

Université de Montréal

Caractérisation génétique et étude de l'antibiorésistance d'isolats de
Campylobacter retrouvés chez le porc, la volaille et l'humain

par

Èvelyne Guévremont

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

Octobre, 2004

©, Èvelyne Guévremont, 2004



SF

607

U54

2005

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

Cette thèse intitulée :

Caractérisation génétique et étude de l'antibiorésistance d'isolats de
Campylobacter retrouvés chez le porc, la volaille et l'humain

présentée par :
Èvelyne Guévremont

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Marcelo Gottschalk
président-rapporteur

Dr Sylvain Quessy
directeur de recherche

Dr Marc Sirois
codirecteur

Dr Serge Messier
membre du jury

Dr François Malouin
examineur externe

Dr André Dallaire
représentant du doyen de la FES

SOMMAIRE

Campylobacter est présentement le principal agent causal de diarrhées d'origine bactérienne chez l'humain dans le monde entier. La très grande majorité des infections sont causées par *C. jejuni* et *C. coli* et sont de nature sporadique. Les viandes de volaille, de porc et de bœuf sont rapportées dans la littérature parmi les vecteurs de transmission les plus fréquents. Ces animaux de consommation sont pratiquement tous colonisés par *Campylobacter* au niveau intestinal. Les carcasses peuvent alors être contaminées lors du processus d'abattage, ce qui signifie qu'une cuisson insuffisante ou une manipulation inadéquate de viande contaminée pourrait mener au développement de la campylobactériose. Le risque de contamination pour l'humain associé à la consommation de viande porcine est peu connu. L'analyse et la caractérisation de ce risque constituaient le point de départ de cette étude.

Près de 850 échantillons de contenu intestinal provenant de porcs sains à l'abattoir ainsi que près de 280 échantillons de matières fécales provenant de patients manifestant des symptômes de diarrhée ont été analysés. Parmi les *Campylobacter* retrouvés, un sous-échantillonnage de 100 isolats d'origine porcine et l'ensemble des 24 isolats d'origine humaine ont été caractérisés phénotypiquement et génotypiquement par PFGE et par tests *in vitro* de toxicité.

Une grande diversité génétique a été observée parmi les deux populations de *Campylobacter*. En moyenne, 85% des génotypes étaient uniques. Une diversité génétique a également été observée parmi des isolats provenant d'un même animal. Par contre, aucun lien génétique entre les isolats d'origine humaine et porcine n'a pu être observé dans la présente étude. L'étude de la production de toxines a permis de démontrer que les isolats de *Campylobacter* possédaient un faible niveau de toxicité *in vitro*.

L'augmentation récente de la résistance aux agents antimicrobiens chez *Campylobacter* représente une autre source d'inquiétude pour la santé humaine. Les isolats provenant de la viande pourraient représenter un réservoir potentiel d'isolats

résistants aux agents antimicrobiens transmissibles à l'humain. De plus, l'utilisation massive d'agents antimicrobiens à la ferme pourrait entraîner la sélection d'isolats résistants et favoriser la persistance de ceux-ci.

Dans l'ensemble, la grande majorité des isolats de *Campylobacter* provenant du porc, de la volaille et de l'humain sont résistants à la tétracycline. Les résultats obtenus suggèrent que certains isolats résistants pourraient exprimer un autre déterminant que le gène *tetO* dans la résistance à la tétracycline. La résistance aux fluoroquinolones parmi les *Campylobacter*, problématique émergente en santé publique, a été observée lors de cette étude. Parmi les *C. jejuni* d'origine humaine, 8.7% étaient résistants au ciprofloxacine.

Une étude portant sur l'impact de l'utilisation d'agents antimicrobiens sur les profils de résistance observés a été réalisée parmi 27 élevages porcins en ciblant des fermes utilisant ou non des agents antimicrobiens de type tétracycline ou fluoroquinolone. L'analyse des isolats de *Campylobacter* provenant de ces fermes a démontré qu'il n'y avait aucune différence significative au niveau des taux de bactéries résistantes retrouvées dans les élevages avec ou sans agents antimicrobiens, que ce soit pour la tétracycline ou pour l'énrofloxacin.

Mots Clés : *Campylobacter*, porc, humain, volaille, PFGE, toxine, tétracycline, fluoroquinolone, élevages, résistance.

SUMMARY

Campylobacter is recognized as the main cause of bacterial diarrhea in humans worldwide. Most infections in humans are caused by *C. jejuni* and *C. coli* and remain sporadic. The transmission occurs most of the time by contaminated water, unpasteurized milk or contaminated food. Meat from poultry, pigs and cattle is considered among the most frequent vector of transmission for the disease. The high rate of *Campylobacter* recovered from these animals increases the risk of contamination of the carcasses following the slaughtering process. Improperly handled or cooked food may thus result in the development of *Campylobacter* infections. Little is known about the risk of contamination for humans associated with the consumption of meat products from swine. The analysis and the characterization of this risk were at the origin of the current study.

Intestinal contents from 850 healthy pigs, collected at the slaughterhouse, and 278 samples of feces from patients with diarrhea were analyzed. Among the *Campylobacter* recovered, a sub-set of 100 isolates from swine and all 24 isolates from humans were characterized genotypically and phenotypically by PFGE and *in vitro* toxins assays.

A high genetic diversity, near 80%, was observed among the two *Campylobacter* populations. Genetic diversity was also observed among isolates originating from the same animal. However, no genetic link between isolates from human and from swine was observed in this study. The phenotypic analysis of toxins production by *Campylobacter* demonstrated that isolates recovered in this study had weak cytotoxicity properties *in vitro*.

The recent increase in resistance to antimicrobial agents among *Campylobacter* represents another concern for human health. Some bacterial strains from meat could represent a potential reservoir of resistant isolates transmissible to humans. Also, the wide use of antimicrobial agents at the farm level could select for resistant isolates and promote the persistence of those strains.

In the current study, the great majority of *Campylobacter* isolates from swine, poultry and human were resistant to tetracycline. Also, our results suggest that some resistant isolates could express another genetic determinant than *tetO* for resistance to tetracycline. Resistance to fluoroquinolone in *Campylobacter*, an emerging problem in public health, was observed in this study. Among the *C. jejuni* from humans, 8.7% were resistant to ciprofloxacin.

An analysis on the impact of the use of antimicrobial agents was done among 27 swine herds, focusing on farms using or not antimicrobial agents of tetracycline or fluoroquinolone type. The analysis of *Campylobacter* isolates from those farms showed that there was no significant difference between rates of resistance in bacteria among herds with or without use of tetracycline or enrofloxacin.

Key words: *Campylobacter*, swine, human, chicken broiler, PFGE, toxin, tetracycline, fluoroquinolone, herds, resistance

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY	ii
SOMMAIRE.....	iii
SUMMARY	vi
TABLE DES MATIÈRES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX	xiv
LISTE DES FIGURES	xvi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xvii
DÉDICACE.....	xx
REMERCIEMENTS	xxi
1. INTRODUCTION.....	1
2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE	5
2.1. Historique	6
2.2. Caractéristiques de <i>Campylobacter</i>	8
2.2.1. Caractéristiques taxonomiques.....	8
2.2.2. Caractéristiques morphologiques	9
2.2.3. Caractéristiques physiologiques	10
2.2.4. Caractéristiques biochimiques.....	11
2.4.1. <i>Difficultés lors de l'identification par les méthodes</i> <i>biochimiques</i>	13
2.2.5. Caractéristiques immunologiques	13
2.2.5.1. <i>Développement d'un vaccin</i>	14
2.2.5.2. <i>Le syndrome Guillain-Barré</i>	14
2.2.6. Habitat naturel	15
2.3. Infections causées par <i>Campylobacter</i>	16
2.3.1. Aspects cliniques de l'infection.....	16
2.3.2. Pathogénèse des infections entériques par <i>Campylobacter</i>	17
2.3.2.1. <i>Chimiotactisme et mobilité</i>	18
2.3.2.2. <i>L'adhérence et les adhésines suggérées</i>	19
2.3.2.3. <i>L'invasion : les invasines et les mécanismes proposés</i> ...	20
2.3.2.4. <i>La production de toxines</i>	22

2.3.2.5. <i>L'acquisition du fer</i>	25
2.3.2.6. <i>Les LPS</i>	26
2.3.3. Modes de transmission des infections	27
2.4. Sous-typage de <i>Campylobacter</i>	27
2.4.1. Caractérisation phénotypique de <i>Campylobacter</i>	27
2.4.1.1. <i>Le sérotypage</i>	27
2.4.1.2. <i>Le typage phagique</i>	28
2.4.1.3. <i>Le biotypage</i>	28
2.4.2. Caractérisation génotypique de <i>Campylobacter</i>	29
2.4.2.1. <i>Le ribotypage</i>	29
2.4.2.2. <i>Le fla-RFLP</i>	30
2.4.2.3. <i>Le RAPD</i>	30
2.4.2.4. <i>Le MLST</i>	31
2.4.2.5. <i>L'AFLP</i>	31
2.4.2.6. <i>Le PFGE</i>	32
2.4.2.7. <i>L'instabilité génétique et le PFGE</i>	34
2.5. L'antibiorésistance chez <i>Campylobacter</i>	36
2.5.1. Profils de susceptibilité aux agents antimicrobiens.....	36
2.5.1.1. <i>Macrolides et clindamycine</i>	37
2.5.1.1.1. <u>Mode d'action et susceptibilité</u>	37
2.5.1.1.2. <u>Mécanisme de la résistance</u>	38
2.5.1.2. <i>Les β-lactames</i>	38
2.5.1.2.1. <u>Mode d'action et susceptibilité</u>	38
2.5.1.2.2. <u>Mécanisme de la résistance</u>	39
2.5.1.3. <i>Les aminoglycosides</i>	39
2.5.1.3.1. <u>Mode d'action et susceptibilité</u>	39
2.5.1.3.2. <u>Mécanisme de la résistance</u>	39
2.5.1.4. <i>Les tétracyclines</i>	40
2.5.1.4.1. <u>Mode d'action et susceptibilité</u>	40
2.5.1.4.2. <u>Mécanisme de la résistance</u>	40
2.5.1.5. <i>Les fluoroquinolones</i>	41
2.5.1.5.1. <u>Mode d'action et susceptibilité</u>	41
2.5.1.5.2. <u>Mécanisme de la résistance</u>	41
2.5.2. La multi-résistance	42

2.5.3. L'utilisation d'agents antimicrobiens et la résistance chez les animaux	43
2.6. Épidémiologie des infections	45
2.6.1 Généralités.....	45
2.6.2. Le genre <i>Campylobacter</i> chez l'espèce porcine	45
2.6.3. Le genre <i>Campylobacter</i> chez l'espèce aviaire	48
2.6.4. Le genre <i>Campylobacter</i> chez les autres espèces animales....	49
2.6.5. Potentiel zoonotique et impact en santé publique	50
2.6.6. La méthode de l'analyse du risque	50
2.6.7. Perspectives	51
3. MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS : ARTICLE 1	53
Characterization of <i>Campylobacter</i> isolates recovered from clinically healthy pigs and from sporadic cases of campylobacteriosis in humans. 2004. E. Guévremont, R. Higgins, S. Quessy. J Food Protect 67(2): 228-34.....	54
4. MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS : ARTICLE 2	77
Antimicrobial susceptibilities of thermophilic <i>Campylobacter</i> spp. from humans, swine, and poultry. E Guévremont. É. Nadeau, M. Sirois, S. Quessy	78
5. MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS : ARTICLE 3	97
Antimicrobial Agents Resistance Profiles of <i>Campylobacter</i> and <i>Escherichia coli</i> from swine herds with various therapeutic regimens. E. Guévremont, S. Quessy	98
6. DISCUSSION GÉNÉRALE.....	119
6.1. Incidence de <i>Campylobacter</i> chez le porc	121
6.2. Caractérisation des isolats de <i>Campylobacter</i> chez le porc	123
6.2.1. Génotypage des isolats	123
6.2.2. Diversité génétique des isolats	124
6.2.3. Facteurs associés à la virulence.....	125
6.3. Relation entre les isolats d'origine porcine et humaine	128
6.4. La résistance aux agents antimicrobiens chez les <i>Campylobacter</i> d'origine porcine, aviaire et humaine.....	130
6.4.1. Incidence de la résistance	131

6.4.2. Caractérisation des déterminants génétiques.....	134
6.5. Distribution des <i>Campylobacter</i> résistants à la tétracycline ou aux quinolones parmi les élevages	138
6.6. Prévention de la transmission des <i>Campylobacter</i> à l'humain	140
7. CONCLUSIONS	142
8. BIBLIOGRAPHIE.....	145

LISTE DES TABLEAUX

ARTICLE 1

Table 1 :

Number of *KpnI* PFGE profiles of *Campylobacter* recovered among different isolates from one animal sample 72

Table 2 :

Distribution of *KpnI* PFGE genetic profiles and toxicity levels of *Campylobacter* from swine at the abattoir 73

Table 3 :

Genetic and phenotypic characteristics of *Campylobacter* recovered from human cases of diarrhea 75

ARTICLE 2

Table 1:

Antimicrobial susceptibility of *C. coli* isolated from pigs, chicken broilers and humans..... 93

Table 2:

Antimicrobial susceptibility of *C. jejuni* isolated from chicken broilers and humans..... 94

Table 3:

Mutations in the *gyrA* QRDR region of *C. coli* isolates and MICs to ciprofloxacin and enrofloxacin..... 95

Table 4: Mutations in the <i>gyrA</i> QRDR region of <i>C. jejuni</i> isolates and MICs to ciprofloxacin and enrofloxacin	96
---	----

ARTICLE 3

Table 1. Number of pens where <i>C. coli</i> resistant to tetracycline were detected in herds using tetracyclines	113
--	-----

Table 2. Number of pens where <i>C. coli</i> resistant to tetracycline were detected in herds not using tetracyclines	114
--	-----

Table 3. Number of pens where <i>C. coli</i> resistant to enrofloxacin were detected in herds using enrofloxacin.....	115
--	-----

Table 4. Number of pens where <i>C. coli</i> resistant to enrofloxacin were detected in herds not using enrofloxacin	116
---	-----

Table 5. Number of pens where <i>E. coli</i> resistant to tetracycline were detected in herds using (+) or not (-) tetracyclines	117
---	-----

Table 6. Number of pens where <i>E. coli</i> resistant to enrofloxacin were detected in herds using (+) or not (-) enrofloxacin	118
--	-----

LISTE DES FIGURES**ARTICLE 1**

Figure 1 :

Representative portion of a dendrogram showing relatedness between swine (fpc) and human (H) *Campylobacter* isolates following digestion with *KpnI* enzyme. Levels of similarity were calculated with Dice coefficient, and the UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetical averages) was used for cluster analysis..... 76

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN:	Acide désoxyribonucléique
AFLP:	Amplified fragment length polymorphism
AMPc:	Adénosine monophosphate cyclique
ARNm:	Acide ribonucléique messenger
ARNr:	Acide ribonucléique ribosomal
ARNt :	Acide ribonucléique de transfert
ATCC:	American Type Culture Collection
C:	Cytosine
Ca ²⁺ :	Calcium
CDC:	Center for Disease Control
CDT:	Cytodistending toxin
CHO:	Chinese hamster ovary cells
CLDT:	Cytolethal distending toxin
CLRT:	Cytolethal rounding toxin
CMI:	Concentration minimale inhibitrice
CO ₂ :	Dioxyde de carbone
CSM:	Charcoal selective medium
CT:	Vibrio cholerae toxin
DNA :	Deoxyribonucleic acid
EDTA:	Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid
EF-Tu:	Facteur d'élargation ribosomal
EF-G:	Facteur d'élargation ribosomal
ELISA GM ₁ :	Enzyme-linked immunosorbent assay sur ganglioside GM ₁
EPP:	Entérite proliférative porcine
ERIC-PCR:	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR
Fla ou <i>fla</i> :	Protéine ou gène de la flagelline
Fn:	Fibronectine
G:	Guanine
GTP:	Guanosine triphosphate

HeLa:	Lignée cellulaire (adénocarcinome humain)
HEp-2:	Lignée cellulaire (contaminant d'HeLa)
H ₂ S:	Sulfide d'hydrogène
IL :	Interleukine
INT-407:	Lignée cellulaire (cellules intestinales humaines)
kDa:	kilo Dalton
<i>KpnI</i> :	Enzyme de restriction <i>KpnI</i>
LOS:	Lipooligosaccharide
LPS:	Lipopolysaccharide
LT:	<i>Escherichia coli</i> heat-labile toxin
Mb:	Mégabase
MIC:	Minimal inhibitory concentration
MLEE:	Multilocus enzyme electrophoresis
MLST:	Multilocus sequence typing
mol:	Unité de quantité de matière
MT:	Microtubule
N ₂ :	Azote gazeux
NCCLS:	National Committee for Clinical Laboratory Standards
OD:	Optical density
pb:	Paire de base
PCR:	Polymerase chain reaction
PFGE:	Pulsed-field gel electrophoresis
QRDR:	Quinolone resistance determining region
RAPD:	Random amplified polymorphic DNA
RFLP:	Restriction fragment length polymorphic
RILT:	Rabbit intestinal loop test
RT-PCR:	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
RTX:	Repeat in toxin
S:	Unité de Svedberg (coefficient de sédimentation)
SGB:	Syndrome Guillain-Barré

<i>Sma</i> I:	Enzyme de restriction <i>Sma</i> I
UPGMA:	Unweighted pair-group method with arithmetical averages
Vero:	Lignée cellulaire Vero (African green monkey kidney cell)
Y-1:	Lignée cellulaire (glande adrénale de souris)

*La terre pivote et autour d'elle
Des âmes flânent
Une âme espère et l'autre rêve
Des âmes planent*

Daniel Bélanger

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce projet n'aurait pu être possible sans l'apport considérable de plusieurs personnes. Je tiens aujourd'hui à leur transmettre mes plus sincères remerciements.

Tout d'abord, mes plus profonds remerciements vont au Dr Sylvain Quessy pour m'avoir acceptée sur parole dans son laboratoire et m'avoir permis d'évoluer dans un environnement basé sur la confiance, l'initiative et la débrouillardise. Son potentiel de motivation et son dynamisme ont largement contribué à la réalisation de ce projet.

Je remercie chaleureusement le Dr Robert Higgins pour m'avoir introduite aux cycles supérieurs, pour sa générosité, sa disponibilité et ses judicieux conseils.

Je remercie également le Dr Marc Sirois pour m'avoir permis de me familiariser avec la biologie moléculaire en me faisant une petite place dans son laboratoire et pour son optimisme sans borne.

Je tiens à remercier le Dre Judith Bossé, directrice du laboratoire d'hygiène vétérinaire et alimentaire de l'Agence Canadienne d'Inspection des Aliments, pour m'avoir permis de réaliser mes travaux dans son établissement.

Un merci spécial aux Dr John M. Fairbrother, Dr François Malouin et Dre Josée Harel pour leur contribution à titre d'évaluateurs lors de l'examen pré-doctoral.

Je ne saurais passer sous silence l'entraide, l'amitié et la complicité du Dr Éric Nadeau qui m'ont permis de mener à terme ce projet.

Je m'en voudrais d'oublier les gens qui ont contribué de près ou de loin à ce projet. Les gens qui m'ont enrichie par leurs conseils, leur appui, leur amitié et leur disponibilité. Louise Lessard, Marie-Claude Bérard, Julie Légaré, Nancy Rheault, Caroline Côté, Katline Guay, Jessicâ Pothier et Hélène Bergeron pour ne nommer que ceux-là. Un gros merci à Julie Brassard pour son amitié, tu resteras toujours un modèle pour moi!

Un merci bien spécial aux ami(e)s qui m'entourent et plus particulièrement à Louis-Philippe Ménard qui m'appuie jours après jours.

Finalement, je tiens à exprimer ma plus grande reconnaissance à mes parents et leurs conjoints respectifs qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de mes études. Ils ont cru en moi souvent bien plus que moi-même et m'ont aidée à réaliser mes rêves.

