. J. Blaser.** 1985. Lipopolysaccharide characteristics of pathogenic *campylobacters*. *Infect Immun* **47**:353-9.
 136. **Perko-Makela, P., M. Hakkinen, T. Honkanen-Buzalski, and M. L. Hanninen.** 2002. Prevalence of *campylobacters* in chicken flocks during the summer of 1999 in Finland. *Epidemiol Infect* **129**:187-92.

137. **Petersen, L., and S. L. On.** 2000. Efficacy of flagellin gene typing for epidemiological studies of *Campylobacter jejuni* in poultry estimated by comparison with macrorestriction profiling. *Lett Appl Microbiol* **31**:14-9.
138. **Petersen, L., and A. Wedderkopp.** 2001. Evidence that certain clones of *Campylobacter jejuni* persist during successive broiler flock rotations. *Appl Environ Microbiol* **67**:2739-45.
139. **Phillips, I., M. Casewell, T. Cox, B. De Groot, C. Friis, R. Jones, C. Nightingale, R. Preston, and J. Waddell.** 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemother* **53**:28-52.
140. **Pickett, C. L.** 2000. *Campylobacter* Toxins and their Role in Pathogenesis, p. 179-190. In I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
141. **Pickett, C. L., E. C. Pesci, D. L. Cottle, G. Russell, A. N. Erdem, and H. Zeytin.** 1996. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* spp. *cdtB* gene. *Infect Immun* **64**:2070-8.
142. **PICRA.** 2003. Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA)-Rapport Annuel. Santé Canada **Second Edition**:113 pages.
143. **Poehlsgaard, J., P. Pfister, E. C. Bottger, and S. Douthwaite.** 2005. Molecular mechanisms by which rRNA mutations confer resistance to clindamycin. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1553-5.
144. **Poppe, C., L. C. Martin, C. L. Gyles, R. Reid-Smith, P. Boerlin, S. A. McEwen, J. F. Prescott, and K. R. Forward.** 2005. Acquisition of resistance to extended-spectrum cephalosporins by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport and *Escherichia coli* in the turkey poult intestinal tract. *Appl Environ Microbiol* **71**:1184-92.
145. **Price, L. B., E. Johnson, R. Vailes, and E. Silbergeld.** 2005. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* isolates from conventional and antibiotic-free chicken products. *Environ Health Perspect* **113**:557-60.
146. **Pumbwe, L., and L. J. Piddock.** 2002. Identification and molecular characterisation of CmeB, a *Campylobacter jejuni* multidrug efflux pump. *FEMS Microbiol Lett* **206**:185-9.
147. **Pumbwe, L., L. P. Randall, M. J. Woodward, and L. J. Piddock.** 2005. Evidence for multiple-antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* not mediated by CmeB or CmeF. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1289-93.
148. **Pumbwe, L., L. P. Randall, M. J. Woodward, and L. J. Piddock.** 2004. Expression of the efflux pump genes *cmeB*, *cmeF* and the porin gene *porA* in multiple-antibiotic-resistant *Campylobacter jejuni*. *J Antimicrob Chemother* **54**:341-7.
149. **Randall, L. P., A. M. Ridley, S. W. Cooles, M. Sharma, A. R. Sayers, L. Pumbwe, D. G. Newell, L. J. Piddock, and M. J. Woodward.** 2003. Prevalence of multiple antibiotic resistance in 443 *Campylobacter* spp. isolated from humans and animals. *J Antimicrob Chemother* **52**:507-10.
150. **Rao, D., J. R. Rao, E. Crothers, R. McMullan, D. McDowell, A. McMahon, P. J. Rooney, B. C. Millar, and J. E. Moore.** 2005. Increased erythromycin