1. INTRODUCTION

Les données de Santé Canada indiquent qu'en 1999, le taux de toxi-infections d'origine bactérienne parmi la population canadienne était d'environ 65 cas sur 100000 habitants. Au Québec, ce taux était évalué à 62 cas par 100 000 habitants. Dans les deux cas, l'agent bactérien le plus fréquemment isolé était *Campylobacter*. Bien que la campylobactériose soit rarement fatale, la bactérie était impliquée dans 58% et 62% des cas de toxi-infection au Canada et au Québec respectivement. Suivent ensuite *Salmonella*, qui représentait en moyenne 28% des cas, et *Escherichia coli* vérotoxino-gène, qui représentait environ 8% des cas d'infections d'origine alimentaire à travers le pays. *Shigella* et *Listeria monocytogenes* complétaient la liste. Comme ces données font seulement état des cas déclarés, il est permis de croire que le nombre de campylobactérioses soit en réalité bien plus élevé. Bien que la transmission puisse se faire par contact direct entre individus infectés, elle se produit le plus souvent par l'entremise de l'eau contaminée, du lait non-pasteurisé ou d'aliments contaminés. Les viandes de volaille, de porc et de bœuf font partie des vecteurs de transmission les plus fréquemment rapportés dans la littérature. En effet, comme ces animaux de consommation sont pratiquement tous colonisés par *Campylobacter* au niveau intestinal, les carcasses peuvent être contaminées lors du processus de l'abattage. Une cuisson insuffisante ou une manipulation inadéquate de la viande contaminée pourrait donc entraîner le développement d'une toxi-infection d'origine alimentaire à *Campylobacter* chez l'humain. Dans l'ensemble, la plupart des cas demeurent de nature sporadique mais quelques épidémies sont rapportées occasionnellement.

Les études portant sur les bactéries appartenant au genre *Campylobacter* sont relativement récentes. En effet, c'est surtout à partir des années 1970 que des travaux sur cette bactérie fastidieuse ont fait leur apparition. D'abord observée par des vétérinaires au niveau de cas d'avortements chez les ovins, c'est le raffinement des méthodes d'isolement et, par la suite, l'isolement de *Campylobacter* dans des fèces provenant de patients diarrhéiques qui ont justifié l'intérêt pour cette bactérie. Aujourd'hui, même si cet isolement se fait de routine dans certains hôpitaux, la

pathogénie de *Campylobacter* demeure peu connue. Certains facteurs associés à la virulence, comme le flagelle, la production de toxines et l'invasion des cellules de l'hôte, ont été identifiés mais leur rôle dans le développement de la maladie reste obscur. Un autre problème qui rend difficile l'analyse des mécanismes de virulence de cette bactérie est l'absence de modèle animal. Par ailleurs, un paradoxe demeure : *Campylobacter* peut être isolé des fèces de plusieurs animaux mais ceux-ci démontrent rarement des signes cliniques de maladie. À l'opposé, la plupart des humains des pays industrialisés vont développer des signes cliniques suite à la colonisation intestinale par *Campylobacter*.

Afin d'évaluer si la consommation de viande de porc ou de volaille représente un risque pour la santé humaine, il est important de caractériser les isolats retrouvés chez les animaux en les comparant avec des isolats provenant de cas de campylobactériose humaine. Les méthodes génétiques permettent de relier des profils génétiques observés parmi les bactéries d'origine animale avec des profils provenant de bactéries d'origine humaine. Le pouvoir discriminant élevé de ces méthodes permet d'établir des sources possibles de contamination relatives à la transmission bactérienne. Par contre, lors de ces analyses, la plasticité génomique de *Campylobacter* doit être prise en considération puisque cette bactérie possède un génome dense avec des régions hyper-variables. Autre particularité, il est difficile d'étudier cette bactérie avec une approche moléculaire puisque la plupart des techniques de mutagénèse fonctionnent difficilement pour ce microorganisme.

Présentement, en plus des cas de campylobactériose chez l'humain, une autre problématique concernant *C. jejuni* fait surface. En fait, la bactérie serait associée au développement d'une atteinte neurologique de type auto-immunitaire appelée syndrome Guillain-Barré (SGB). Certains individus qui développent le SGB, caractérisé par une paralysie et une flaccidité des membres, auraient eu, peu de temps avant, un épisode de campylobactériose. Pour l'instant, parmi les différents types de *C. jejuni*, c'est le sérotype O:19 qui serait le plus fréquemment associé avec les cas

rapportés de SGB. Il ne faut pas oublier que d'autres microorganismes, comme *Mycoplasma* et certains virus, pourraient aussi être reliés au SGB. Plusieurs études sont en cours afin de confirmer si *C. jejuni* est relié au développement de ce syndrome.

Le manque de connaissance quant à la prévalence et la caractérisation de *Campylobacter* chez le porc fait en sorte que le risque pour l'humain, associé à la présence de cet agent pathogène chez le porc, reste méconnu. De plus, la présence à différents niveaux de résistance aux agents antimicrobiens chez les isolats d'origine porcine et aviaire pourrait représenter un réservoir potentiel de bactéries et de déterminants de résistance bactérienne pour l'humain en contact avec l'animal ou ses sous-produits. En effet, l'utilisation massive d'agents antimicrobiens en production animale pourrait entraîner la sélection de bactéries résistantes. Il est permis de supposer qu'en comparant les profils génétiques, certains facteurs de virulence et les gènes responsables de la résistance bactérienne aux agents antimicrobiens entre les souches d'origine humaine et animale, il sera possible d'évaluer si les animaux représentent une source potentielle de contamination bactérienne et/ou de gènes de résistance transmissibles à l'humain. Il est également permis de supposer que l'utilisation de certains agents antimicrobiens à la ferme pourrait influencer l'incidence des *Campylobacter* résistants à ces agents.

2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE

2.1. Historique

Les bactéries du genre *Campylobacter* ont été observées en médecine vétérinaire bien avant de l'être en médecine humaine. À l'origine retrouvées surtout chez les bovins et les ovins, les infections impliquant *Campylobacter* demeurent, près de trente ans après leur découverte, principalement associées à des pathologies animales. Aujourd'hui, *Campylobacter* est largement reconnu comme ayant une implication en médecine humaine à titre d'agent pathogène responsable de gastro-entérites et de diarrhées. Au Canada, il est en effet démontré que les diarrhées d'origine bactérienne provoquées par *Campylobacter* sont plus fréquentes que celles impliquant *Salmonella* ou *Escherichia coli* O157:H7 (2).

Une bactérie en forme de spirale est observée dans le mucus intestinal d'enfants décédés des suites du choléra infantile et décrite pour la première fois, en 1886, par Theodor Escherich. En considérant la morphologie décrite, l'association avec des cas d'entérites et le caractère fastidieux du microorganisme, cette bactérie pourrait bien être un isolat de *Campylobacter* et cette description serait la plus ancienne trace dans la littérature de ce microorganisme. Les campylobactéries sont isolées pour la première fois à Londres au début du XX^e siècle par deux vétérinaires, John McFadyean et Stewart Stockman. Elles sont alors surtout associées à des cas d'avortement chez les brebis qu'ils nommèrent avortements vibroniques. Mais la première guerre mondiale va empêcher la diffusion de ces données auprès des différents intervenants (22). En 1919, les Américains Smith et Taylor isolent, à partir d'avortons bovins, un microorganisme qui ressemble en tout point à celui isolé auparavant par McFadyean et Stockman. Le nom de *Vibrio fetus* est alors proposé à cause de la forme recourbée du bacille (22).

Dans les années 1940, ces « *Vibrio* » sont associés à d'autres pathologies animales comme la dysentérie chez les bovins et les porcs. Leur implication dans les

pathologies humaines, comme des épisodes aigus de diarrhée ou des avortements, commence à être démontrée (22).

En 1963, les Français Sebald et Véron démontrent, en analysant leurs pourcentages en acides nucléiques guanine et cytosine, que ces nouveaux microorganismes diffèrent des vibrios classiques comme *V. cholerae*. Le nom de *Campylobacter* est alors proposé pour ces microorganismes (22).

La grande percée aura lieu en 1972, alors que *Campylobacter jejuni/C. coli* est isolé par Butzler *et al*, en Belgique, parmi 5% des selles d'enfants affectés par la diarrhée (8). Suite aux travaux de Skirrow au Royaume-Uni en 1977, les espèces *jejuni* et *coli* de *Campylobacter* seront reconnues comme une cause fréquente de problèmes gastro-intestinaux d'origine bactérienne chez l'humain (89). L'amélioration des techniques d'isolement et le développement de milieux de culture bactérienne appropriés permettent d'isoler ces bactéries relativement fastidieuses parmi 65 à 85% des patients aux prises avec des épisodes de diarrhée (22). Certains laboratoires de diagnostic utilisent maintenant des méthodes moléculaires, telle que le PCR, pour détecter la présence de ces bactéries dans les matières fécales.

Des études subséquentes utilisant des techniques de génétique moléculaire ont permis d'identifier des différences considérables au sein des espèces appartenant au genre *Campylobacter*. Certaines espèces ont alors été transférées dans de nouveaux genres, tels *Helicobacter* et *Arcobacter*, à cause de différences génétiques (ARNr 16S) ou phénotypiques (température de croissance). À l'inverse, deux espèces de *Wolinella* et une de *Bacteroides* font maintenant partie du genre *Campylobacter*. Ces genres bactériens demeurent tout de même très apparentés au niveau de leurs caractéristiques morphologiques, métaboliques et biochimiques.

2.2. Caractéristiques de *Campylobacter*

2.2.1. Caractéristiques taxonomiques

La caractérisation du gène de l'ARNr 16S, déterminant de relation phylogénique entre les microorganismes, est à la base des réarrangements taxonomiques au sein des *Campylobacter*. Cette analyse a conduit à la création du genre *Helicobacter* et, par le fait même, à la reclassification de « *Campylobacter pylori* ». Les bases de la taxonomie chez *Campylobacter* ont été établies en 1991 par Vandamme *et al.* suite à une étude exhaustive basée sur l'hybridation de l'ADN avec l'ARNr (102). Il en découle alors que les trois principaux genres bactériens *Campylobacter*, *Helicobacter* et *Arcobacter* appartiennent à une lignée qui est appelée la superfamille ARNr VI ou la division ϵ des *Proteobacteria*. Cette superfamille comprend le groupe I d'homologie (*Campylobacter* et *Bacteroides ureolyticus*), le groupe II (*Arcobacter*) et le groupe III (*Helicobacter* et *Wolinella succinogenes*). Les caractéristiques de cette superfamille sont une coloration de Gram négative, une faible composition en bases G et C, l'absence de fermentation et d'oxydation des sucres et une atmosphère de croissance microaérophilique.

Comme les espèces appartenant aux genres *Campylobacter* et *Arcobacter* sont phylogéniquement apparentées au niveau de la température moyenne d'élution (température à laquelle 50% de l'hybride ADN-ARNr est dénaturé), elles ont été assignées à une famille distincte, celle des *Campylobacteraceae* (102). La température moyenne d'élution représente le paramètre le plus important pour tirer des conclusions taxonomiques. Chez *Arcobacter* et *Campylobacter*, cette température est d'environ 66°C alors que celle d'*Helicobacter* est d'environ 64°C. Cette différence de 2°C est significative et exclut un lien phylogénique du genre *Helicobacter* avec les genres *Campylobacter* et *Arcobacter*. D'ailleurs, cette différence peut être observée par la formation de deux groupes distincts par schématisation des liens phylogéniques sous forme de dendrogramme.

Le genre *Campylobacter* comprend 16 espèces et 6 sous-espèces. Les bactéries *Campylobacter jejuni* subsp *jejuni*, *C. jejuni* subsp *doylei*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter upsaliensis* et *Campylobacter helveticus* sont fréquemment isolées à partir d'épisodes de diarrhée chez l'humain et les animaux domestiques comme le chat et le chien. *Campylobacter hyolei*, isolé à partir de lésions d'entérite proliférative porcine, a été rapporté pendant quelques temps dans la littérature mais s'est avéré être une variante (pathovar) de *C. coli*. Les bactéries *Campylobacter concisus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter curvus*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter sputorum* et *Campylobacter hominis* ont comme caractéristiques qu'elles nécessitent de l'hydrogène pour croître et sont principalement retrouvées au niveau de la cavité orale chez l'humain. *Campylobacter mucosalis* est principalement retrouvé chez le porc. *Campylobacter fetus* subsp *fetus* et *C. fetus* subsp *veneralis* se retrouvent principalement chez le bovin et sont responsables de désordres reproductifs. *Campylobacter hyointestinalis* subsp *lawsonii* est isolé au niveau de l'estomac et *C. hyointestinalis* subsp *hyointestinalis* au niveau de l'intestin chez le porc. La dernière espèce de *Campylobacter*, *Campylobacter lanienae*, a été rapportée récemment parmi une population d'employés d'abattoir (44). Cette espèce exprime une forte homologie au niveau de l'ARNr 16S avec *C. hyotestinalis* subsp *lawsonii* ce qui implique que des hybridations ADN-ADN doivent être faites pour déterminer si ces espèces font partie du même taxon ou si elles sont distinctes.

2.2.2. Caractéristiques morphologiques

Les bactéries appartenant au genre *Campylobacter* sont des bâtonnets spiralés, incurvés ou en forme de S, d'une largeur variant de 0.2 à 0.9 μm et de 0.5 à 5 μm de longueur. Lorsque la culture bactérienne est vieille, les bactéries peuvent apparaître sous une forme plus sphérique ou coccoïdale. Ce changement de forme serait associé à la transition d'une forme viable cultivable vers une forme viable non-cultivable (35). Par contre, ce ne serait pas nécessairement toutes les cellules coccoïdes qui

deviendraient non-cultivables. Cette forme demeurerait tout de même infectieuse, d'où l'intérêt quant à son rôle dans la transmission des *Campylobacter*. Les bactéries du genre *Campylobacter* sont caractérisées à l'examen microscopique par une coloration de Gram négative et l'absence de spore. Récemment, suite au séquençage complet du génome de *C. jejuni*, il a été mis en évidence que la bactérie posséderait les déterminants génétiques pour produire une capsule (71). Pour la première fois, il a été démontré par microscopie électronique avec le colorant cationique bleu Alcian que *C. jejuni* produit une capsule polysaccharidique qui persiste même chez la forme coccoïdale et qui est absente chez les mutants *kpsM* (34). Autre caractéristique morphologique, ces bactéries sont mobiles. Elles possèdent un flagelle polaire non enveloppé à une seule (monotriche) ou aux deux extrémités (amphotriche) et se déplacent grâce à un mouvement en tire-bouchon. Selon le milieu de croissance employé et le contenu en humidité, l'apparence des colonies sur gélose peut varier. Généralement, des colonies grises ou légèrement colorées, plates, irrégulières et étalées sous forme de gouttelettes sont observées.

2.2.3. Caractéristiques physiologiques

Les bactéries appartenant au genre *Campylobacter* sont des microorganismes fastidieux à croissance lente. Ils ont un métabolisme respiratoire (les quinones impliquées sont les ménaquinones) et sont classés comme des organismes chémo-organotrophes, car ils utilisent une variété d'acides organiques, comme les acides aminés ou des intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques, à titre de source de carbone. Ils n'ont aucune activité de fermentation ou d'oxydation des sucres, ce qui restreint le choix des tests biochimiques qui assurent leur identification. La plupart des *Campylobacter* étant des microorganismes microaérophiles, ils nécessitent une atmosphère composée de 5% d'oxygène, 10% de CO₂ et 85% de N₂ pour une croissance optimale. Leur ratio en base d'ADN G et C varie entre 27 et 47 mol%.

Les effets de la température sur la croissance sont variables. La température optimale de croissance est de 30 à 37°C. Aucune espèce de *Campylobacter* ne croît à 15°C, mais elles croissent presque toutes à 42°C. En effet, seulement *C. fetus* et ses deux sous-espèces et *C. jejuni* subsp *doylei*, ne croissent pas à 42°C (102) alors que *C. curvus* et *C. rectus* ont une croissance variable à 42°C (69). Par contre, à 25°C, seulement *C. fetus* subsp *fetus* et *C. fetus* subsp *veneralis* démontrent une croissance alors, que cette capacité est variable chez *C. hyointestinalis* (7 à 33% des souches sont positives) (69). Selon Stanley *et al.*, *C. mucosalis* serait capable de croître à 25°C (92).

Ce qui différencie particulièrement *Arcobacter* de *Campylobacter* est la croissance à 15°C et l'aérotolérance. Par contre, un environnement microaérophile est nécessaire pour leur isolement primaire. *Arcobacter* ne croît pas à 42°C, sa température optimale étant de 37°C. En ce qui concerne l'hémolyse, certaines souches de *C. hyointestinalis* peuvent présenter une activité alpha-hémolytique en culture sur gélose au sang (69). *C. jejuni* n'est généralement pas considéré comme possédant une activité hémolytique, mais certains *Campylobacter* spp. ont été rapportés comme produisant une hémolysine qui pourrait être reliée à la virulence (53).

2.2.4. Caractéristiques biochimiques

Les isolats possédant une activité d'oxydase et ayant une apparence caractéristique à la coloration de Gram (petits bâtonnets courbés) peuvent être rapportés comme étant *Campylobacter* spp. La plupart des membres de ce genre ont une activité de catalase positive, à l'exception des espèces *C. sporutum*, *C. gracilis* et *C. rectus*, qui ont une activité variable et plus souvent négative, ainsi que *C. mucosalis*, *C. concisus*, *C. helveticus*, *C. upsaliensis*, et *C. curvus* qui sont catalase négative (7, 69). Par contre, tous les *Campylobacter* à l'exception de *C. gracilis* ont une activité d'oxydase positive.

Parmi les autres tests pertinents pour l'identification biochimique, il y a l'épreuve de la réduction des nitrates, qui est positive chez toutes les espèces, à l'exception de *C. jejuni* subsp *jejuni*, et l'épreuve de la réduction des nitrites qui est également fréquente, sauf pour *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. upsaliensis*, *C. lari* et *C. hyointestinalis*. En ce qui a trait à la croissance sur un milieu contenant de l'urée, il y a absence de croissance puisque le genre bactérien ne produit pas d'uréase, une caractéristique commune à tous les membres du genre. L'hydrolyse de l'hippurate est effectuée seulement par *C. jejuni* et ses deux sous-espèces. Ce dernier test devient alors un moyen rapide d'identification de cet agent en laboratoire clinique. Par contre, des souches de *C. jejuni* hippurate-négatives peuvent être rencontrées. Comme *C. jejuni* et *C. coli* ne diffèrent biochimiquement qu'au niveau de ce test, il peut être plus précis d'utiliser des méthodes moléculaires comme le PCR pour différencier ces espèces bactériennes. Le PCR peut se faire en ciblant le gène *hipO* pour identifier les *C. jejuni* mais ne permettra pas de détecter le *C. jejuni* hippurate-négative. Il existe d'autres cibles génétiques pour différencier les deux espèces comme le gène *ceuE*, le gène de la GTPase et des ARNr 16S et 23S en utilisant le PCR, le PCR-RFLP et/ou le RT-PCR. Les espèces pathogènes courantes telles *C. coli*, *C. fetus*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. jejuni* et *C. hyointestinalis* sont en général H₂S négatif. La production d'H₂S est un test souvent effectué pour déterminer le biotype de *C. jejuni* et *C. coli*. L'hydrolyse de l'acétate d'indoxyle fait également partie des tests biochimiques d'identification. Seulement *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. rectus* et *C. curvus* sont positifs pour cette épreuve (102).

Finalement, la susceptibilité à certains agents antimicrobiens, comme l'acide nalidixique et la céphalothine, est souvent mesurée chez les différentes espèces de *Campylobacter* (102). Par contre, l'utilisation de ces épreuves, surtout la susceptibilité à l'acide nalidixique, pour identifier des souches peut devenir problématique étant donné l'augmentation de la résistance aux agents antimicrobiens.

2.2.4.1. Difficultés lors de l'identification par les méthodes biochimiques.

Deux problèmes majeurs sont rencontrés lors de l'isolement de bactéries appartenant au genre *Campylobacter*. Il s'agit, dans un premier temps, du manque de standardisation des méthodes utilisées. Une variation dans les résultats d'identification obtenus pour une épreuve donnée pourrait être observée avec une même souche testée par deux laboratoires différents. Deuxièmement, la plupart des tableaux relatifs à l'identification bactérienne sont basés sur des critères subjectifs d'analyses reliés à l'interprétation des tests biochimiques. De plus, ils ne tiennent pas compte des variations ou des mutations qui peuvent survenir (67).

Il existe des trousse commerciales d'identification bactérienne (e.g. API® Campy) mais peu d'information sur la fiabilité et l'efficacité de ces galeries est disponible. Elles devraient être réservées pour la confirmation de l'identité des bactéries microaérophiles en laboratoire clinique.