- resistance in clinical *Campylobacter* in Northern Ireland--an update. *J Antimicrob Chemother* **55**:395-6.
151. **Refregier-Petton, J., N. Rose, M. Denis, and G. Salvat.** 2001. Risk factors for *Campylobacter* spp. contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. *Prev Vet Med* **50**:89-100.
 152. **Rivoal, K., M. Denis, G. Salvat, P. Colin, and G. Ermel.** 1999. Molecular characterization of the diversity of *Campylobacter* spp. isolates collected from a poultry slaughterhouse: analysis of cross-contamination. *Lett Appl Microbiol* **29**:370-4.
 153. **Robinson, D. A.** 1981. *Campylobacter* infection. *R Soc Health J* **101**:138-40.
 154. **Rudi, K., H. K. Hoidal, T. Katla, B. K. Johansen, J. Nordal, and K. S. Jakobsen.** 2004. Direct real-time PCR quantification of *Campylobacter jejuni* in chicken fecal and cecal samples by integrated cell concentration and DNA purification. *Appl Environ Microbiol* **70**:790-7.
 155. **Ruiz-Palacios, G. M., J. Torres, N. I. Torres, E. Escamilla, B. R. Ruiz-Palacios, and J. Tamayo.** 1983. Cholera-like enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni*. Characterisation and clinical significance. *Lancet* **2**:250-3.
 156. **Sahin, O., P. Kobalka, and Q. Zhang.** 2003. Detection and survival of *Campylobacter* in chicken eggs. *J Appl Microbiol* **95**:1070-9.
 157. **Sahin, O., T. Y. Morishita, and Q. Zhang.** 2002. *Campylobacter* colonization in poultry: sources of infection and modes of transmission. *Anim Health Res Rev* **3**:95-105.
 158. **Salyers, A. A., and D. D. Whitt.** 2002. Bacterial pathogenesis: a molecular approach, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
 159. **Santé-Canada.** 2003. Rapport sur la surveillance canadienne intégrée: *Salmonella*, *Campylobacter*, *E.coli* pathogène et *Shigella*, de 1996 à 1999 RMTC 2003. Santé Canada.
 160. **Sebald, M., and M. Veron.** 1963. [Base Dna Content And Classification Of Vibrios.]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **105**:897-910.
 161. **Shih, D. Y.** 2000. Isolation and identification of enteropathogenic *Campylobacter* spp. from chicken samples in Taipei. *J Food Prot* **63**:304-8.
 162. **Shreeve, J. E., M. Toszeghy, A. Ridley, and D. G. Newell.** 2002. The carry-over of *Campylobacter* isolates between sequential poultry flocks. *Avian Dis* **46**:378-85.
 163. **Skirrow, M. B.** 1977. *Campylobacter* enteritis: a "new" disease. *Br Med J* **2**:9-11.
 164. **Slader, J., G. Domingue, F. Jorgensen, K. McAlpine, R. J. Owen, F. J. Bolton, and T. J. Humphrey.** 2002. Impact of transport crate reuse and of catching and processing on *Campylobacter* and *Salmonella* contamination of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* **68**:713-9.
 165. **Steele, M., B. McNab, L. Fruhner, S. DeGrandis, D. Woodward, and J. A. Odumeru.** 1998. Epidemiological typing of *Campylobacter* isolates from meat processing plants by pulsed-field gel electrophoresis, fatty acid profile typing, serotyping, and biotyping. *Appl Environ Microbiol* **64**:2346-9.
 166. **Steinbrueckner, B., G. Haerter, K. Pelz, and M. Kist.** 1999. Routine identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from human stool samples. *FEMS Microbiol Lett* **179**:227-32.