2.2.5. Caractéristiques immunologiques

Suite à la colonisation par les bactéries au niveau des muqueuses, une réponse immunitaire chez l'hôte est initiée. Il se produit alors une augmentation du niveau d'anticorps pour les immunoglobulines G (IgG), IgA et IgM. Il devient alors possible de diagnostiquer une infection par *Campylobacter* au moyen de la sérologie. Le sérum du patient est analysé sur plaque ELISA pour détecter une réaction immunologique entre les anticorps du patient et les antigènes, provenant de plusieurs espèces de *Campylobacter*, recouvrant la plaque. Néanmoins, la pertinence de la sérologie dans le diagnostic d'un épisode de campylobactériose est limitée. Cependant, la sérologie peut être utile pour détecter la persistance d'anticorps dirigés contre *Campylobacter* dans l'analyse rétrospective de cas du syndrome Guillain-Barré, maladie de type auto-immune où certains sérotypes de *Campylobacter* seraient impliqués.

2.2.5.1. Développement d'un vaccin

L'élaboration d'un vaccin contre *Campylobacter* doit tenir compte de certaines considérations. Tout d'abord, comme les mécanismes de la pathogénie de *Campylobacter* sont peu connus, il est difficile de cibler des protéines immunogènes associées avec des souches virulentes. Ensuite, pour mesurer l'efficacité d'un vaccin, il doit être possible de le tester avec un modèle animal. Or, *Campylobacter* peut coloniser différents animaux mais ne cause pas l'infection chez ceux-ci, il n'existe donc pas pour le moment de modèle animal représentatif des différentes étapes de la pathogénie. De plus, la variété de sérotypes retrouvés chez *Campylobacter* peut également rendre difficile l'élaboration d'un vaccin. En ce qui a trait à la réponse immunitaire suite à l'infection par *Campylobacter*, peu de choses sont connues à ce sujet. Finalement, il faut s'assurer de la sécurité du vaccin dans la mesure où il n'y a aucun risque potentiel entre l'administration du vaccin et le développement éventuel du syndrome Guillain-Barré.

2.2.5.2. Le syndrome Guillain-Barré

Plusieurs études ont associé le développement du SGB à une infection antérieure par *C. jejuni*. Le SGB est un désordre de type auto-immunitaire du système nerveux périphérique caractérisé par une faiblesse symétrique des muscles et évoluant sur une période de plusieurs jours. Les personnes affectées éprouvent une faiblesse des membres et des muscles respiratoires ainsi qu'une perte des réflexes. La maladie est auto-limitante mais 15-20% des gens atteints demeurent avec des déficits neurologiques sérieux (58). L'infection préalable par différents agents tels que *C. jejuni*, *Mycoplasma pneumoniae*, le virus Epstein-Barr, le cytomégalovirus de même que l'administration de vaccins contre la rage seraient associés au développement de la maladie (56). À partir d'études sérologiques et de cultures bactériennes, il apparaît qu'environ 30-40% des patients atteints du SGB aient été infectés par *Campylobacter* 10-14 jours avant l'apparition des symptômes neurologiques. Certains sérotypes seraient

plus associés au développement du SGB, comme le sérotype O:19, le sérotype le plus souvent rapporté, mais il y a aussi le sérotype O:41 et une dizaine d'autres qui ont été isolés dans différents cas de SGB. Dans la population, l'incidence du sérotype O:19 lors d'infections de type gastro-intestinales varie entre 1 et 6% (57). Le risque de développer le SGB après une infection est actuellement assez faible. Il était estimé en 1998 à 1 sur 1058 cas de campylobactériose aux USA (57).

Les patients atteints du SGB développent des anticorps contre les gangliosides. Ces derniers sont des glycosphingolipides contenant de l'acide sialique qui peuvent être retrouvés dans les tissus nerveux périphériques. Ces anticorps induiraient des dommages aux axones et à la myéline du système nerveux périphérique (56). Puisque les LOS de *C. jejuni* contiennent également de l'acide sialique, les anticorps dirigés contre cette structure provoqueraient une réaction auto-immunitaire contre les gangliosides par mimétisme moléculaire. Il est important de noter que l'état du système immunitaire ou certaines prédispositions génétiques de l'hôte peuvent aussi influencer sur le développement de la maladie, certaines personnes ne réagissant pas aux épitopes de type ganglioside (57).

2.2.6. Habitat naturel

Campylobacter peut coloniser les organes reproducteurs, les tractus gastrique et intestinal, ainsi que la cavité orale de plusieurs espèces animales comme les bovins, les porcs, les moutons, les chèvres, les chats, les chiens, la volaille et les rongeurs, ainsi que l'humain. Ces bactéries font partie de la flore commensale des animaux. Par contre, la plupart des humains colonisés par *Campylobacter* vont manifester des signes cliniques tels que la diarrhée. *Campylobacter* peut également être isolé à partir de réservoirs inanimés. En effet, l'eau peut être contaminée par des fèces d'oiseaux sauvages ou par des déchets provenant d'usines de production ou de transformation d'animaux de consommation. Le sol peut également contenir des bactéries du genre

Campylobacter suite à une contamination par des fèces d'animaux, des boues usées ou d'égouts (22).

2.3. Infections causées par *Campylobacter*

2.3.1. Aspects cliniques de l'infection

Chez l'humain, les principaux symptômes d'une infection à *Campylobacter* sont la diarrhée, la fièvre et une douleur abdominale intense (90). Le développement de lésions aux tissus est directement associé aux facteurs de virulence bactériens : production de toxines, mobilité, adhésion et invasion. Le site privilégié par ces bactéries serait le jéjunum et l'iléon et dans certains cas, le côlon. Une fois ingérées, les bactéries doivent survivre aux conditions acides de l'estomac. Ainsi, la prise de médicaments qui réduisent l'acidité gastrique, comme l'omeprazole, faciliterait l'infection. Lors de l'infection, les cellules épithéliales de l'intestin deviennent aplaties. Il se forme un oedème de la *lamina propria*, une congestion et une diminution des cellules. Il y a ensuite une infiltration des cryptes par les leucocytes polymorphonucléaires et finalement, de nombreux abcès sur les cryptes (85). Une diarrhée serait observée pendant 3 à 4 jours et laisserait place à une douleur abdominale qui pourrait persister plusieurs jours. Le patient peut continuer à excréter du *Campylobacter* dans ses fèces pendant plusieurs semaines, pour une période moyenne de 37.6 jours, à moins d'un traitement aux antibiotiques (90).

De façon générale, la dose infectieuse de *C. jejuni* est faible. Lors d'infections expérimentales chez des volontaires humains, une dose aussi faible que 500 microorganismes a suffi pour provoquer l'infection (90). La période d'incubation est généralement établie entre 1 et 7 jours. L'intensité de l'infection va dépendre de la virulence de la souche, de la dose infectieuse et de la susceptibilité de la personne. La douleur abdominale associée à la campylobactériose est parfois si intense qu'elle peut mimer une appendicite aiguë. Des anticorps dirigés contre *Campylobacter* apparaissent 5 jours après le début de l'infection et atteignent un sommet entre 2 et 4

semaines (90). Cette immunité confère la protection contre les infections ultérieures puisque dans les pays en voie de développement, où la population est fréquemment exposé à la bactérie, le taux d'infection par *Campylobacter* diminue avec l'âge (90).

Certaines complications surviennent à l'occasion suite à l'infection par *Campylobacter*. Dans les cas graves, la bactérie peut causer une appendicite, une colite ou un mégacôlon toxique ainsi que des hémorragies intestinales et des abcès péirectaux comme complications de nature intestinale. Aussi, *Campylobacter*, peut quitter le tube digestif et rejoindre la circulation sanguine causant des bactériémies, des hépatites, des avortements, des infections rénales et urinaires ou des endocardites (90). Tel que mentionné précédemment, le syndrome Guillain-Barré serait associé avec une infection antérieure par certains sérotypes de *Campylobacter*.

2.3.2. Pathogénèse des infections entériques par *Campylobacter*

La virulence d'une souche bactérienne pourrait être décrite comme étant l'habileté de celle-ci à causer la maladie chez l'hôte, son potentiel pathogénique. Les facteurs de virulence quant à eux, seraient les mécanismes nécessaires à la bactérie pour provoquer une infection chez l'hôte et des changements pathologiques. Au niveau moléculaire, les gènes associés à la virulence peuvent être classés en trois groupes (106). Premièrement, les gènes associés à la survie et à la multiplication de la bactérie ainsi qu'à sa capacité à s'établir et survivre dans le milieu. Par exemple, les gènes encodant la superoxyde dismutase, enzyme potentiellement responsable de la survie intracellulaire chez *Campylobacter*. Le deuxième groupe comprend les vrais gènes de virulence dont les produits sont impliqués dans les interactions avec l'hôte et responsables de dommages. Les toxines produites par certaines souches bactériennes en sont un exemple. Ces gènes sont absents parmi les souches non pathogènes. Le troisième groupe comprend les gènes associés à la virulence comme par exemple les gènes de régulation. Le produit de ceux-ci est impliqué dans la régulation de

l'expression d'autres gènes de virulence. Par exemple, les facteurs sigma (σ), les régulateurs globaux comme Fur ou les régulateurs de variation de phase.

Les mécanismes moléculaires de la pathogénie chez *Campylobacter* ne sont pas complètement élucidés. Quelques facteurs peuvent expliquer cette situation. Par exemple, *Campylobacter* est un microorganisme dont l'intérêt comme agent pathogène humain est relativement récent. De plus, il n'existe pas de modèle animal représentatif pour étudier la pathogénie. Du point de vue des approches génétiques, il existe peu d'outils génétiques pour générer des mutants puisque la bactérie intègre difficilement les transposons et les vecteurs plasmidiques (40).

2.3.2.1. Chimiotactisme et mobilité

Pour établir une colonisation efficace, les déplacements de *Campylobacter* sont influencés par la présence ou l'absence de différentes molécules chimiques. Les bactéries possèdent des mécanismes leur permettant de détecter des gradients chimiques et de moduler leur mobilité vers ou contre ce gradient. Le chimiotactisme serait alors important puisque, lors d'essais, la colonisation intestinale de la souris par des mutants chimiotactiques serait inefficace (35). Parmi les molécules attractives, il y a la mucine, la L-sérine et le L-fucose alors que la plupart des acides biliaires ont quant à eux un effet repoussant.

Le flagelle est probablement le facteur de virulence le mieux caractérisé chez *Campylobacter* (35). Il est composé, comme chez les autres bactéries, de multimères de flagelline. Le locus génétique codant pour la flagelline contient deux gènes adjacents : *flaA* et *flaB*. Les deux gènes ont plus de 93% d'identité. Les gènes *flaA* et *flaB* sont transcrits de façon indépendante et sont régulés par différents types de promoteurs (35). L'expression du flagelle est un déterminant important de la virulence qui peut être soumis à la variation de phase (9) et antigénique (28). Pour coloniser et provoquer la maladie chez l'hôte, la souche de *Campylobacter* doit être

flagellée. La mobilité assurerait à la bactérie la résistance au péristaltisme, lui permettrait de traverser la couche de mucus recouvrant l'épithélium intestinal et permettrait un contact intime nécessaire à l'invasion des cellules épithéliales (105). Un flagelle fonctionnel serait aussi essentiel pour l'internalisation de *C. jejuni in vitro* (113).

2.3.2.2. L'adhérence et les adhésines suggérées

Une fois ingéré par l'humain, *Campylobacter* traverse le tube digestif, passant l'estomac, et colonise l'iléon et le côlon où il interfère avec les fonctions normales de l'intestin (31). L'habileté des bactéries pathogènes à se lier aux cellules non phagocytaires, comme les cellules épithéliales de l'intestin, est un important facteur de virulence. L'adhérence empêche les bactéries d'être évacuées par les forces mécaniques de l'hôte telles que le péristaltisme et la circulation des fluides. De plus, l'adhérence est un pré-requis pour pénétrer dans les cellules et échapper au système immunitaire. Chez *Campylobacter*, l'attachement aux cellules serait assuré par des adhésines comme les protéines de la membrane externe et des flagelles et les lipopolysaccharides (36). Un rôle pour les LPS comme adhésines a été proposé mais il n'y a pas encore d'évidence à ce sujet chez *Campylobacter*. Des protéines de *C. jejuni* sont rapportées comme ayant des propriétés de liaison aux cellules HEP-2. Parmi ces protéines, il y a PEB1 qui démontre une homologie avec une composante du système de transport ABC chez les bactéries à Gram négatif (74). L'adhérence aux cellules épithéliales est diminuée de 50 à 100 fois, mais pas totalement abolie, lorsque le gène *peb1* est muté, suggérant la présence d'autres adhésines chez *C. jejuni*. Une autre protéine de *C. jejuni*, CadF (Campylobacter adhesion to Fibronectine), serait capable de lier la fibronectine, un composé de la matrice extra-cellulaire (36). Cette activité liant la fibronectine est diminuée de 3 à 6 fois chez les mutants *cadF*. Il y a aussi une nouvelle lipoprotéine de surface, JlpA, qui joue un rôle dans l'adhérence de *C. jejuni* aux cellules épithéliales de l'hôte (33). Le gène *jlpA* est situé à proximité du gène *hipO* de *C. jejuni* et est unique à celui-ci. En plus d'agir comme adhésine, cette

protéine serait relâchée dans le milieu de culture mais le rôle de cette activité reste à établir. Comme la pathogénie de *Campylobacter* demeure peu comprise, le rôle exact de ces différents déterminants dans la pathogénie n'est pas clair (35).

2.3.2.3. L'invasion : les invasines et les mécanismes proposés

L'inflammation et la bactériémie observées suite à une infection par *Campylobacter* suggèrent fortement une invasion cellulaire par les bactéries. Comme ces signes cliniques ne se retrouvent pas de façon uniforme, l'habileté et le degré d'invasion seraient souche-dépendants pour *Campylobacter* (35). Cependant, les niveaux d'invasion détectés *in vitro* sont relativement faibles : moins de 1% des bactéries utilisées envahissent une monocouche de cellules (104). Il n'existe pas de consensus sur la manière dont *Campylobacter* envahit les cellules hôtes. Deux mécanismes sont toutefois suggérés. Tout d'abord, *C. jejuni* pourrait pénétrer les cellules par un processus dépendant des micro-filaments d'actine. L'autre alternative serait que *C. jejuni* pénètre la cellule via des « coated-pit-associated receptor » pour former un endosome qui interagirait avec les micro-tubules, un mécanisme d'invasion assez inusité chez les entéropathogènes (35). La protéine CadF, qui permet la liaison de *C. jejuni* à la Fn et rapportée précédemment, stimulerait également les événements de signalisation associés à l'invasion bactérienne dans la cellule hôte (54). Une fois adhérent à la surface des cellules épithéliales, *C. jejuni* sécrète des effecteurs nécessaires à l'invasion. Ces effecteurs entraînent la phosphorylation des protéines de l'hôte et provoquent le relâchement du Ca^{2+} intracellulaire. Une cascade de signalisation est alors amorcée, provoquant une rupture des filaments d'actine et une extension des microtubules de la cellule hôte pour former une protubérance qui va rejoindre la bactérie. Cette interaction va provoquer l'endocytose et la bactérie sera engloutie par invagination de la membrane. Une fois à l'intérieur, cette vacuole pourrait se déplacer en suivant les microtubules grâce à la force motrice des protéines de dynéine et rejoindre la surface basolatérale pour l'exocytose et de là, ré-infecter d'autres cellules. Les bactéries pourraient envahir les cellules M de la même manière.

Les cellules infectées sécrèteraient de l'interleukine 8 (IL-8), une cytokine impliquée dans la réponse inflammatoire aiguë. Par la suite, *C. jejuni* pourrait survivre dans les macrophages ou les monocytes plusieurs jours, ce qui aiderait sa dissémination. Ce modèle démontre l'invasion de type MT-dépendant mais il se peut que l'invasion de la paroi intestinale se fasse via d'autres mécanismes chez *C. jejuni* (38)

Afin d'envahir les cellules, les bactéries synthétisent de nouvelles protéines. Récemment, la production d'une protéine nommée CiaB (*Campylobacter* invasion antigen B) qui a 45% de similarité avec les ligand invasifs de *Salmonella* (SipB) et *Shigella* (IpaB) et la protéine de virulence YopB de *Yersinia* a été observé chez *Campylobacter* (31). Des analyses par immunofluorescence ont démontré que la protéine CiaB serait transloquée dans les cellules INT-407. Ceci laisse supposer que *C. jejuni* pourrait posséder un système de sécrétion de type III, fréquent chez les bactéries pathogènes (37). L'analyse complète du génome de *C. jejuni* ne rapporte aucune homologie génétique pour un système de sécrétion de type III autre que le système d'exportation de la flagelline. La protéine CiaB pourrait alors être sécrétée par l'appareil d'exportation de la flagelline (71). La mobilité suivie de la liaison aux cellules épithéliales par des adhésines primaires mènerait à l'invasion. Généralement, 0.5 à 5% de l'inoculum est internalisé dans les cellules hôtes et la capacité d'envahir les cellules est éventuellement affectée par les passages dans le temps des souches de *C. jejuni* (31).

Une fois dans une vacuole, *C. jejuni* peut survivre un certain temps. Le nombre de bactéries intracellulaires commencerait à diminuer 6 h après l'internalisation, ce qui correspond avec la fusion du phagosome avec le lysosome (13). La production d'une superoxide dismutase serait importante pour la survie intracellulaire de *C. jejuni* puisque des mutants *sodB* démontrent une diminution significative de la survie dans les cellules INT-407 (76).

2.3.2.4. La production de toxines

Il existe deux grandes classes d'exotoxines : les entérotoxines et les cytotoxines. Les entérotoxines sont sécrétées et peuvent se lier à un récepteur cellulaire, entrer dans la cellule et augmenter le niveau d'AMPc. Cette augmentation a pour effet de créer un déséquilibre des ions qui provoque une fuite des liquides et se traduit en une diarrhée. Bien que son implication dans la pathogénie soit controversée, l'entérotoxine de *Campylobacter* serait une protéine de 68 kDa, capable de lier les gangliosides, qui réagirait de façon croisée avec les antisérums contre la toxine cholérique (CT) et la toxine température-sensible d'*E. coli* (LT) et qui serait toxique pour les cellules CHO et Y-1 (104). En comparaison, la production d'entérotoxines serait plus fréquente chez *C. jejuni* que chez *C. coli* (104). Les cytotoxines, quant à elles, sont des protéines qui entraînent la destruction des cellules-cibles. Elles peuvent agir intra-cellulairement ou former des pores dans la cellule. Dans le premier cas, deux mécanismes de toxicité prédominent : le premier est basé sur l'inhibition de la synthèse protéique et le second, sur l'inhibition de la formation de filaments d'actine. Les conditions relatives à l'expression de ces toxines demeurent inconnues chez *Campylobacter* (35).

Étant donné que l'un des symptômes de la campylobactériose est la présence d'une diarrhée liquide, qui peut se transformer en diarrhée sanguinolente, il peut être supposé qu'une toxine du même type que la toxine cholérique soit produite par *Campylobacter* lors de l'infection. Différents types de toxine ont été rapportés dans la littérature comme ayant différents effets sur différentes lignées cellulaires. Ces variations au niveau de la méthodologie employée dans les études rendent la comparaison difficile entre les données de la littérature. Présentement, c'est principalement la cytotoxine « cytolethal distending toxin » (CDT) qui est au centre des analyses.

Il est rapporté que 40% des espèces de *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* et *C. fetus* produisent la toxine CDT et ce, sans lien avec le sérotype, le biotype ou le pays d'origine (79). Les effets cytopathiques de CDT sont une distension des cellules et une augmentation de la taille du noyau sans multinucléation, contrairement à ce qui est observé pour le facteur cytotoxique nécrosant. L'action de la toxine se manifeste après 48 heures et la mort cellulaire intervient 72 à 96 heures après le contact cellulaire. La toxine agit en bloquant les cellules en phase G₂ de façon irréversible. La phase G₂ correspond à la phase de croissance et de fin de préparation de la cellule en vue de la division mitotique. La toxine empêcherait l'activation de la kinase principale, CDC2, qui doit être activée pour permettre l'entrée en mitose. Le rôle de la toxine dans la pathogénie est encore indéterminé puisqu'il n'y a pas de modèle animal pour recréer l'infection. Des travaux de Withehouse *et al.* (112) sur les effets de la toxine sur les cellules Caco-2, une lignée cellulaire dérivée des cellules épithéliales humaines de colon, ont permis d'énoncer l'hypothèse qui suit. Une fois dans l'intestin, à proximité des cryptes, la toxine CDT bloquerait les cellules épithéliales en phase G₂ en les rendant incapables de se diviser et de se différencier. Il se produirait alors une érosion des villosités et une perturbation de la couche épithéliale normale ce qui conduirait à une perte de la fonction d'absorption.

La toxine est composée de trois sous-unités : CdtA, CdtB et CdtC qui sont codées par les gènes *cdtA*, *cdtB* et *cdtC*. Les gènes seraient présents chez toutes les souches de *C. jejuni* mais le taux de production de la toxine varierait selon les souches (79). Ce phénomène reste inexplicé mais l'étude des promoteurs et de la régulation de ces gènes pourrait apporter des explications. Les gènes *cdt* sont aussi présents chez *C. coli* mais le niveau d'expression est inférieur à celui observé chez *C. jejuni*. Les protéines CdtB ont 68% d'identité entre les deux espèces et leurs gènes sont situés à des endroits différents dans le génome. Lorsque appliqués seuls sur la surface des cellules, CdtA, CdtB et CdtC ne démontrent pas d'activité toxique mais, combinée, l'holotoxine démontre une pleine toxicité (40). CdtA et CdtC seraient impliqués dans la liaison et la transgression de la toxine à travers la membrane plasmidique de la

cellule hôte. CdtB quant à elle serait la sous-unité active dont l'activité serait similaire à la DnaseI (30). De plus, la toxine induirait des dommages à l'ADN puisque le système de réparation est activé parmi les cellules infectées. Des foyers contenant la protéine Rad 50 sont détectés par immunofluorescence. Cette protéine est impliquée dans les systèmes de réparation des brisures de l'ADN double brin comme la recombinaison homologue et le « non homologue end joining ».

Parmi les autres toxines rapportées dans la littérature, il y a la cytotoxine CHO/HeLa ou cytotoxine 70 kDa. L'effet produit par cette toxine rend les cellules arrondies à des titres de dilution variables selon les travaux mais généralement faibles (104). Cette toxine serait avant tout fortement associée à la membrane ce qui rend sa caractérisation difficile puisqu'il faut d'abord pouvoir l'isoler pour l'analyser.

Il y a aussi la toxine Vero active et la toxine de type-Shiga (Shiga-like) qui induisent également la mort cellulaire et rendent les cellules rondes. Les titres sont également faibles comme dans le cas de la toxine de 70 kDa et aucune homologie au niveau génétique avec des gènes de la toxine Shiga n'est rapportée jusqu'à maintenant (104).

Les hémolysines sont parmi les autres toxines rapportées dans la littérature. *C. jejuni* et *C. coli* ont une activité d'hémolyse soit de contact ou sécrétoire qui varie selon les études (104). Au niveau génétique, le génome de *C. jejuni* ne comporte aucun cadre de lecture ouvert ayant une homologie avec les gènes de la famille des hémolysines RTX (repeat in toxin), d'HlyA (alpha-hémolysine) ou autres hémolysines d'*E. coli*. Il n'est pas clair si l'activité apparentée à l'hémolyse serait la conséquence de l'activité d'une autre toxine. Par contre, chez *C. coli*, un gène (*pIdA*) codant pour une phospholipase A de la membrane externe a été identifié. Les phospholipases sont reconnues comme étant associées à la lyse des globules rouges par un grand nombre de bactéries pathogènes (26). La protéine PIdA de *C. coli* aurait une activité similaire à celle d'*E. coli*. Il y a aussi la toxine CLRT pour « cytolethal rounding toxin » et la CLDT/CLRT qui rendent les cellules rondes ou distendues et qui seraient peut-être,

en fait, la même toxine que les toxines Vero ou CHO/HeLa. Finalement, il y aurait la formation de porines par *Campylobacter* mais il y a peu d'information à ce sujet dans la littérature. Une étude propose la formation d'un pore (vacuole) causant la mort (104).

La production d'entérotoxine par *Campylobacter* est un sujet controversé dans la littérature scientifique. La possibilité qu'une entérotoxine soit produite par *Campylobacter* fait suite à l'analyse de surnageants de *C. jejuni*. En contact avec un modèle animal intestinal (RILT), le surnageant d'une suspension bactérienne de *C. jejuni* entraînerait la sécrétion de fluides à l'intérieur de l'intestin (104). L'augmentation de l'AMPc intracellulaire des cellules CHO en contact avec ces surnageants a également été observée. Par contre, des rapports contradictoires sont apparus à l'effet que des sonicats bactériens n'avaient aucun effet sur les cellules CHO et que la sécrétion des fluides était absente lorsque le modèle animal était le lapin au lieu du rat (104). De plus, il y a absence d'hybridation entre des sondes provenant de la toxine cholérique (CT) et le génome de *Campylobacter*. En utilisant différentes méthodes de détection comme les essais sur cellules CHO, des immunobuvardages ou des ELISA GM1 (gangliosides liés à la phase solide), différents groupes de recherche ont échoué dans la détection d'une entérotoxine. Des analyses génétiques et des tests avec la toxine purifiée sur des modèles animaux devront être faits pour certifier la production d'une entérotoxine par *Campylobacter*.

2.3.2.5. L'acquisition du fer

L'habileté d'une bactérie pathogène à acquérir le fer à l'intérieur de l'animal hôte est critique dans l'établissement de l'infection. *Campylobacter* ne semble pas produire de sidérophores mais est capable d'utiliser les sidérophores exogènes (35). La présence d'hémine, d'hémoglobine, d'hémine-hémopexine ou d'hémoglobine-haptoglobine dans l'environnement stimule la croissance de *C. jejuni* et de *C. coli* alors que la ferritine, lactoferrine et la transferrine ne stimulent pas la croissance (80).

Pour maintenir leur homéostasie par rapport au fer, plusieurs bactéries synthétisent un régulateur global, la protéine Fur, qui contrôle l'absorption par la cellule du fer présent dans le milieu. Les tissus de l'hôte sont pauvres en fer libre pour permettre la croissance bactérienne. Plusieurs bactéries pathogènes utilisent ce signal de restriction en fer pour coordonner l'expression de facteurs de virulence via la protéine Fur. Il s'agit principalement de gènes reliés à la production de toxines ou d'hémolysines ou de gènes responsables de l'acquisition du fer. Chez *Campylobacter*, le rôle de Fur dans la régulation de la pathogénèse reste à déterminer. Par contre, certains mutants au niveau du gène *fur* ont démontré une diminution de la colonisation chez le poulet (101). Certaines souches de *C. jejuni* ont été rapportées comme ayant une activité hémolytique. La production d'une hémolysine serait souche-dépendante et pourrait jouer un rôle important dans la pathogénie ainsi que dans l'acquisition du fer (80).

2.3.2.6. Les LPS

Comme plusieurs bactéries à Gram négatif, *Campylobacter* possède des LPS dont le lipide A démontre une activité endotoxique pouvant causer un choc septique une fois relâché dans l'organisme. *C. jejuni* peut produire un LPS ou un LOS ou les deux mais les mécanismes de régulation de la longueur de la chaîne ne sont pas clairement compris (105). Les LPS sont considérés comme des facteurs de virulence chez les bactéries à Gram négatif. Ils contribuent, entre autres, à la résistance au sérum et aux phagocytes et à la toxicité cellulaire. Pour *Campylobacter*, cette implication n'est pas encore démontrée (35). Par contre, une des particularités de *Campylobacter* est que le noyau oligosaccharidique du LPS peut contenir de l'acide N-acétylneuraminique (sialique), un constituant rare des LPS bactériens mais commun dans les gangliosides et glycoprotéines des vertébrés (105). Les gangliosides constituent 10% du contenu en lipide du système nerveux central et système nerveux périphérique. Plusieurs évidences indiquent que certains sérotypes (O:19 et O:41) de *C. jejuni* (aucun *C. coli* jusqu'à maintenant) entraîneraient une attaque auto-immune contre les tissus nerveux de l'hôte comme dans le cas du syndrome Guillain-Barré (57).

2.3.3. Modes de transmission des infections

Comme les infections impliquant *Campylobacter* représentent un problème majeur en santé publique, il est important de déterminer la voie de transmission de l'agent étiologique entre l'habitat naturel et l'hôte, afin de pouvoir mieux définir les modes de prévention ou de contrôle. La transmission humaine se fait le plus souvent par l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminée, par contact direct avec des animaux, ou leur carcasse également contaminée ou par un contact interpersonnel avec des personnes infectées. Chez les animaux, malgré qu'il y ait absence de signe clinique, la transmission bactérienne peut se faire lors de contacts mère-enfant, suite à une mauvaise régie d'élevage ou par un contact avec d'autres animaux porteurs. La plupart des infections sont de nature sporadique. Bien que moins fréquents, des cas d'épidémies sont rapportés dans la littérature. Bien souvent, ce sont des aliments contaminés ou mal cuits, comme la viande de volaille, qui sont les vecteurs de transmission bactérienne chez l'humain.

2.4. Sous-typage de *Campylobacter*

2.4.1. Caractérisation phénotypique de *Campylobacter*.

2.4.1.1. Le sérotypage

Il existe différents schémas de sérotypage selon les antigènes recherchés, dont les deux principaux ont été mis au point au Canada dans les années 1980. Pour le genre *Campylobacter*, Penner et Hennessy (75) ont développé une technique d'hémagglutination indirecte basée sur les antigènes thermostables (antigènes O), antigènes somatiques localisés dans la membrane externe de la bactérie. Le système permet le dénombrement de 18 sérotypes pour *C. coli* et 47 pour *C. jejuni* (93). La méthode utilise une hémagglutination passive. Le surnageant d'une suspension cellulaire bouillie sert à sensibiliser des érythrocytes, lesquels seront mélangés avec

un antisérum pour démontrer l'agglutination. Il apparaît maintenant que l'antigène thermostable utilisé dans le schéma de sérotypage de Penner serait en fait un polysaccharide capsulaire et non l'antigène somatique O (15). En effet, la comparaison de la composition des gènes impliqués dans la biosynthèse capsulaire s'avère conservée pour les souches de même sérotype alors qu'elle est plutôt divergente entre souches de sérotypes différents.

Un autre procédé de sérotypage, élaboré par Lior *et al.* (43), est basé sur les antigènes thermolabiles et réalisé par une technique d'agglutination sur lame à l'aide d'antisérums adsorbés. Ce procédé permet d'identifier 108 sérotypes parmi les *Campylobacter* thermotolérants (93). Un nombre légèrement plus élevé d'isolats sont typables par la méthode de Penner et Hennessy par rapport à celle de Lior *et al.*(20). Dans les deux schémas proposés, des réactions croisées avec d'autres antisérums, un faible pouvoir discriminatoire parmi les isolats ou encore la présence de souches non typables sont les principaux problèmes associés à ces techniques.

2.4.1.2. Le typage phagique

Le typage à l'aide de phages constitue un complément au sérotypage. Il existe 3 schémas utilisant différents bactériophages de provenances différentes. On rapporte un total de 76 types phagiques pour *Campylobacter* (63). Un type phagique correspond à 2 isolats ou plus, ne provenant pas de la même épidémie, réagissant à la même réaction phagique. Il y a moins de 3% des souches de *Campylobacter* qui sont non typables par sérotypage et typage phagique.

2.4.1.3 Le biotypage

Le biotypage n'est pas vraiment discriminatoire mais il est souvent utilisé comme complément avec d'autres méthodes. Le schéma de biotypage de Lior est basé sur

l'hydrolyse de l'hippurate, la production de DNase et l'hydrolyse rapide du H₂S. Cela permet de mettre en évidence 4 biotypes de *C. jejuni* et 2 biotypes de *C. coli*.

2.4.2. Caractérisation génotypique de *Campylobacter*.

Le génome des *Campylobacter* est passablement connu mais il n'est pas aussi documenté que celui d'*E. coli*. De plus, il est reconnu que les gènes de *Campylobacter* sont difficiles à cloner et à analyser (35). L'identification des gènes est aussi difficile car, les transposons d'origine bactérienne ou recombinants ne transposent pas chez *Campylobacter*. Par contre, *Campylobacter* est naturellement transformable et peut donc incorporer du matériel génétique provenant du milieu extérieur. Les données disponibles proviennent donc de l'analyse et du séquençage de l'ARNr 16S bactérien et s'appliquent surtout à la dimension taxonomique et épidémiologique dans l'étude de ces bactéries.

2.4.2.1. Le ribotypage

Le ribotypage est une méthode de caractérisation des souches relativement simple. Pour se faire, le matériel génétique bactérien est digéré avec une enzyme de restriction puis transféré sur une membrane. La membrane est incubée avec une sonde qui va s'hybrider aux gènes de l'ARNr. Comme les bactéries ont plusieurs copies des gènes codant pour l'ARNr, des profils différents seront observés. Il est suggéré d'utiliser 2 enzymes de restriction puisque des souches peuvent avoir le même profil avec une enzyme et être différente avec une autre. Le pouvoir discriminant de cette technique pour le typage de *Campylobacter* varie selon les études. Le nombre de souches analysées, de même que leur provenance (épidémie ou épisode sporadique) peuvent avoir une influence sur le pouvoir discriminant. Parmi des études portant sur un ensemble de 50 souches de *Campylobacter* provenant de la volaille et de 80 souches de *C. jejuni* d'origine variable, la technique du ribotypage se situe derrière le PFGE, l'AFLP et le *fla*-RFLP en terme de pouvoir discriminant (12, 65). Par contre,

lors d'études impliquant un plus petit nombre de souches, il a été observé que le ribotypage avait le même pouvoir discriminant que le PFGE et l'AFLP (27) et que le *fla*-RFLP (55).

2.4.2.2. Le *fla*-RFLP

La méthode de *fla*-RFLP est basée sur la variation au niveau des gènes *flaA* et *flaB*, gènes impliqués dans la production de la flagelline, le constituant majeur du flagelle. Les extrémités N- et C-terminales du gène sont conservées alors que la région flanquante est variable en taille et en acides aminés (63). Cette propriété permet de synthétiser des amorces conservées qui vont permettre l'amplification par PCR du gène de différentes souches. Le produit PCR pourra par la suite être digéré par une enzyme de restriction appropriée et les fragments obtenus seront séparés sur gel d'agarose. Différents profils selon la souche seront observés. Comme pour le ribotypage, l'utilisation de 2 enzymes dans deux réactions différentes est suggérée. Le pouvoir discriminant du typage du gène *fla* se situe juste derrière le PFGE et l'AFLP (12, 21, 65). Cette méthode est simple et rapide et la plupart des souches peuvent être génotypées. Par contre, l'interprétation des profils obtenus peut varier d'un laboratoire à l'autre. Le plus grand désavantage de cette technique est relié à l'instabilité génétique du gène *fla*. La fréquence des événements de recombinaison intra- et intergénomique fait en sorte que cette méthode ne peut pas être considérée comme une méthode de typage à long terme (63).

2.4.2.3. Le RAPD

La méthode du RAPD est basée sur l'utilisation d'amorces arbitraires qui se lient à l'ADN et qui amplifient, au hasard, différentes sections du génome par PCR. Il n'est pas nécessaire de connaître a priori la séquence nucléotidique pour utiliser cette méthode. C'est l'analyse des différents profils qui permet de comparer les souches. Le pouvoir de discrimination entre les isolats de cette technique est aussi sinon plus

élevé que le PFGE (63). Malgré le fait que cette méthode soit relativement simple et peu coûteuse, les problèmes au niveau de la reproductibilité rendent cette technique peu utilisée pour le typage de *Campylobacter*.

2.4.2.4. Le MLST

Cette méthode de génotypage est utile dans les cas de surveillance à long-terme de microorganismes ou dans une approche plus spatio-temporelle de l'épidémiologie (18). L'objectif est de distinguer un grand nombre de génotypes tout en considérant les variations génétiques qui s'accumulent relativement lentement. Le MLST est basé sur le principe du MLEE (multilocus enzyme electrophoresis) qui analyse la mobilité électrophorétique d'enzyme « housekeeping ». La méthode du MLST cible 7 loci qui seront amplifiés puis séquencés. Pour chaque gène, les différentes séquences sont assignées comme allèles et les allèles des 7 loci constituent un profil allélique qui définit la séquence-type de l'isolat. Une différence d'un nucléotide est suffisante pour former un nouvel allèle. Cette méthode est assez discriminante et il est rare que deux isolats non reliés aient le même profil allélique (18). Il existe un schéma de génotypage par la méthode MLST pour *C. jejuni*. Avec celui-ci, 155 séquence-types ont été observées parmi 194 isolats de différentes origines (14). Par la suite, les séquences de MLST peuvent être consignées sur Internet pour constituer une banque de données épidémiologiques.

2.4.2.5. L'AFLP

Cette méthode implique la digestion de l'ADN avec 2 enzymes de restriction, une qui reconnaît une séquence de 4 pb et l'autre de 6 pb. Ensuite, des adaptateurs double brin d'oligonucléotides spécifiques aux sites de restriction sont fixés aux fragments obtenus. Ces adaptateurs doivent pouvoir se lier aux sites de restriction, éliminer le site de restriction après la ligation, avec un acide nucléique différent par exemple, et créer une séquence gabarit pour l'amplification par PCR. L'amplification se fait alors

de façon hautement stringente avec des amorces spécifiques aux adaptateurs qui ont à leur extrémité 3' une extension d'un à trois nucléotides compris dans la portion inconnue du fragment de restriction. Les amorces sont marquées à l'aide d'un fluorophore et la détection des fragments se fait dans un séquenceur automatique (86). Avec *Campylobacter*, la technique d'AFLP semble avoir le même pouvoir discriminant que le PFGE selon le ou les enzymes utilisées dans le PFGE (12, 27). Malgré le coût élevé de l'équipement et la complexité de l'analyse des résultats, l'AFLP est une méthode rapide et facilement standardisable pour étudier l'épidémiologie moléculaire de *Campylobacter* (63).

2.4.2.6. Le PFGE

Avant le séquençage, la taille du génome de *Campylobacter* a été déterminée par une digestion de l'ADN bactérien par PFGE à l'aide d'endonucléases de restriction. Ainsi, la taille du génome de *C. jejuni* a pu être calculée comme étant de 1.726 mégabases (Mb), celle de *C. coli* est de 1.714 Mb, celle de *C. fetus* subsp. *fetus* est de 1,267 et celle de *C. laridis* est de 1.451 Mb. Le génome de *C. upsaliensis* est de 2.0 Mb, ce qui est considérablement plus gros (7). Les avantages à déterminer la taille d'un génome par PFGE sont que cette méthode représente une mesure directe de la longueur de l'ADN et qu'elle permet la détermination réelle de la taille du génome bactérien par l'utilisation de diverses endonucléases de restriction (10).

La méthode du PFGE a pour objectif de couper l'ADN en quelques fragments de grande taille et d'observer sur gel les profils obtenus pour différentes souches bactériennes. Pour ce faire, l'ADN est enrobée dans un petit bloc d'agarose et est lysé *in situ* pour prévenir la dégradation. Après des lavages, de fines tranches du bloc contenant l'ADN sont digérées par une enzyme des restriction de type « rare-cutting » pour obtenir peu de fragments (5-15 en moyenne) de tailles variables. Pour *Campylobacter*, les enzyme *Sma*I, *Sal*I et *Kpn*I sont les plus fréquemment utilisées (70). Il a été récemment rapporté que *Kpn*I serait l'enzyme de choix pour

l'épidémiologie moléculaire de *C. jejuni* et que cette enzyme avait un pouvoir discriminant plus grand que *Sma*I (52, 78). Les fragments d'ADN sont par la suite séparés par l'application de champs électriques pulsés provenant de différentes positions dans la cellule d'électrophorèse.

Cette méthode de typage s'est avérée la plus discriminante par rapport au sérotypage, au ribotypage, au biotypage, au typage par les profils d'acides gras (93, 94) et au *fla*-RFLP (12, 21, 65). L'avantage de cette technique est que la bactérie à l'étude présente les mêmes caractères génotypiques, peu importe les facteurs environnementaux. Ces derniers sont reconnus pour influencer la stabilité des propriétés biochimiques bactériennes. Par contre, la préparation des échantillons est fastidieuse et s'étend souvent sur 3-5 jours mais une méthode rapide d'une journée appliquée à *Campylobacter* est maintenant proposée (51).