167. **Stern, N. J., J. S. Bailey, L. C. Blankenship, N. A. Cox, and F. McHan.** 1988. Colonization characteristics of *Campylobacter jejuni* in chick ceca. *Avian Dis* **32**:330-4.
168. **Stern, N. J., M. R. Clavero, J. S. Bailey, N. A. Cox, and M. C. Robach.** 1995. *Campylobacter* spp. in broilers on the farm and after transport. *Poult Sci* **74**:937-41.
169. **Stern, N. J., Cox, N.A., Hiatt, K.L.** 2001. Strategies for controlling *Campylobacter* spp. in poultry.
170. **Stern, N. J., P. Fedorka-Cray, J. S. Bailey, N. A. Cox, S. E. Craven, K. L. Hiatt, M. T. Musgrove, S. Ladely, D. Cosby, and G. C. Mead.** 2001. Distribution of *Campylobacter* spp. in selected U.S. poultry production and processing operations. *J Food Prot* **64**:1705-10.
171. **Stern, N. J., K. L. Hiatt, G. A. Alfredsson, K. G. Kristinsson, J. Reiersen, H. Hardardottir, H. Briem, E. Gunnarsson, F. Georgsson, R. Lowman, E. Berndtson, A. M. Lammerding, G. M. Paoli, and M. T. Musgrove.** 2003. *Campylobacter* spp. in Icelandic poultry operations and human disease. *Epidemiol Infect* **130**:23-32.
172. **Stern, N. J., and M. C. Robach.** 2003. Enumeration of *Campylobacter* spp. in broiler feces and in corresponding processed carcasses. *J Food Prot* **66**:1557-63.
173. **Stucki, U., J. Frey, J. Nicolet, and A. P. Burnens.** 1995. Identification of *Campylobacter jejuni* on the basis of a species-specific gene that encodes a membrane protein. *J Clin Microbiol* **33**:855-9.
174. **Taboada, E. N., R. R. Acedillo, C. D. Carrillo, W. A. Findlay, D. T. Medeiros, O. L. Mykytczuk, M. J. Roberts, C. A. Valencia, J. M. Farber, and J. H. Nash.** 2004. Large-scale comparative genomics meta-analysis of *Campylobacter jejuni* isolates reveals low level of genome plasticity. *J Clin Microbiol* **42**:4566-76.
175. **Takata, T., S. Fujimoto, and K. Amako.** 1992. Isolation of nonchemotactic mutants of *Campylobacter jejuni* and their colonization of the mouse intestinal tract. *Infect Immun* **60**:3596-600.
176. **Tanner, A. C.** 2000. Antimicrobial Drug Use in Poultry, p. 637-654. *In* J. D. B. John F. Prescott, R.D. Walker, 3rd edition (ed.), *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*, vol. 1. Iowa State University Press, Ames.
177. **Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**:2233-9.
178. **Tsang, R. S.** 2002. The relationship of *Campylobacter jejuni* infection and the development of Guillain-Barre syndrome. *Curr Opin Infect Dis* **15**:221-8.
179. **Vacher, S., A. Menard, E. Bernard, and F. Megraud.** 2003. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for detection of point mutations associated with macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:1125-8.
180. **Vacher, S., A. Menard, E. Bernard, A. Santos, and F. Megraud.** 2005. Detection of mutations associated with macrolide resistance in thermophilic *Campylobacter* spp. by real-time PCR. *Microb Drug Resist* **11**:40-7.

181. **van de Giessen, A. W., B. P. Bloemberg, W. S. Ritmeester, and J. J. Tilburg.** 1996. Epidemiological study on risk factors and risk reducing measures for *Campylobacter* infections in Dutch broiler flocks. *Epidemiol Infect* **117**:245-50.
182. **van den Bogaard, A. E., and E. E. Stobberingh.** 1999. Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health. *Drugs* **58**:589-607.
183. **Vandamme, P.** 2000. Taxonomy of the Family *Campylobacteraceae*, p. 3-26. *In* I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
184. **Wadstrom, T., S. B. Baloda, K. Krovacek, A. Faris, S. Bengtson, and M. Walder.** 1983. Swedish isolates of *Campylobacter jejuni/coli* do not produce cytotoxic or cytotoxic enterotoxins. *Lancet* **2**:911.
185. **Walsh, C.** 2003. Antibiotics: actions, origins, resistance. ASM Press, Washington, D.C.
186. **Wang, G., C. G. Clark, T. M. Taylor, C. Pucknell, C. Barton, L. Price, D. L. Woodward, and F. G. Rodgers.** 2002. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J Clin Microbiol* **40**:4744-7.
187. **Wang, Y., and D. E. Taylor.** 1990. Natural transformation in *Campylobacter* species. *J Bacteriol* **172**:949-55.
188. **Wareing, D. R., R. Ure, F. M. Colles, F. J. Bolton, A. J. Fox, M. C. Maiden, and K. E. Dingle.** 2003. Reference isolates for the clonal complexes of *Campylobacter jejuni*. *Lett Appl Microbiol* **36**:106-10.
189. **Wasfy, M., B. Oyofu, A. Elgindy, and A. Churilla.** 1995. Comparison of preservation media for storage of stool samples. *J Clin Microbiol* **33**:2176-8.
190. **Wassenaar, T. M.** 1997. Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clin Microbiol Rev* **10**:466-76.
191. **Wassenaar, T. M., N. M. Bleumink-Pluym, and B. A. van der Zeijst.** 1991. Inactivation of *Campylobacter jejuni* flagellin genes by homologous recombination demonstrates that *flaA* but not *flaB* is required for invasion. *Embo J* **10**:2055-61.
192. **Wassenaar, T. M., B. Geilhausen, and D. G. Newell.** 1998. Evidence of genomic instability in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry. *Appl Environ Microbiol* **64**:1816-21.
193. **Wassenaar, T. M., and D. G. Newell.** 2000. Genotyping of *Campylobacter* spp. *Appl Environ Microbiol* **66**:1-9.
194. **Wedderkopp, A., E. Rattenborg, and M. Madsen.** 2000. National surveillance of *Campylobacter* in broilers at slaughter in Denmark in 1998. *Avian Dis* **44**:993-9.
195. **Whatling, C. A., and C. M. Thomas.** 1993. Preelectrophoresis of agarose plugs containing bacterial chromosomal DNA prepared for analysis by pulsed field gel electrophoresis can improve the clarity of restriction patterns. *Anal Biochem* **210**:98-101.
196. **White, D. G., S. Zhao, R. Singh, and P. F. McDermott.** 2004. Antimicrobial resistance among gram-negative foodborne bacterial pathogens associated with foods of animal origin. *Foodborne Pathog Dis* **1**:137-52.