L'interprétation des résultats peut toutefois représenter un problème pour la méthode de PFGE, du moins chez *Campylobacter*. En effet, il n'existe aucune standardisation au niveau de l'interprétation des résultats. Pour l'instant, la présence ou non de bandes, la position et l'intensité de celles-ci sont des données importantes dans l'analyse comparative (12). Étant donné la quantité et la diversité des informations provenant des profils génétiques, ces données doivent être traitées par ordinateur à l'aide de logiciels tels que GelCompar (Applied Maths. Texas, USA) ou ImageMaster (Amersham Biosciences. NJ, USA). Parmi les critères d'interprétation rapportés, l'établissement d'une valeur limite peut être déterminée en se basant sur la variation expérimentale entre différentes reproductions de la méthodologie avec les mêmes souches (12, 52). D'autres études vont baser leur interprétation par un examen visuel des profils (42). Pour certains, n'importe quelle différence entre les profils est suffisante pour les classer parmi deux groupes distincts (65) alors que certains vont considérer qu'une différence d'un ou quelques changements mineurs dans la position des bandes de deux profils est non significative (78). Des lignes directrices en matière d'interprétation ont été énoncées par Tenover *et al.* (98) pour l'analyse visuelle des

profils générés par le PFGE. Ces critères s'appliquent à de petits ensembles d'isolats de nature épidémique et dont le nombre est généralement inférieur ou égal à 30. Ces critères, tel que le nombre de bandes d'un profil, permettent de classer les profils selon quatre catégories de lien entre les isolats : indistinguables, intimement reliés, possiblement reliés et différents. Un profil est établi comme le profil épidémique de référence et les autres isolats y sont comparés. Le nombre de fragments qui diffèrent du profil-type va déterminer la relation entre les isolats.

2.4.2.7. L'instabilité génétique et le PFGE

L'instabilité génétique peut être définie comme étant un événement, ou une série d'événements, conduisant à un changement dans l'organisation génétique d'une souche bactérienne. Ceci exclut les mutations naturelles. Généralement, les événements pouvant conduire à l'instabilité génétique sont (i) les insertions ou délétions de fragments d'ADN via des éléments mobiles comme les bactériophages, les transposons ou les séquences d'insertion; (ii) la recombinaison programmée ou aléatoire de segments d'ADN; (iii) des régions à haut taux de mutation et/ou (iv) l'incorporation d'ADN étranger par transformation naturelle (107). Ces événements peuvent rendre difficile l'analyse des souches bactériennes. Par exemple, le séquençage complet du génome de *C. jejuni* a révélé que des régions hypervariables sont responsables de la biosynthèse des LOS, des polysaccharides extracellulaires et de la modification du flagelle (71).

La présence de séquences d'insertion, de transposons ou de prophages n'a pas été observée dans le génome complet de *C. jejuni* (71). Même si des séquences d'insertion et des transposons ont déjà été rapportés ailleurs, la fréquence de transposition est trop faible pour provoquer une instabilité génétique (107). Ces changements seraient détectables en utilisant les méthodes génétiques décrites précédemment dont le PFGE.

Les gènes sujets à la variation phase, comme ceux du flagelle, peuvent être recombinaisonnés de différentes façons dans le génome. Puisque les fragments sont souvent petits, ces événements ne seraient pas détectés par PFGE.

Le génome de *Campylobacter* s'avère être très plastique. En effet, lorsque des segments d'ADN, délimités par les mêmes gènes, sont comparés chez différentes souches, les gènes compris entre ces deux limites varient en nombre et en position d'une souche à l'autre (107). Le nombre de fois où ces réarrangements se produisent et de quelle façon ils sont régulés est pour l'instant méconnu. Par contre, ce type de réarrangements aléatoires peut être détecté par PFGE. Ainsi, dans le but de mesurer la stabilité génomique, des analyses par PFGE ont été faites sur six souches de *C. coli* après un maximum de 50 passages (68). Pour 2 de ces souches, les profils étaient différents après 20 passages. Il en a été déduit que seulement un réarrangement génomique à grande échelle a pu être responsable de cette modification puisqu'il était impossible pour la bactérie d'incorporer de l'ADN exogène. La taille totale du génome a également diminué pour certaines souches, suggérant la perte de plasmides au fil des passages.

C. jejuni et *C. coli* ont la particularité d'être naturellement compétents et peuvent ainsi intégrer de l'ADN exogène chromosomal ou plasmidique. Cette acquisition peut affecter les résultats de PFGE. La présence d'un plasmide nouveau ajoutera une bande au profil et même plus d'une si ce plasmide possède des sites de restriction. Ces bandes surnuméraires peuvent être identifiées en comparant leur intensité par rapport au reste du profil. Par contre, si l'ADN s'intègre au chromosome, il peut être plus difficile à détecter. Le meilleur indice est de mesurer la taille totale du génome de chaque souche et de retenir cette information lors de la comparaison des isolats.

Afin de surmonter le problème de l'instabilité génétique, il est suggéré d'utiliser une combinaison de méthodes génétiques si les moyens techniques et financiers le

permettent. Sinon, une méthode phénotypique constitue un complément acceptable à une méthode moléculaire de génotypage.

2.5. L'antibiorésistance chez *Campylobacter*

2.5.1. Profils de susceptibilité aux agents antimicrobiens

La sensibilité à différents agents antibactériens est un caractère discriminant fréquemment utilisé en laboratoire. Par contre, les différentes espèces bactériennes ne sont pas toutes sensibles aux mêmes agents. L'analyse de la susceptibilité aux antimicrobiens est utile surtout d'un point de vue épidémiologique et de surveillance. Avec *Salmonella* et *Yersinia*, *Campylobacter* fait partie du groupe des bactéries zoonotiques que surveillent différents programmes nationaux (4, 48). Les entérocoques de même qu'*E. coli* sont également inclus dans les programmes de surveillance à titre de bactéries indicatrices. Lors d'une infection par *Campylobacter*, les agents antimicrobiens appropriés pour le traitement sont les macrolides ou les fluoroquinolones. Par contre, des résistances à ces agents sont de plus en plus observées à plusieurs endroits dans le monde. Les programmes de surveillance permettent alors de cibler des régions à haut niveau de résistance pour faciliter le travail des cliniciens et le traitement efficace de la maladie. Par exemple, le programme DANMAP au Danemark est très élaboré et prend en considération la résistance bactérienne provenant des animaux de consommation, de la nourriture et des humains. Il s'intéresse aussi à la résistance d'agents utilisés comme traitements mais aussi comme facteurs de croissance ainsi qu'aux bactéries pathogènes, zoonotiques et indicatrices (4). Au Canada, nous possédons le système de surveillance PICRA: Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (3).

L'interprétation des résultats concernant la susceptibilité aux antimicrobiens est variable chez *Campylobacter* car il n'y a pas de standards de référence tant au niveau de la méthodologie à utiliser qu'au niveau des valeurs limites déterminant la

résistance à un agent donné. L'antibiogramme peut se faire soit par la méthode de diffusion ou par dilution en agar. La méthode des dilutions en agar est la méthode de référence pour l'instant. Elle consiste à mesurer la croissance des bactéries sur plusieurs géloses contenant chacune un agent antimicrobien à une concentration précise. La concentration à laquelle la croissance est absente indique la concentration minimale inhibitrice (CMI). D'autres méthodes peuvent être utilisées et s'avèrent comparable à la méthode en agar. Par exemple, le E-test (PDM Epsilometer [AB Biodisk, Solna, Sweden]), qui est une bandelette contenant un gradient de l'agent antimicrobien et qui est déposée sur une gélose contenant un tapis bactérien de la souche à tester, est fréquemment utilisé. La zone d'inhibition de croissance autour de la bandelette indique la CMI (5). Récemment, une méthode de microdilutions sur plaques Sensititre (Trek Diagnostic Systems. Ohio, USA) a été standardisée pour *Campylobacter* et se compare aux techniques précédentes (45). L'interprétation des résultats se fait selon les recommandations du National Committee for Clinical Laboratory Standards pour les bactéries à croissance aérobie.

2.5.1.1. Macrolides et clindamycine

2.5.1.1.1. Mode d'action et susceptibilité

La famille des macrolides, dont font partie les agents érythromycine, azithromycine et clarithromycine, sont des agents bactériostatiques efficaces contre les bactéries à Gram positif et quelques bactéries à Gram négatif. L'érythromycine est l'agent de choix pour traiter les infections à *C. jejuni*. C'est un inhibiteur de la synthèse protéique qui lie de façon réversible le ribosome causant ainsi la dissociation du peptidyl-ARNt. Généralement, les niveaux de résistance sont faibles et ne seraient pas associés avec la présence de plasmides mais seraient plutôt de nature chromosomale chez *C. jejuni*. La clindamycine est associée avec la famille des macrolides. Cette molécule est un agent bactéricide ou bactériostatique selon la dose et agit à large spectre. Elle lie la sous-unité 50S du ribosome et prévient l'élongation peptidique en

interférant avec la peptidyl-transférase. Les niveaux de résistance sont variables chez les *Campylobacter*.

2.5.1.1.2. Mécanisme de la résistance

Chez *Campylobacter*, la résistance à l'érythromycine est due à une altération du ribosome. Des déterminants comme ErmB, GrmC, GrmQ et GrmFS identifiés chez *C. rectus* codent pour des protéines qui méthylent une adénine au niveau de l'ARNr 23S prévenant ainsi la liaison de l'antimicrobien (99). Chez *C. coli* et *C. jejuni*, une mutation au site de liaison du ribosome ou au niveau des protéines mentionnées ci-haut serait responsable de la résistance (99). En général, les souches de *C. coli* sont plus souvent résistantes à l'érythromycine que *C. jejuni*.

2.5.1.2. Les β -lactames

2.5.1.2.1. Mode d'action et susceptibilité

La classe des β -lactames comprend les pénicillines, céphalosporines, carbapenèmes et les monobactames. Ces agents sont bactéricides pour la plupart des bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Les β -lactames agissent au niveau de la paroi cellulaire. Elles inhibent les enzymes, comme les transpeptidases (protéines liant la pénicilline), qui sont essentielles à la synthèse du peptidoglycan, un constituant majeur de la paroi. Les transpeptidases sont des protéines de la membrane cytoplasmique ayant leur activité enzymatique à l'extérieur de la cellule ou dans l'espace périplasmique chez les bactéries à Gram positif ou à Gram négatif, respectivement. La majorité des isolats de *C. jejuni* et *C. coli* sont résistants aux agents β -lactames tels que les pénicillines et céphalosporines. Quelques *C. jejuni* sont résistants à l'ampicilline (15-40%) ou à l'amoxicilline (10-14%) (99). *C. coli* serait plus susceptible aux β -lactames. La résistance serait chromosomale mais il se peut que des plasmides de résistance soient aussi impliqués. La prescription de β -lactames n'est pas recommandée pour le traitement médical des infections à *C. jejuni* à cause des taux de résistance.

2.5.1.2.2 Mécanisme de la résistance

Les souches de *Campylobacter* résistantes produisent des β -lactamases qui seraient impliquées dans la résistance à l'ampicilline, l'amoxicilline et à la ticarcilline. Les β -lactamases hydrolysent l'anneau β -lactame de ces agents antimicrobiens les rendant ainsi inactifs. Pour la pénicilline G, piperacilline et céphalosporine, les niveaux de susceptibilité à ces agents sont similaires parmi les souches de *Campylobacter* β -lactamase-positives et les β -lactamase-négatives (39). La résistance serait alors associée à l'habileté limitée à lier les protéines liant la pénicilline ainsi qu'à la perméabilité des bactéries.

2.5.1.3. Les aminoglycosides

2.5.1.3.1. Mode d'action et susceptibilité

Ces agents antimicrobiens sont généralement bactéricides. Ils se lient de façon irréversible à la sous-unité 30S du ribosome et rendent la translation impossible sur l'ARNm. Ils peuvent aussi interférer avec le site A et causer une mauvaise lecture du code génétique ce qui induit des erreurs de traduction lors de la synthèse protéique. La streptomycine, la kanamycine et la spectinomycine appartiennent à cette classe de molécules. La résistance est plus fréquente chez *C. coli* que *C. jejuni* et serait majoritairement de nature plasmidique.

2.5.1.3.2. Mécanisme de la résistance

La résistance se produit principalement par l'action d'enzymes qui vont modifier l'antimicrobien le rendant incapable d'interagir avec le ribosome. Trois principales classes d'enzymes sont retrouvées chez *Campylobacter* : les acétyltransférases, les aminoglycoside phosphotransférases et les aminoglycoside adényltransférases (99).

2.5.1.4. Les tétracyclines

2.5.1.4.1. Mode d'action et susceptibilité

Les tétracyclines sont des agents bactériostatiques à spectre large. Elles ont été largement utilisées étant donné leur large spectre d'activité, leur sécurité et leur faible coût. Les tétracyclines inhibent la synthèse protéique en liant la sous-unité 30S du ribosome et en empêchent l'ARNt chargé de lier le complexe formé de ARNm et du ribosome. La résistance est sans cesse grandissante passant de 19% entre 1985 et 1986 à 56% entre 1995 et 1997 au Canada (23). Chez *Campylobacter*, la résistance est souvent de nature plasmidique et le déterminant responsable est le gène *tetO*. Ce déterminant se retrouve aussi chez des bactéries à Gram positif comme *Enterococcus faecalis* et *Streptococcus* spp.

2.5.1.4.2. Mécanisme de la résistance

Chez *Campylobacter*, la résistance est médiée par la protéine TetO qui agit en protégeant le ribosome. Cette protéine est similaire aux facteurs d'élongation EF-Tu et EF-G. EF-Tu catalyse la liaison de l'ARNt chargé au site A alors que EF-G déplace l'ARNt du site A et P au site P et E (99). La résistance serait le résultat d'une inhibition de la liaison, par un changement de conformation du ribosome, de la tétracycline au site A par la protéine TetO. Ce changement réduit ainsi la susceptibilité du ribosome à l'action de la tétracycline sans altérer ou arrêter la synthèse protéique (11). En plus de la protection du ribosome, il existe d'autres mécanismes de résistance chez d'autres microorganismes comme l'expulsion de la tétracycline par un transporteur membranaire ou l'inactivation enzymatique de la tétracycline. Il y a 39 genres bactériens à Gram négatif et 23 genres bactériens à Gram positif pour lesquels il existe un mécanisme de résistance à la tétracycline (11).

2.5.1.5. Les fluoroquinolones

2.5.1.5.1. Mode d'action et susceptibilité

Les fluoroquinolones sont des agents antimicrobiens bactéricides pour la plupart des bactéries à Gram négatif et quelques unes à Gram positif. Ces agents agissent sur les enzymes gyrase et topoisomérase IV. La gyrase contrôle le niveau de surenroulement de l'ADN et diminue le stress topologique associé à la translocation du complexe de transcription et de réplication le long de l'ADN. La topoisomérase IV est une enzyme qui sépare les deux brins filles suite à la réplication de l'ADN bactérien. Ces 2 enzymes sont des tétramères constitués de deux sous-unités pour former une holoenzyme de type A_2B_2 : GyrA₂GyrB₂ pour la gyrase et ParC₂ParE₂ pour la topoisomérase IV. Les fluoroquinolones forment un complexe tertiaire très stable avec la gyrase et l'ADN ce qui conduit à une brisure de l'ADN. C'est le relâchement de brins d'ADN double brin, qui sont hautement toxiques pour la cellule, qui provoque la mort cellulaire (16).

Le ciprofloxacine est un antibiotique de choix pour traiter la campylobactériose. Malheureusement, l'incidence de la résistance aux fluoroquinolones augmente lentement et ce dans plusieurs pays du monde. La résistance est de nature chromosomale, provenant souvent d'une mutation ponctuelle. Il est rapporté que chez de 10 à 20% des patients traités avec des fluoroquinolones pour une entérite à *Campylobacter*, les bactéries vont démontrer une résistance à l'agent (59). Une autre problématique est la relation supposée entre l'utilisation de fluoroquinolones, plus spécialement l'enrofloxacine, en production animale et l'apparition récente de la résistance chez des souches de *Campylobacter* d'origine humaine.

2.5.1.5.2. Mécanisme de la résistance

Des mécanismes de pompes à efflux peuvent être responsables de la résistance aux fluoroquinolones chez *C. jejuni*. Les CMI seront alors élevées et les souches seront

résistantes à d'autres antimicrobiens de différentes classes. La résistance peut aussi être le résultat d'une mutation au niveau du gène *gyrA* de la gyrase ou *parC* de la topoisomérase IV. Au niveau du gène *gyrA*, c'est le changement d'un acide aminé en position 86, soit la substitution d'une thréonine pour une isoleucine, qui constitue la mutation la plus fréquente. Il y a aussi des mutations au niveau de l'asparagine en position 90 et de l'alanine en position 70 qui peuvent conduire à la résistance. Des souches ayant une double mutation au niveau de *gyrA* et de *parC* (arginine en position 139) ont été rapportées et démontraient un haut niveau de résistance (99).

2.5.2. La multi-résistance

La résistance à plusieurs agents antimicrobiens est jusqu'à maintenant relativement rare chez *C. jejuni*. Quelques cas provenant de patients immuno-supprimés ont été rapportés (99). Une étude belge rapporte que 7.6% des *C. jejuni* et 17% des *C. coli* de différentes provenances humaines et animales sont résistants à 4 agents ou plus (100). La multi-résistance est fréquemment associée à la surexpression de transporteurs membranaires qui reconnaissent et expulsent de la cellule un grand nombre de composés de différentes structures. Chez les bactéries à Gram négatif, c'est le transporteur appartenant à la famille de type «resistance-nodulation-cell division» (RND) qui est le plus souvent responsable de l'efflux des agents antimicrobiens de diverses classes. Parmi les molécules expulsées, en plus des agents antimicrobiens, il y a les colorants, les détergents comme les sels biliaires, les acides gras et les solvants organiques. Chez les bactéries à Gram négatif, la plupart des transporteurs de type «multi-drug» partagent une organisation commune à trois composantes : un transporteur localisé dans la membrane interne, un canal constitué de protéines de la membrane externe et une protéine périplasmique accessoire. Cet arrangement permet le passage direct du substrat vers le milieu externe. Ces trois composantes sont souvent codées par un opéron composé de trois gènes. Ce serait l'opéron *cmeABC*, qui code pour un système d'efflux de type énergie-dépendant, qui contribuerait à la multi-résistance chez *C. jejuni* (41). Ce système serait largement répandu parmi

plusieurs isolats de *C. jejuni* et serait constitutivement exprimé parmi les souches sauvages de *C. jejuni*.

2.5.3. L'utilisation d'agents antimicrobiens et la résistance chez les animaux

Il est reconnu que l'utilisation massive d'agents antimicrobiens parmi les animaux de consommation peut sélectionner des bactéries résistantes parmi les animaux et que celles-ci pourraient, par la suite, être transmises aux humains via la chaîne alimentaire. Le problème est que cette relation est difficile à mesurer puisque plusieurs paramètres peuvent intervenir au niveau de la chaîne de transmission et donc, démontrer la relation de cause à effet est difficile. Par contre, certaines données portent à croire que cette transmission est possible. Plusieurs études épidémiologiques, l'apparition de résistances parmi des bactéries d'origine animale avant l'apparition de ces mêmes résistances chez l'humain, la tendance à l'augmentation de la résistance chez *Salmonella*, *Campylobacter* et *E. coli* O157:H7 et des études suggérant que le personnel en contact avec des animaux de consommation est plus à risque d'acquérir des bactéries résistantes permettent d'envisager un lien entre l'usage d'antimicrobiens chez les animaux et la santé humaine (95).

Parmi les agents antimicrobiens qui sont utilisés pour le traitements de différentes infections chez la volaille, on retrouve l'érythromycine, les fluoroquinolones, la pénicilline, les tétracyclines et le tylosin entre autre. Le chlortétracycline, le tylosin, la pénicilline sont aussi utilisés comme facteurs de croissance. Chez le porc, la tiamuline, le tylosin, la chlortétracycline, l'amoxicilline sont utilisés comme agents pour traiter différentes infections et l'érythromycine, la pénicilline, la tiamuline, le tylosin et le chlortétracycline comme facteurs de croissance (49).

Présentement, chez *Campylobacter*, la plupart des études à ce sujet se concentrent principalement sur la résistance aux fluoroquinolones. Comme l'introduction de cet agent de même que l'apparition de résistances sont récentes et que cet agent est utilisé comme traitement pour la campylobactériose chez l'humain, il devient un agent de choix pour évaluer l'impact de son utilisation. Les quinolones ont été approuvées aux États-Unis pour usage en production aviaire en 1995. Les fluoroquinolones sont surtout utilisées en production aviaire et peuvent être administrées, au Québec entre autre, à des porcelets manifestant des problèmes de diarrhée.

Aux États-Unis, lors d'une étude basée sur l'analyse de 474 isolats de *Campylobacter* d'origine humaine pendant la période de 1982-1992, aucune résistance aux quinolones parmi les *Campylobacter* n'a été détectée. Une autre étude menée au Minnesota a démontré que la résistance était passée de 1.3% en 1992 à 10.2% en 1998 (32). La cause probable de cette augmentation pourrait être les voyages à l'étranger puisque 75% de patients avaient voyagé avant d'être malades. L'utilisation antérieure de quinolones représente aussi un facteur de risque pour la sélection de souches résistantes. Au Canada, la résistance au ciprofloxacine pour des souches de *C. jejuni* d'origine humaine était de 0% en 1985-86 puis est passée à 12.7% en 1995-97 (23). En Espagne, la résistance à l'acide nalidixique, quinolone de première génération, est passée de 1% en 1985-87 à 82% en 1995-98 chez *C. jejuni* d'origine humaine (84).

Pour certains, la résistance observée parmi des isolats d'origine humaine provient de l'utilisation en production aviaire des quinolones. Leurs arguments viennent du fait que la volaille est le réservoir alimentaire principal de *C. jejuni*, que l'introduction des quinolones en production animale précède l'apparition de résistances chez les isolats humains et que des souches résistantes ont été isolées à partir de produits de consommation provenant de la volaille (25). La plupart des pays européens ont maintenant banni l'usage de quinolones en production animale comme facteur de

croissance. Les prochaines années permettront d'analyser si cette action a eu un effet positif sur la diminution ou la stabilisation des niveaux de résistance aux quinolones.

2.6. Épidémiologie des infections.

2.6.1. Généralités

Il est important de caractériser les souches bactériennes provenant d'une épidémie ou de cas isolés afin d'obtenir des données épidémiologiques comme la source de l'agent infectieux, sa nature et sa route de transmission. La présence de certains microorganismes dans l'environnement est un facteur déterminant pour la propagation de maladies infectieuses chez l'humain. Tel que rapporté dans la littérature, les problèmes intestinaux causés par *C. jejuni* sont importants en médecine humaine. En effet, le nombre d'infections provoquées par les bactéries du genre *Campylobacter* surpasse celui des infections causées par le genre *Salmonella*. Les services américains de surveillance en santé publique ont évalué à un peu plus de 2 450 000 le nombre annuel de campylobactérioses. Une hospitalisation a été recensée parmi 10.2% des épisodes et 0.1% du nombre total de cas rapportés s'est avéré être fatal (50). Différentes complications comme des hémorragies intestinales, des infections extraintestinales et même des infections du système hépatobiliaire ont été rapportées (90). La dose infectieuse provoquant les symptômes entériques peut être aussi faible que 5-800 organismes (35). Dans les pays en voie de développement, où l'hygiène est souvent déficiente, le problème demeure entier. L'élaboration d'un schéma de propagation des infections pourra mener à un meilleur contrôle des pathologies impliquant *Campylobacter* et conduire à l'amélioration des moyens contrôlant la prolifération ou l'élimination de ces microorganismes.

2.6.2. Le genre *Campylobacter* chez l'espèce porcine

Selon On (67), les espèces de *Campylobacter* les plus fréquentes chez le porc sont au nombre de sept. Il y a majoritairement *C. coli*, puis *C. jejuni* subsp. *jejuni* qui

colonisent le porc au niveau de l'intestin, tout comme *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* et *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii*. Toujours au niveau de l'intestin, *C. hyoilei* (équivalent de *C. coli*), *C. mucosalis* et *C. sputorum* bv. *sputorum* colonisent la muqueuse de l'animal. *C. coli* se retrouve fréquemment (95% des espèces identifiées) chez le porc et des études de sérotypage ont permis d'établir que les sérotypes O:30 et O:46 étaient les plus communs (66).

Les porcs sont porteurs de *C. coli* et *C. jejuni*, ce qui fait d'eux une source potentielle d'infection pour les humains. *C. coli* se retrouve principalement chez des porcs cliniquement sains. Plusieurs études de prévalence ont été réalisées afin de vérifier le taux de colonisation des porcs par ces microorganismes. Dans une étude de Mafu *et al.* (46), *Campylobacter* a été isolé parmi 61.7% des spécimens de carcasses et de fèces porcines. De ceux-ci, 97% ont été identifiés comme étant du *C. coli* alors que 2% était du *C. jejuni* et 1% du *C. lari*. Parmi les échantillons provenant uniquement des fèces, *C. coli* a été isolé dans 99% de ceux-ci.

Une étude similaire, réalisée au Manitoba, Canada, par Finlay *et al.* (19) a démontré que des bactéries du genre *Campylobacter* étaient présentes parmi 26.3% des échantillons analysés de muscles et de fèces d'origine porcine. Dans 55% des cas, il était question de *C. coli*, le 45% restant était du *C. jejuni*. Une autre analyse de l'incidence de *Campylobacter* chez le porc rapporte un taux de contamination de 66% au niveau des fèces. Tous les isolats retrouvés sont alors identifiés comme étant *C. coli*. Il est également mentionné qu'une plus grande proportion des porcs ayant des diarrhées étaient porteurs de *C. coli* dans leurs fèces en comparaison avec les porcs sains (77% vs 47%). Il est suggéré que *C. coli* pourrait être responsable de problèmes entériques chez le porc (47).

Les porcs peuvent être affectés par l'entérite proliférative porcine (EPP), maladie entérique caractérisée par la prolifération des cellules épithéliales de la crypte intestinale et par la présence d'une bactérie, *Lawsonia intracellularis*, dans le

cytoplasme apical de ces cellules. Une étude a été réalisée afin de déterminer si la présence de *Campylobacter* dans l'intestin des porcs pouvait influencer le développement de l'EPP. Il a été observé que les espèces communes de *Campylobacter* isolées dans l'intestin (*C. coli*, *C. mucosalis* et *C. hyointestinalis*) se retrouvent également chez les porcs avec ou sans EPP. Ainsi, le diagnostic de l'EPP devrait se faire seulement à partir de spécimens histologiques et non par la culture des fèces (87).

Si un grand nombre de porcs sont colonisés par *Campylobacter*, sa transmission dans l'environnement devient alors un facteur à considérer dans l'étude de l'épidémiologie de cette infection. À leur naissance, les porcelets sont exempts de *Campylobacter* mais, après une semaine, 50% des animaux sont colonisés et 85% le sont après quatre semaines. Il est fortement suggéré que les porcelets seraient contaminés par leur mère mais, cette affirmation reste difficile à démontrer. Le sous-typage des souches et la recherche de similitudes sont à l'origine de cette supposition. Ainsi, les truies pourraient s'infecter entre elles et infecter leur portée ou celle des autres. Lorsqu'une truie est infectée, la meilleure façon d'éviter la contamination de ses petits serait de la tenir à l'écart de ceux-ci et des autres animaux (110). Cette solution n'est pas envisageable puisque jusqu'à 90% des truies provenant des maternités d'exploitations commerciales sont infectées par *Campylobacter*. Une approche qui ciblerait le haut de la pyramide de la production porcine en produisant des reproducteurs exempts de *Campylobacter* semble plus prometteuse.

L'abattage est une étape critique pour la contamination. Ce processus chez le porc semble avoir un plus grand potentiel de contamination lors de l'éviscération que chez les ruminants. Par contre, le processus de refroidissement après l'abattage tend à particulièrement diminuer la réplication des bactéries du genre *Campylobacter* sur les carcasses. Cette diminution serait due à l'assèchement provoqué par ventilation plutôt qu'à un refroidissement à sec, les *Campylobacter* étant sensibles à la sécheresse (22).

Certaines espèces de *Campylobacter* (*C. fetus* et ses deux sous-espèces et *C. jejuni*) sont reconnues comme pouvant provoquer des avortements chez certaines espèces animales comme les moutons, les bovins et même chez les humains. Malgré le fait que des souches de *C. coli* aient été isolées à partir d'avortons porcins, la bactérie ne serait pas responsable des avortements chez les truies. En effet, *C. coli* est un microorganisme commensal chez le porc et, jusqu'à maintenant, aucune implication lors d'avortements n'a été rapportée. La souche de *C. coli* isolée pourrait provenir de l'intestin maternel, suivi d'une transmission au placenta (111).

2.6.3. Le genre *Campylobacter* chez l'espèce aviaire

La plupart des espèces aviaires comme les poulets à griller, les poules pondeuses, les dindes et les canards sont colonisées au niveau de l'intestin par *Campylobacter*. On retrouve du *Campylobacter* également dans les produits de volaille prêts à la consommation. Dans la plupart des études, c'est principalement *C. jejuni* qui colonise la volaille suivi de *C. coli* et rarement d'autres espèces. Au Québec, dans une étude de Nadeau *et al.* (61), 40% des poulets entrant à l'abattoir étaient colonisés par *Campylobacter* dont 90.2% des isolats sont identifiés comme étant *C. jejuni*. Des résultats similaires ont été rapportés lors d'une étude danoise (6). Les poulets étaient colonisés à 40.9% dont 95.5% était du *C. jejuni*. Ce pourcentage de prévalence chez les animaux peut atteindre 90% tel que rapporté dans une étude réalisée au Royaume-Uni (64). Lors de cette étude, il a été observé qu'à partir de lots de volaille exempts de *Campylobacter* avant l'entrée à l'abattoir, les carcasses de ces mêmes animaux devenaient contaminées lors du processus d'abattage. En effet, il est reconnu que le processus d'abattage et d'éviscération représente un risque de contamination des carcasses.

L'épidémiologie de *C. jejuni* en production aviaire est peu connue. L'introduction des bactéries pourrait se faire par transmission horizontale. L'environnement entourant les bâtiments de production pourrait servir de source de *Campylobacter* et les

bactéries pénétreraient les bâtiments via les bottes ou les vêtements de employés. Différents vecteurs comme les rongeurs ou les insectes pourraient aussi introduire les bactéries. L'amélioration des mesures d'hygiène contribuerait à diminuer l'incidence de *Campylobacter*. Avec l'utilisation des méthodes de sérotypage et génotypage, il est de plus en plus question de transmission verticale possible pour expliquer la colonisation fréquente des poulets. Des taux de colonisation et des sérotypes retrouvés chez certains isolats de *C. jejuni* ont pu être reliés à des couvoirs fournissant les poussins (73). D'autres évidences supportent ce mode de transmission. Par exemple, *C. jejuni* a été isolé à partir des ovaires de poules pondeuses et, l'utilisation d'œufs de poules peut faire passer *C. jejuni* de la forme viable non-cultivable à une forme cultivable (77).

2.6.4. Le genre *Campylobacter* chez les autres espèces animales

De façon moins fréquente, des isolats de *Campylobacter* provenant d'autres espèces animales peuvent contaminer l'humain. Le bétail est souvent rapporté comme étant porteur de *Campylobacter*. Dans une étude faite à partir de 360 isolats provenant des fèces de bovins, 89% des isolats étaient du *C. jejuni*. Par contre, la charge bactérienne des bovins est inférieure à celle de la volaille (32). L'agneau est également porteur de *Campylobacter* au niveau intestinal dans une proportion de 91.7% mais la présence de *Campylobacter* au niveau de la viande à l'abattage est moindre (32). La contamination des eaux de surface par *Campylobacter* est reconnue, ce qui implique que les fruits de mer comme les palourdes et les huîtres peuvent être contaminées. C'est principalement *C. lari* qui est alors isolé, ce qui laisse supposer que la contamination pourrait provenir des goélands puisque ces oiseaux sont porteurs de *C. lari*.

2.6.5. Potentiel zoonotique et impact en santé publique

Certains animaux, sauvages ou domestiques, sont porteurs de bactéries qui peuvent s'avérer pathogènes lorsqu'elles sont transmises à l'humain. Cette caractéristique est observable parmi les souches de *Campylobacter*. En ce qui a trait à la transmission de bactéries appartenant au genre *Campylobacter* aux humains, il a été suggéré que les principales espèces animales associées à ce type de zoonose étaient les bovins, les moutons, les porcs, les chèvres, les chats, les chiens, les rongeurs et la volaille. Ces animaux peuvent être porteurs de bactéries. Les données concernant le potentiel zoonotique de ces microorganismes sont peu détaillées. Il est suggéré que l'humain pourrait se contaminer par la viande, mais la caractérisation et la comparaison des souches animales et humaines dans une perspective épidémiologique commencent à peine à être effectuées chez certains animaux. En établissant un portrait génétique des souches porcines et humaines, dans le cas qui nous intéresse, il sera possible d'évaluer le risque réel de transmission dans une région et une période de temps données.

Le caractère zoonotique des bactéries du genre *Campylobacter* est bien établi (22). Même si jusqu'ici, le potentiel zoonotique des bactéries appartenant au genre *Campylobacter* est bien accepté, les modes de transmission et l'implication réelle de ces agents restent à vérifier par des études de prévalence et la caractérisation des souches.

2.6.6. La méthode de l'analyse du risque

Dans une approche en santé publique, l'évaluation du risque est un processus qui permet d'estimer la probabilité de réalisation et la sévérité d'un danger basé sur des données scientifiques. Un danger peut être de nature chimique, biologique ou physique. Quatre grandes étapes composent l'évaluation du risque. Dans un premier temps, le danger doit être identifié. Ensuite il doit être caractérisé. Par exemple, des

méthodes phénotypiques ou génotypiques sont utilisées pour caractériser un danger biologique alors que des analyses de doses-létales pourraient être utilisées pour caractériser un danger de nature chimique. Des modèles mathématiques ou l'utilisation d'arbres d'événements pourront permettre ensuite de caractériser l'exposition. Finalement, les conséquences de l'exposition sont évaluées. Plus les conséquences sont graves, plus l'approche tolérance-zéro sera envisagée. Une fois le risque évalué, des mesures ou politiques gouvernementales serviront à la gestion du risque et, éventuellement, le risque sera communiqué à la population. Il est également important de considérer les différentes sources d'exposition. L'exposition à un danger peut être directe, c'est-à-dire sans vecteur, comme par exemple le contact avec des animaux porteurs de *Campylobacter* par des producteurs. L'exposition peut aussi être de nature indirecte et souvent peu contrôlable, par l'environnement bien souvent. Finalement, l'exposition peut se faire par l'entremise d'un vecteur, les aliments en sont un bon exemple.

2.6.7. Perspectives

L'implication de certains animaux de consommation dans la transmission des bactéries de type *Campylobacter* est peu documentée. Dans la volaille, des études ont mis en relation des souches animales avec des souches humaines dans une région donnée (61). Chez le porc, peu d'études ont été réalisées. De plus, il n'y a pas vraiment de données récentes rapportées quant à la prévalence de *Campylobacter* dans les élevages. Comme les méthodes d'isolement ont grandement évoluées, il s'avère intéressant d'établir la prévalence de ces organismes dans le but d'évaluer le risque pour la population humaine. De plus, le manque de connaissance quant à la prévalence et à la caractérisation des bactéries microaérophiles chez le porc, de même que la prévalence de déterminants associés à la résistance microbienne, fait en sorte que le risque pour l'humain associé à la présence de ces pathogènes chez le porc et la volaille reste méconnu. Le processus d'abattage peut mener à la propagation de ces microorganismes. Il est connu que l'animal est largement porteur mais il reste à

définir si ces souches sont responsables des problèmes entériques rencontrés dans une région donnée. En comparant les profils génétiques et la production de facteurs de virulence de souches porcines avec des souches diarrhéiques humaines, le risque pour l'humain face à la consommation ou la manipulation de viande porcine pourra être caractérisé et mieux compris. L'analyse des déterminants de la résistance viendra compléter l'analyse de risque de ces bactéries pour l'humain.

3. MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS
ARTICLE 1

Characterization of *Campylobacter* isolates recovered from clinically healthy pigs and from sporadic cases of campylobacteriosis in humans

E. Guévremont, R. Higgins, S. Quessy

Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000,
St-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada.

Journal of Food Protection. 2004. 67(2): 228-34

ABSTRACT

Campylobacter spp. was recovered from 77.6% (660/850) of swine caecal contents at the abattoir and from 8.6% (24/278) of specimens from sporadic cases of human diarrhea during the same period of time in the same geographical area. *Campylobacter coli* represented 95.7% of *Campylobacter* isolates recovered from pigs and 8.3% of those isolated from humans. Genetic profiles were determined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using *KpnI* enzyme to characterize the isolates in combination with phenotypic assays to detect production of cytotoxins, enterotoxins and hemolysins. Among a subset of isolates (n=10), up to 5 colonies from the same animal were characterized by PFGE. In 50% (5/10) of the isolates, more than one genetic profile was observed per pig. Among the 100 isolates from pigs selected for further analysis, 81 different genetic profiles were observed, while 20 different genetic profiles were found among the 24 isolates of human origin. Cytotoxicity on CHO cells was observed in 11% (11/98) of isolates from pigs and in 21% (5/24) of *Campylobacter* from humans. No enterotoxin production was detected in *Campylobacter* isolates in this study, but 71% (17/24) of human and 63% (61/97) of pig isolates showed an hemolytic activity. The study of genotypic and phenotypic profiles of swine and human isolates revealed no epidemiological relationship between isolates. The low genomic relatedness observed between groups of isolates and the weak toxicity level of swine isolates suggest that the hazard of contamination of humans by *Campylobacter* associated with swine production is low.

INTRODUCTION

Campylobacter is the most common bacterial genus associated with diarrhea in humans in many developed countries (6). *Campylobacter* infections in humans are due to *C. jejuni* in proportions ranging from 80 to 90%, while 5 to 10% of infection are associated with *C. coli* (19). It is widely assumed that campylobacteriosis is primarily a foodborne disease where most of the cases remain sporadic. However, it is difficult to identify the source of contamination for individual cases (6). In most case-control studies, campylobacteriosis has been associated with consumption of poultry products (10, 21). Transmission to humans occurs most commonly through meat products as the final result of fecal contamination during the slaughtering process (13). Nonetheless, pigs are frequently colonized by *Campylobacter* spp. and their contribution to human infections is currently not fully understood (31).

In order to assess the importance of swine in the transmission of microaerophilic bacteria such as *Campylobacter* spp., it is necessary to evaluate the prevalence of this bacterium in pigs and/or in the finished product. To establish a link between *Campylobacter* strains from a particular animal species and sporadic human cases of diarrhea, it is also necessary to further characterize the microorganisms involved. Among the available techniques, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is considered one of the most discriminatory technique for *Campylobacter* (22). Among the possible virulence factors identified in *Campylobacter*, several toxins have been described but their role in the disease remains unclear (30). Toxins have been grouped into two classes, enterotoxins and cytotoxins, based on their effects on cells. Enterotoxins cause an increase of the intracellular level of cyclic AMP (cAMP) while cytotoxins are associated with the destruction of targeted cells.

The objectives of this study were the determination of the prevalence of *Campylobacter* spp. in swine, and the evaluation of a possible linkage between pig and human isolates by genetically and phenotypically characterizing the isolates recovered from clinically healthy swine and from sporadic cases of diarrhea in

humans, and this, within a limited geographical area, and during a definite period of time.

MATERIALS AND METHODS

Collection of samples. A total of 850 pigs were randomly selected over a six months period between October 1998 and March 1999 in a slaughterhouse located nearby St-Hyacinthe, Québec, with a maximum of 50 pigs sampled on each visit. After the evisceration process and inspection, the caecum was incised with a disinfected scalpel and 1 g of caecal content was aseptically collected and placed in a sterile tube with 2 mL of phosphate-buffered saline. Samples were kept on ice for a maximum of 2 h before laboratory analysis. Retail products from this abattoir were distributed in local groceries and supermarkets. Specimens from humans originated from sporadic cases of diarrhea submitted to the hospital laboratory located in the same geographical region. All the diarrhea samples (n= 278) collected at this hospital during the sampling period of September 1998 to June 1999 were analysed.