197. **Whyte, P., J. D. Collins, K. McGill, C. Monahan, and H. O'Mahony.** 2001. Distribution and prevalence of airborne microorganisms in three commercial poultry processing plants. *J Food Prot* **64**:388-91.
198. **Winer, J. B.** 2001. Guillain Barre syndrome. *Mol Pathol* **54**:381-5.
199. **Wittwer, M., J. Keller, T. M. Wassenaar, R. Stephan, D. Howald, G. Regula, and B. Bissig-Choisat.** 2005. Genetic diversity and antibiotic resistance patterns in a *Campylobacter* population isolated from poultry farms in Switzerland. *Appl Environ Microbiol* **71**:2840-7.
200. **Wooldridge, K. G., and J. M. Ketley.** 1997. *Campylobacter*-host cell interactions. *Trends Microbiol* **5**:96-102.
201. **Yao, R., D. H. Burr, and P. Guerry.** 1997. CheY-mediated modulation of *Campylobacter jejuni* virulence. *Mol Microbiol* **23**:1021-31.
202. **Zhang, Q., J. Lin, and S. Pereira.** 2003. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* in animal reservoirs: dynamics of development, resistance mechanisms and ecological fitness. *Anim Health Res Rev* **4**:63-71.
203. **Zhao, S., P. J. Fedorka-Cray, S. Friedman, P. F. McDermott, R. D. Walker, S. Qaiyumi, S. L. Foley, S. K. Hubert, S. Ayers, L. English, D. A. Dargatz, B. Salamone, and D. G. White.** 2005. Characterization of *Salmonella* Typhimurium of animal origin obtained from the National Antimicrobial Resistance Monitoring System. *Foodborne Pathog Dis* **2**:169-81.
204. **Ziprin, R. L., C. R. Young, L. H. Stanker, M. E. Hume, and M. E. Konkel.** 1999. The absence of cecal colonization of chicks by a mutant of *Campylobacter jejuni* not expressing bacterial fibronectin-binding protein. *Avian Dis* **43**:586-9.



ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant Valérie Normand		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Microbiologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Valérie Normand, Martine Boulianne, Sylvain Quessy	
Titre Evidence of cross-contamination by <i>Campylobacter</i> spp. of broiler carcasses using genetic characterization of isolates	
Revue Journal of Food Protection	Date de publication soumis

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Valérie Normand, Martine Boulianne, Sylvain Quessy	
Titre Antimicrobial resistance of <i>Campylobacter</i> spp strains isolated from broiler chickens at slaughterhouse, in relation with growth promoters used at farm level in province of Québec	
Revue Avian Diseases	Date de publication en préparation

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration À titre de coauteur des articles identifiés ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Valérie Normand inclut ces articles dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Caractérisation phénotypique et génotypique d'isolats de <i>Campylobacter</i> spp. isolés de poulet de chair dans les abattoirs du Québec.		
Coauteur Martine Boulianne	[REDACTED]	Date 29/08/05
Coauteur Sylvain Quessy	[REDACTED]	Date 29/08/05
Coauteur	Signature	Date

¹Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001