Bacterial strains, isolation and identification of microaerophilic bacteria. *Campylobacter jejuni* (ATCC 33291), *C. coli* (CDC 8151) and *C. fetus* (ATCC 27374) were used as control strains. The caecal and fecal swabs were inoculated onto charcoal-based selective medium (CSM) (*Campylobacter* agar base, Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) with supplements (*Campylobacter* selective supplement SR167E, Oxoid) and incubated at 37°C in order to increase isolation rate (1) in anaerobic jars (Oxoid), under microaerophilic atmosphere containing approximately 5% O₂, 10% CO₂ and 85% N₂ (Campy gen™, Oxoid) for 48 h (12). Typical colonies were tested for growth at 25 and 42°C, Gram staining and motility using darkfield microscopy, oxidase and catalase reactions, hippurate hydrolysis, susceptibility to cephalothin and nalidixic acid, and indoxyl acetate hydrolysis (18). All isolates were frozen at -70°C in brucella broth with 15% glycerol until further characterization. A total of 100 randomly selected isolates from pigs and all the positive human isolates (n = 24) were analyzed by PFGE and tested for cytotoxicity,

enterotoxigenicity and hemolytic activity. In order to evaluate the genetic diversity per pig, a randomly selected subset of ceecal samples ($n = 50$) was used. Three to five colonies were identified as described above. Isolates from 20% (10/50) of the randomly selected animals were analyzed by PFGE.

Pulsed-Field Gel Electrophoresis typing. PFGE was performed as described previously with some modifications (7). A bacterial suspension of 2.2×10^8 at 405 nm was prepared in 2 mL of sodium chloride-EDTA buffer (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 7.5) from a fresh culture grown on Mueller-Hinton agar (Laboratoires Quelab Inc., Montréal, Canada) with 6% sheep blood. A 250 μ l portion of this suspension, previously heated at 56°C, was mixed with an equal volume of 2.0% wt/vol low-gelling-temperature agarose (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO), dispensed in a 1 mm plug mold (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) and allowed to solidify 10 min at 4°C. Plugs were placed in 2 mL of lysis buffer (6.0 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 1 M NaCl, 0.2% wt/vol sodium deoxycholate, 0.5% wt/vol *N*-lauryl sarcosine, pH 7.6) with 0.5 mg mL⁻¹ lysozyme (Sigma) overnight at 37°C (9). The plugs were transferred into another lysis buffer (1.0% wt/vol *N*-lauryl sarcosine, 0.5 M EDTA, pH 9.5) containing 0.5 mg mL⁻¹ of proteinase K (Sigma) and incubated at 56°C for 48 h. After three washings of 30 min at 4°C in Tris-EDTA buffer (10 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7.5), plugs were stored in 0.5 times Tris-borate-EDTA (45 mM liter⁻¹ Tris, 45 mM liter⁻¹ boric acid, 1.0 mM liter⁻¹ EDTA) at 4°C for further analysis. Before DNA digestion, a pre-migration was performed by submitting plugs to 60 V for 45 min in a pre-migration chamber (Mini-Sub Cell, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) filled with 0.5 times Tris-borate-EDTA (34). Each plug was placed in a sterile 5 mL plastic tube pierced with a heated needle on both ends and immersed for migration. Plugs were equilibrated in the enzyme buffer at 37°C 1 hour before digestion. Plugs were digested with 20 U of *KpnI* restriction endonuclease (GIBCO-BRL by Life Technologies Inc., Paisley, Scotland) for 18 hours at 37°C (23). Wells of a 1.2% wt/vol high-gelling-temperature agarose gel (Sigma) were loaded with slice of plugs for separation by the Gene Navigator apparatus (Amersham Biosciences, NJ, USA).

PFGE was performed at 200 V and 14°C with ramped pulse time of 5 s for 9 h, 20 s for 9 h and 5 s for 2 h for a total time of 20 h. A lambda DNA ladder (Bio-Rad Laboratories) was used as molecular size marker and a reference strain of *C. coli* (CDC 8151) was run on each gel. Gels were stained with ethidium bromide and photographed under ultraviolet light. Photographs were scanned and analyzed with ImageMaster® software (version 3.01; Amersham Biosciences). The Dice coefficient was used to calculate levels of similarity and the UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetical averages) was used for cluster analysis. Visual comparison based on the Tenover criteria (29) in combination with the computer-based analysis was applied. Variations in the number of bands as well as the size of the bands determined the number of genetic profiles. Indistinguishable profiles, or profiles distinguished by one or a few minor band shifts, were assigned to the same genetic profile (25).

Hemolysis assay. The detection of hemolytic activity was made as previously described (28) for microplate assay with round-bottomed microtiter plates (Sarstedt, Montréal, Canada). The activity was measured in terms of minimal hemolytic units (MHU) which was the highest dilution at which hemolysis was detected. The MHU of a sample had to be equal or higher than 2 to be considered positive. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) was used as positive control and phosphate-buffered saline (PBS) as negative control.

Enterotoxin production assay. The methodology described by Lindblom *et al.* (15) was used with minor modifications. Briefly, a loopful of bacteria, grown on tryptic soy agar (TSA) (Laboratoires Quelab Inc) plates with 5% bovine blood, was inoculated into 25 mL of brain heart infusion (BHI) broth (Becton Dickinson, Rutherford, NJ) with 0.1% IsoVitaléX (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD). Cultures were incubated at 42°C in a microaerophilic atmosphere for 24 h and were centrifuged at 5500 rpm for 20 min at 4°C. One mL of the supernatant was collected and centrifuged at 10 000 rpm 2 min 15 s. The supernatants were kept for

enterotoxin assay. Chinese hamster ovary cells (CHO-K1) obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, Md.) were used in this study. Briefly, a volume of 200 μl of a 1×10^5 CHO cells per mL suspension was distributed in 96-wells microtiter plates (Sarstedt) and allowed to adhere. Serial two-fold dilutions (100 μl) of each sample were added in duplicate to monolayers. As positive control, a strain of enterotoxigenic *Escherichia coli* was used (kindly provided by Dr. John M. Fairbrother, *E. coli* Laboratory, University of Montreal, QC, Canada) and BHI broth as negative control. After a 48 h incubation, observations were made by inverted microscopy. For one hundred cells, elongation of 50% or more of the cells in a well was considered as a positive response.

Cytotoxin assay. For the detection of cytotoxins, the technique described by Coote and Arain (2) was used with minor modifications. Preparation of samples was done by resuspending bacteria from a TSA plate with 5% bovine blood at a density of 2.0 at 650 nm of 2 mL of MEM (Minimum Essential Medium) with Earle's salt (GIBCO-BRL) containing 1.0% (vol/vol) of L-glutamine 2 mM and 0.15% (wt/vol) of polymyxin B (Sigma). Suspensions were placed at 37°C for 30 min and centrifuged at 3000 rpm for 20 min. Supernatants were collected and passed through a 0.45 μm filter (Millipore Systems, Bedford, MA). CHO cells were propagated as monolayers within F-25 plastic tissue culture flasks (GIBCO-BRL) with MEM + Earle's salt supplemented with 1.0% (vol/vol) L-glutamine 2 mM and 10.0% of fetal bovine serum (FBS) (GIBCO-BRL). Penicillin, streptomycin and gentamicin (100 U mL⁻¹, 100 mg mL⁻¹, and 10 mg mL⁻¹ respectively, GIBCO-BRL) were added to prevent bacterial contamination. For preparation of the 96-wells flat-bottomed microtiter plates (Sarstedt), serial two-fold dilutions (100 μl) of the supernatants in MEM supplemented with 3.0% FBS were distributed in triplicate. Portions (100 μl) of a CHO cellular suspension of 4×10^5 cells per mL in MEM with 3.0% of fetal bovine serum were added directly into each well. MEM with polymyxin B served as negative control. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)

dye reduction assay was performed after an incubation time of 48 h at 37°C in presence of 5.0% CO₂.

Measurement of cytotoxic activity. The MTT dye reduction assay was used to evaluate the cytotoxic activity by measuring the level of activity in the mitochondria of the living cells. The cytotoxicity was expressed as a percentage of cell death by using the equation : $1 - (\text{mean OD of test well} / \text{OD of negative control well}) \times 100$. To determine whether an isolate was considered cytotoxic or not by its percentage of cell death, a cut-off level of toxicity was established. Briefly, estimation of the intraplate variation of two-fold dilutions of the negative control over CHO cells was measured. Up to 12.5% of cells death was observed in the control and the cut-off level was established at 25.0%.

The significance of differences observed in phenotypic tests was analyzed by Fisher's exact two-tailed test where a *P* value of < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Prevalence of *Campylobacter* in clinically healthy pigs and in humans affected by diarrhea. A total of 660 out of 850 (77.6%) specimens of swine caecal content yielded *Campylobacter* spp. *C. coli* was the most prevalent specie isolated in swine (95.7%). A resistance to nalidixic acid was observed for 6.2% of *C. coli*. Two isolates were identified as *C. lari* while no *C. jejuni* was recovered. The other isolates were lost in the freezing process. A total of 24 (8.6%) *Campylobacter* isolates were obtained from the 278 cases of human diarrhea. Of them, 22 were identified as *C. jejuni* while the others as *C. coli*.

Genotypic and phenotypic characterization of *Campylobacter* of swine origin. PFGE was used first to determine if more than one genetically different isolate were present per animal. In randomly selected animals (n = 50), 3 to 5 typical colonies were selected and all of them were identified as *C. coli*. Further characterization by

PFGE with *KpnI* enzyme was performed over 20% of these isolates. The number of genetic profiles in each animal varied from a unique genetic profile among the 5 isolates from the same animal, to 4 different genetic profiles recovered in some animals (Table 1). For logistical reasons, one isolate per animal was used for the rest of the study. Over the 100 isolates from swine, selected among all the recovered isolates, 7 cannot be digested by *KpnI* enzyme and resulted as a smearing and a poor resolution of DNA. For the 93 typable isolates, the PFGE gave 81 different genetic profiles, arbitrarily named 1 to 81 (Table 2). They originated from 51 different farms. Within some farms, more than one different genetic profiles were recovered by day of sampling. Within a given farm, the genetic profiles also varied depending on the day of sampling.

In this study, isolates included in each of genotypes 1 to 10 were identified as identical or closely related profiles. In each genetic profile shared by more than one isolate, titers of cytotoxicity and titers were the same. For the hemolysis assay, a difference of one to three MHU between isolates was observed excepted for profiles 5 and 9, where titers were the same within the genetic profile. The remaining 71 other genetic profiles were unique.

Hemolytic activity was observed in 63% of swine isolates with a MHU ranging from 2 to 16. No enterotoxin production was detected. CHO cells showed no cytopathologic change, remaining slightly rounded while more than 50% of the positive control cells showed elongation. For 11% of *Campylobacter* isolated from swine, a cytotoxic effect over CHO cells was observed. The titers of cytotoxicity ranged from 4 to 8 with one isolate with a cytotoxicity titer of 32.

Genotypic and phenotypic characterization of *Campylobacter* of human origin. All 24 *Campylobacter* isolates of human origin were analyzed by PFGE. Twenty different genetic profiles were obtained (Table 3). No clinical information on the patient but the date of sampling was available. Isolates belonging to the genetic

profile 1 were genetically and phenotypically identical, being the most cytotoxic isolates. Genetic profiles 2 and 3 included isolates from different date of sampling and that gave different hemolysis results while cytotoxicity and enterotoxicity were negative. The remaining genetic profiles were unique.

In isolates from human sporadic cases of diarrhea, hemolytic activity was observed for 71% of the isolates with MHU ranging from 2 to 4. As for swine, no enterotoxin production was detected. The cytotoxic activity was present in 21% of human isolates with titers of 16 (40%) and 64 (60%).

Comparison between *Campylobacter* of porcine and human origin. Genetic profiles of swine isolates and human isolates were put together in a dendrogram to evaluate the presence of a genomic relatedness. Figure 1 constitutes a representative portion of this dendrogram. Two main distinct clusters were observed, one for humans and one for swine isolates with a coefficient of similarity around 60%.

DISCUSSION

Outbreaks of campylobacteriosis are relatively rare and most of the cases remain sporadic (11). While epidemiological relationships have been established between known risk factors and sporadic campylobacteriosis, the pork consumption as a source of infection for the disease in human has not yet been identified.

In this study, the prevalence of *Campylobacter* spp. in clinically healthy pigs brought to an abattoir was evaluated to 77.6%. *Campylobacter* is considered a normal inhabitant of the pig intestines. The isolation rate from animals at the slaughterhouse has shown variations according to the studies. Nielsen *et al.* (21) reported a prevalence of 46% in swine in Denmark while more than 85% of the fattening pigs were shown to carry *Campylobacter* in the Netherlands (32). The predominance of *C. coli* over other *Campylobacter* species has been reported previously (16, 27, 21). According to the prevalence of *Campylobacter* in swine, the slaughtering process,

especially the evisceration step, could be considered as a critical step in contamination of the meat. In fact, retail meat from pork has been reported to be contaminated with *Campylobacter* (35).

In this study, no enterotoxin production was observed among the studied *Campylobacter* isolates. Enterotoxin production by *Campylobacter* is still controversial. No enterotoxigenic *Campylobacter* were detected in clinical isolates from the United States by two research groups, while in Belgium, enterotoxicity was detected in 100% of isolates from clinical cases (30). In another study, conducted in Germany, no cytotoxic activity was found in isolates from clinical cases suggesting the presence of an enterotoxin (26). It has been suggested that enterotoxin production by *Campylobacter* play a role in the production of watery diarrhea but no homology at the DNA level between genes coding for those type of toxins has yet been demonstrated. The hemolytic and cytotoxic activity observed in this study were not significantly different between *Campylobacter* of swine and human origin ($P > 0.05$). For the cytotoxicity of *Campylobacter*, Guerrant *et al.* (8) have observed toxicity in 50% of their strains at titers higher than 4. Another study by McFarland and Niell (17) revealed almost 100% toxicity for 75 *Campylobacter* strains at high titers of dilution. As methods used by various authors to detect *Campylobacter* cytotoxins varied, there is a possibility that several different cytotoxins may be produced by different strains (14). The CHO cell system was shown to be one of the most suitable methods for toxins detection (26).

In order to better characterize bacteria, combination of a genotypic method with at least one phenotypic method generally provides a sufficiently high discriminatory power (31). The large number of genetic profiles recovered in this study is in agreement with the wide genetic diversity among *Campylobacter* spp. isolated from swine and humans observed by different authors (27, 5). In a recent study, Petersen and On (25) showed that PFGE with the restriction enzyme *KpnI* tended to be more

discriminatory than with *Sma*I. The use of *Kpn*I enzyme by these authors gave 28 different genetic profiles over a total of 30 *Campylobacter* isolates from poultry.

In this study, analysis of more than one *Campylobacter* isolate per animal showed that there was up to four different genetic profiles in some animals. It has been reported that up to five genetically different *Campylobacter* were isolated from single feces sample of fattening pigs (33). These observations and the recognized genetic diversity observed among *Campylobacter* isolates may explain in part the difficulty to establish epidemiological links between *Campylobacter* isolates. It has been suggested for *Campylobacter* that variation in the number of profiles may result from large-scale genomic recombination in genetically related *C. jejuni* or *C. coli* strains (4). It may also be the result of intra- and interspecies horizontal genetic exchange as *C. jejuni* and *C. coli* are known to be naturally competent (3). The recent publication of the genome sequence of *C. jejuni* also revealed the presence of hypervariable sequences for genes responsible of biosynthesis or modification of surface components (24).

Given the high genetic diversity among *Campylobacter* isolates, we designed the study to restrict the geographical area of sampling to increase chance to establish genetic links. In the present study we thus compared strains recovered from a very limited geographical area (50 km²). Nevertheless, it was not possible to establish a genetic link between swine and human isolates. Similar results were reported in other studies, using other typing methods (16, 21). On the other hand, using the same approach, shared PFGE-*Kpn*I genetic profiles were identified among isolates from poultry and sporadic cases of human campylobacteriosis (20).

Overall, the genetic diversity observed between groups of isolates and the weak toxicity level of swine isolates suggest that the hazard of contamination of humans by *Campylobacter* associated with swine production is low.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Marie-Claude Bérard and Éric Nadeau for the technical assistance. We also acknowledge the Laboratoire d'hygiène vétérinaire et alimentaire (Saint-Hyacinthe) for access to their facilities and Santé Canada for the financial support.

REFERENCES

1. Bolton, F. J., D. N. Hutchinson, and G. Parker. 1988. Reassessment of selective agars and filtration techniques for isolation of campylobacter species from feces. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7:155-160.
2. Coote, J. G., T. Arain. 1996. A rapid colourimetric assay for cytotoxin activity in *Campylobacter jejuni*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 13:65-70.
3. 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.
4. Duim, B., T. M. Wassenaar, A. Rigter, and J. Wagenaar. 1999. High-resolution genotyping of *Campylobacter* strains isolated from poultry and human with amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2369-2375.
5. Fitzgerald, C., K. Stanley, S. Andrew, and K. Jones. 2001. Use of pulsed-field gel electrophoresis and flagellin gene typing in identifying clonal groups of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in farm and clinical environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1429-1436.

6. Friedman, C. R., J. Neimann, H. C. Wegener, and R. V. Tauxe. 2000. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and others industrialized nations, p. 121-138. In I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed., ASM Press, Washington D.C.
7. Gibson, J. R., K. Sutherland, and R. J. Owen. 1994. Inhibition of DNase activity in PFGE analysis of DNA from *Campylobacter jejuni*. *Lett. Appl. Microbiol.* 19:357-358.
8. Guerrant, R. L., C. A. Wanke, R. A. Pennie, L. J. Barrett, A. A. M. Lima, and A. D. O'Brien. 1987. Production of a unique cytotoxin by *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immunol.* 55:2526-2530.
9. Harrington, C. S., F. M. Thomson-Carter and P. E. Carter. 1999. Molecular epidemiological investigation of an outbreak of *Campylobacter jejuni* identifies a dominant clonal line within Scottish serotype HS55 populations. *Epidemiol. Infect.* 122:367-375.
10. Harris, N. V., N. S. Weiss, and C. M. Nolan. 1986. The role of poultry and meats in the etiology of *Campylobacter jejuni/coli* enteritis. *Am. J. Public Health.* 76:407-411.
11. Hudson, J. A., C. Nicol, J. Wright, R. Whyte and S. K. Hasell. 1999. Seasonal variation of *Campylobacter* types from human cases, veterinary cases, raw chicken, milk and water. *J. Appl. Microbiol.* 87:115-124.
12. 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.* 23:456-459.

13. Ketley, J. M.. 1997. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiol.* 143:5-21.
14. Lee, A., S. C. Smith, and P. J. Coloe. 2000. Detection of a novel *Campylobacter* cytotoxin. *J. Appl. Microbiol.* 89:719-725.
15. Lindblom, G-B., B. Kaijser and E. Sjögren. 1989. Enterotoxin production and serogroups of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from patients with diarrhea and from healthy laying hens. *J. Clin. Microbiol.* 27:1272-1276.
16. Lucey, B., C. Feurer, P. Greer, P. Moloney, B. Cryan and S. Fanning. 2000. Antimicrobial resistance profiling and DNA Amplification fingerprinting (DAF) of thermophilic *Campylobacter* spp. in human, poultry and porcine samples from the Cork region of Ireland. *J. Appl. Microbiol.* 89:727-734.
17. McFarland, B. A., S. D. Neill. 1992. Profiles of toxin production by thermophilic *Campylobacter* of animal origin. *Vet. Microbiol.* 30:257-266.
18. Nachamkin, I. 1995. *Campylobacter* and *Arcobacter*, p. 483-491. In P. R. Murray, E. S. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed., ASM Press, Washington D.C.
19. Nachamkin, I., J. Engberg, and F. M. Aarestrup. 2000. Diagnosis and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* species, p. 45-66. In I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed., ASM Press, Washington D.C.
20. Nadeau, É., 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 Protect.* 65:73-78.

21. Nielsen, E. M., J. Engberg, and M. Madsen. 1997. Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Danish patients, poultry, cattle and swine. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 19:47-56.
22. Nielsen, E. M., J. Engberg, V. Fussing, L. Petersen, C-H Brogren, and S. L. W. On. 2000. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry, and cattle. *J. Clin. Microbiol.* 38:3800-3810.
23. On, S. L. W., E. M. Nielsen, J. Engberg, and M. Madsen. 1998. Validity of *Sma*I-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *Sa*II, *Kpn*I, and *Bam*HI polymorphisms : evidence of identical clones infecting humans, poultry, and cattle. *Epidemiol. Infect.* 120:231-237.
24. Parkhill, J., B. W. Wren, K. Mungall, J. M. Ketley, C. Churcher, D. Basham, T. Chillingworth, R. M. Davies, T. Feltwell, S. Holroyd, K. Jagels, A. V. Karlyshev, S. Moule, M. J. Pallen, C. W. Penn, M. A. Quail, M. A. Rajandream, K. M. Rutherford, A. H. van Vliet, S. Whitehead, and B. G. Barrell. 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature.* 403:665-8.
25. Petersen L., 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.
26. Schulze, F., I. Hänel, and E. Borrmann. 1998. Formation of cytotoxins by enteric *Campylobacter* in human and animals. *Zent. Bl. Bakteriologie.* 288:225-236.

27. 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.* 64:2346-2349.
28. Tay, S. T., S. Devi, S. D. Puthucheary, and I. M. Kautner. 1995. Detection of haemolytic activity of campylobacters by agarose haemolysis and microplate assay. *J. Med. Microbiol.* 42:175-180.
29. 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.* 33:2233-2239.
30. Wassenaar, T. M.. 1997. Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:466-476.
31. Wassenaar, T. M., S. L. On, and R. J. Meinersmann. 2000. Genotyping and the consequences of genetic instability p. 369-380. In I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed., ASM Press, Washington D.C.
32. Weijtens, M. J. B. M., P. G. H. Bijker, J. van der Plas, H. A. P. Urlings, and M. H. Biesheuvel. 1993. Prevalence of *Campylobacter* in pigs during fattening; an epidemiological study. *Vet. Q.* 15:138-143.
33. Weijtens, M. J. B. M., R. D. Reinders, H. A. P. Urlings and J. Van der Plas. 1999. *Campylobacter* infections in fattening pigs; excretion pattern and genetic diversity. *J. Appl. Microbiol.* 86:63-70.

34. 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.

35. Zhao C, B. Ge, J. De Villena, R. Sudler, E. Yeh, S. Zhao, D. G. White, D. Wagner, and J. Meng. 2001. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C., area. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5431-5436.

TABLE 1.

Number of *KpnI* PFGE genetic profiles of *Campylobacter* recovered among different isolates from one animal sample.

Sample	No of isolates	No of <i>KpnI</i> genetic profiles
589	5	1
673	5	2
683	5	4
698	4	2
789	3	1
858	5	1ab ^b
891	5	1
934	5	2
958	5	1
990	5	2

^a Isolates varying in the number of bands and/or in the size of one or more bands were assigned to different PFGE-*KpnI* profiles

^b ab: minor differences between genetic profiles

TABLE 2.

Distribution of *KpnI* PFGE genetic profiles and toxicity levels of *Campylobacter* from swine at the abattoir

Sample	Farm	Sampling date	PFGE profile	Titer		Sample	Farm	Sampling date	PFGE profile	Titer	
				Hemolysis	Cytotoxicity					Hemolysis	Cytotoxicity
156	9	98-10-22	11	4	0	615	11	99-01-25	49	2	0
157	9	98-10-22	12	0	32	627	23	99-01-25	50	4	0
158	9	98-10-22	13	4	8	628	13	99-01-25	51	2	0
160	46	98-10-22	14	4	0	630	1	99-01-25	52	0	4
165	ND ^a	98-10-22	U ^b	1	0	640	18	99-01-25	U	0	0
180	ND	98-10-22	U	16	4	659	32	99-02-01	53	2	0
188	13	98-10-26	15	2	0	672	25	99-02-01	54	0	0
194	6	98-10-26	16	8	0	680	1	99-02-01	3	2	0
195	6	98-10-26	17	8	0	690	1	99-02-01	3	0	0
202	13	98-10-26	18	0	8	700	13	99-02-01	55	2	0
229	25	98-11-02	19	2	0	702	6	99-02-08	56	8	0
231	25	98-11-02	20	4	0	703	6	99-02-08	57	1	0
242	7	98-11-02	21	0	4	715	11	99-02-08	58	1	0
246	37	98-11-02	22	4	4	738	42	99-02-08	59	8	0
252	1	98-11-16	1	4	0	744	25	99-02-08	60	ND	ND
254	1	98-11-16	1	8	0	756	39	99-02-16	61	1	0
265	1	98-11-16	23	4	0	757	39	99-02-16	62	4	0
298	4	98-11-16	24	1	0	758	39	99-02-16	63	0	0
299	4	98-11-16	25	4	0	768	22	99-02-16	64	4	0
301	16	98-11-24	26	2	0	780	18	99-02-16	65	2	0
313	35	98-11-24	2	1	8	783	5	99-02-16	U	2	0
327	35	98-11-24	2	2	8	788	5	99-02-16	66	8	0
340	3	98-11-24	27	4	0	789	5	99-02-16	67	8	0
348	50	98-11-30	28	0	0	797	49	99-02-16	68	4	0
349	12	98-11-30	29	4	0	804	37	99-02-22	4	0	0
354	50	98-11-30	U	4	0	822	41	99-02-22	4	1	0
374	10	98-11-30	7	0	0	827	41	99-02-22	4	2	0
378	11	98-12-07	30	0	4	833	29	99-02-22	69	2	0
388	40	98-12-07	31	4	8	835	29	99-02-22	70	0	0
404	8	98-12-07	7	4	0	839	43	99-02-22	9	2	0
408	48	98-12-14	32	0	0	844	43	99-02-22	9	2	0
410	14	98-12-14	10	0	0	848	18	99-02-22	71	4	0
421	38	98-12-14	33	0	0	851	45	99-03-01	U	2	0
430	6	98-12-14	8	0	0	877	51	99-03-01	72	2	0
436	24	98-12-14	34	0	0	878	20	99-03-01	73	2	0
440	27	98-12-14	35	0	0	884	17	99-03-01	74	2	0
451	25	98-12-14	36	1	0	904	26	99-03-08	75	2	0
452	25	98-12-14	37	1	0	908	13	99-03-08	5	4	0
457	47	99-01-08	38	ND	ND	910	13	99-03-08	5	4	0
464	28	99-01-08	39	2	0	940	30	99-03-08	76	2	0
470	47	99-01-08	40	2	0	944	34	99-03-08	3	2	0
516	36	99-01-11	10	0	0	948	34	99-03-08	8	2	0
523	7	99-01-11	41	2	0	961	21	99-03-23	6	1	0
563	31	99-01-19	42	ND	0	967	21	99-03-23	6	2	0

570	44	99-01-19	43	1	0	971	33	99-03-23	77	1	0
586	31	99-01-19	44	2	0	979	33	99-03-23	78	16	0
590	2	99-01-19	45	0	0	988	19	99-03-23	79	4	0
594	2	99-01-19	46	0	0	989	19	99-03-23	80	0	0
599	2	99-01-19	47	2	0	991	16	99-03-23	U	1	0
609	28	99-01-25	48	4	0	997	15	99-03-23	81	4	0

^a Not determined

^b Untypeable

TABLE 3.

Genetic and phenotypic characteristics of *Campylobacter* recovered from human cases of diarrhea.

Sample	PFGE profile	Titer		
		Hemolysis	Cytotoxicity	Enterotoxigenicity
1	4	0	64	0
8	5	0	0	0
23	6	4	0	0
31	7	2	0	0
39	8	2	0	0
41	9	0	16	0
63	10	2	0	0
65	11	2	0	0
67	2	2	0	0
70	3	2	0	0
87	12	2	0	0
89	3	0	0	0
142	1	4	64	0
144	1	4	64	0
161	2	4	0	0
176	13	0	16	0
177	14	0	0	0
196	15	2	0	0
216	16	2	0	0
277	17	1	0	0
279	3	4	0	0
287	18	4	0	0
290	19	2	0	0
292	20	2	0	0

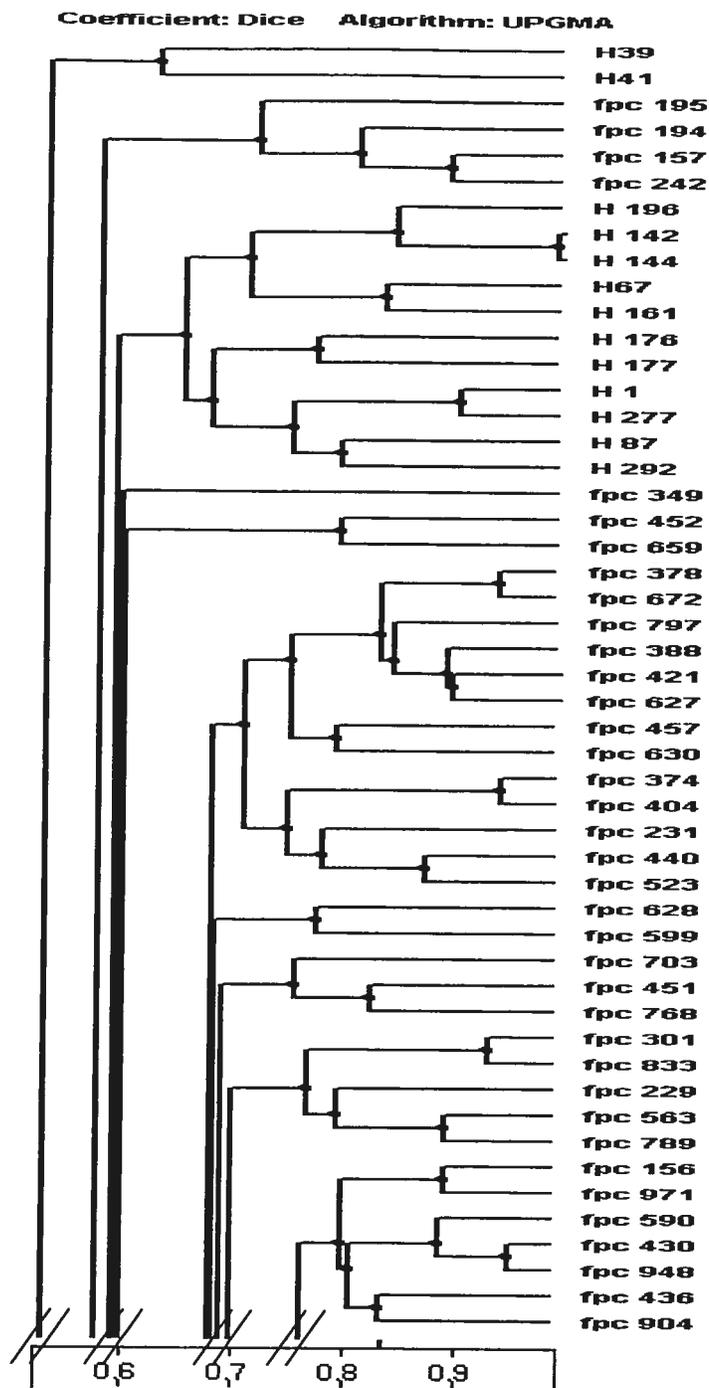


FIGURE 1. Representative portion of a dendrogram showing relatedness between swine (fpc) and human (H) *Campylobacter* isolates following digestion with *KpnI* enzyme. Levels of similarity were calculated with Dice coefficient, and the UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetical averages) was used for cluster analysis

4. MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS
ARTICLE 2

**Antimicrobial Susceptibilities of Thermophilic *Campylobacter* spp. from
Humans, Swine, and Poultry**

E. Guévremont¹, É. Nadeau¹, M. Sirois², S. Quessy¹

¹Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000,
St-Hyacinthe, Québec, Canada.

²Département de chimie-biologie, Université du Québec à Trois-Rivières,
Trois-Rivières, Québec, Canada

Manuscrit en préparation

SUMMARY

Aims: The incidence, the distribution of antimicrobial resistance and the presence of genetic determinants of resistance among animal populations was evaluated for *Campylobacter* recovered from swine, poultry and humans.

Materials and methods: The MICs of 10 antimicrobial agents were determined by the agar dilution technique. The detection of *tetO* determinant was performed by PCR. Analysis of mutations in *gyrA* was performed by sequencing and by MAMA-PCR.

Results: In *C. coli*, high rates of resistance were observed for clindamycin, erythromycin, streptomycin and tetracycline in pigs, while *C. coli* from poultry were mainly resistant to streptomycin and tetracycline and to tetracycline in humans. The proportion of resistant-*C. jejuni* isolates was low, excepted for tetracycline. The *tetO* determinant was identified among *Campylobacter* tetracycline-resistant and among tetracycline-susceptible isolates from swine. Among *C. coli* ciprofloxacin-resistant isolates, 64% of the isolates from swine and all isolates from humans had the mutation (Thr-86→Ile) associated with quinolone-resistance. The MAMA PCR gave identical results.

Conclusions: This study provides data for the rate of antimicrobial resistance among *Campylobacter* isolated from different animal populations in Quebec province.

Significance and Impact of the Study: Further analysis need to be done in order to detect other tetracycline genetic determinants.

Keywords: tetracycline, fluoroquinolone, MAMA PCR, agar dilution, resistance

INTRODUCTION

Campylobacter species is now recognized as the most common causes of bacterial enteric illness in humans worldwide. Infections in humans are caused by *C. jejuni* in approximately 90% of cases while five to 10% of them are associated with *C. coli* (11). In most instances, the disease is self-limited and patients recover health within few days. Antimicrobial therapy is not indicated excepted in severe cases or for immunocompromised patients. Erythromycin and fluoroquinolones are drugs of choice to treat complicated *Campylobacter* infections. However, an increase in antimicrobial agents resistance has been reported in many countries for *Campylobacter*, particularly for tetracycline, fluoroquinolones and erythromycin (5, 6, 15).

Campylobacteriosis is generally associated with sporadic episodes of diarrhea linked with consumption of improperly handled or cooked food. Animal productions such as swine, cattle and poultry are potential reservoirs for these bacteria. *C. jejuni* is predominant in chicken broilers and cattle but is infrequent in pigs, where *C. coli* predominates (13). It has been shown that *Campylobacter* from animals can be transferred to humans (3, 12). Some authors suggested that the use of antimicrobial agents in animal productions plays a key role in the dissemination of antimicrobial resistances genes from animals to human population (18).

To evaluate this relation it is important to verify the distribution of antimicrobial resistance in those populations. The principal determinant for tetracycline resistance in *Campylobacter* is a plasmidic gene belonging to the Tet family proteins (TetO) which act by protecting the ribosome from the action of tetracycline (4). For fluoroquinolones, mutations in the genes encoding subunits of the DNA gyrase (*gyrA*) and topoisomerase IV (*parC*) appear to be mainly responsible for the resistance. The transition at position 86 of a threonine to an isoleucine in *gyrA* is associated with high-rate resistance to nalidixic acid and ciprofloxacin (20).

The aim of this study was to evaluate the incidence and the distribution of antimicrobial resistance in *Campylobacter* isolates from humans, poultry and swine. In order to increase chances to establish links, the isolates were recovered from a restricted geographical area and during the same period of time. The detection of some genetic determinants of resistance was also done in order to characterize the resistance and to assess the possible transmission of genetic determinants of antimicrobial resistance from selected animal species to humans.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates

A total of 323 *Campylobacter* isolates, 39 from humans, 96 from pigs, and 188 from chicken broilers, were analyzed in this study. The sampling was conducted during 1998 and 1999 and within a radius of 60 km from St-Hyacinthe, Québec, Canada. Twenty-four *Campylobacter* isolates from humans originated from clinical cases of sporadic diarrhea collected at the hospital laboratory of this area. As the incidence of *C. coli* was found to be lower than *C. jejuni*, the *Laboratoire de Santé Publique du Québec* (LSPQ) provided us fifteen *C. coli* isolates. These bacteria were isolated from sporadic campylobacteriosis cases reported for the same period of time and for the extended same geographical region than the present study. *Campylobacter* isolates from swine and poultry originated from cecal contents of healthy animals, randomly sampled in slaughterhouses that distribute their product within the same geographical area. For bacterial isolation, cecal and fecal contents were inoculated onto charcoal-based selective medium (CSM) (*Campylobacter* agar base, Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) with supplements (*Campylobacter* selective supplement SR167E, Oxoid) and incubated at 42°C in anaerobic jars (Oxoid), under microaerophilic atmosphere (Campy gen™, Oxoid) for 48 h (8). Typical colonies were tested for growth at 25°C and 42°C, Gram staining, motility under darkfield microscope, oxidase and catalase reactions, hippurate hydrolysis, and indoxyl acetate hydrolysis.

Minimal inhibitory concentration (MIC) determination

The following antimicrobial agents were tested for bacterial resistance: ampicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, clindamycin, enrofloxacin erythromycin, gentamicin, streptomycin, sulfamethoxazole, and tetracycline (ciprofloxacin and enrofloxacin from Bayer, Kansas City, Mo and the others from Sigma Chemical Co., St.Louis, Mo.). MICs determination was done by using the agar dilution method as recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (17). The dilutions ranged from $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ to $128 \mu\text{g mL}^{-1}$, except for sulfamethoxazole ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$ to $512 \mu\text{g mL}^{-1}$). Briefly, for each isolate, a bacterial suspension was prepared in Mueller-Hinton broth (Oxoid) at a density adjusted to a 0.5 McFarland turbidity standard and diluted 1:10 to get approximately 1×10^7 bacteria/mL. Approximately 2×10^4 CFU were deposited on the surface of antibiotic-containing Mueller-Hinton agar (Oxoid) supplemented with 5% sheep blood with a 3-mm Cathra replicator (Oxoid). The plates were incubated for 48 h at 37°C under microaerophilic atmosphere. The MIC was defined as the lowest concentration producing no visible growth. There are no internationally accepted criteria for susceptibility testing or for breakpoints for susceptible or resistant isolates available for *Campylobacter*. Consequently, breakpoints established for aerobic bacteria were used. The breakpoint values were designated as recommended by the NCCLS for veterinary pathogens (17). Briefly, breakpoint values of the CMI for resistance were as follows: for ciprofloxacin, clindamycin, and enrofloxacin over or equal to $4 \mu\text{g/ml}$; for erythromycin, higher or equal to $8 \mu\text{g/ml}$; for gentamicin and tetracycline, higher or equal to $16 \mu\text{g/ml}$; for ampicillin and chloramphenicol, higher or equal to $32 \mu\text{g/ml}$; for streptomycin, higher or equal to $64 \mu\text{g/ml}$ and finally, higher or equal to $512 \mu\text{g/ml}$ for sulfamethoxazole. The *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 25922 control strains were included on each plate.

Statistical analysis

The χ^2 test and Fisher's exact two-tailed tests were used to evaluate the differences in resistance rates between groups of isolates belonging to different animal species and humans for each antimicrobial agent. An α of 0,05 was used for statistical significance.

DNA isolation, PCR and DNA sequencing

Total cellular DNA was isolated using the DNeasy tissue system kit (QIAGEN Inc., Mississauga, Ont, Canada) according to the manufacturer's instructions. For tetracycline resistance, 2 sets of primers were compared. For the first PCR reaction, the *tetO* gene was amplified by PCR using primers previously described (23). Briefly, amplification reactions were done in a 50 μ L volume containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 200 μ M of each deoxynucleoside triphosphate, 1.5 mM MgCl₂, 5 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0.1 nmol of each primer and 1 μ L of purified total DNA (~ 150 ng in sterile QIAGEN inc. elution buffer). PCR cycling conditions were as follows: initial denaturation at 94°C for 3 min, followed by 15 cycles of 94°C for 1 min, 60°C (dT° -1°C) for 30 sec, and 72°C for 2 min and followed by another 15 cycles of 94°C for 1 min, 45°C for 30 sec, and 72°C for 2 min, with a final step at 72°C for 10 min. The 2 kb amplification products were run on 1% agarose gels and stained with ethidium bromide. For the second PCR reaction, primers of Taylor (19) were used with the following PCR cycling conditions: initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 49°C for 45 sec, and 72°C for 1 min for an amplification product of 505 bp.

Characterization of the resistance to fluoroquinolone was based on the *gyrA* gene (24, 25). A PCR product containing the quinolone resistance-determining region (QRDR) was first generated to be further sequenced. Amplification reactions were done in a 50 μ L volume containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 200 μ M of each deoxynucleoside triphosphate, 1.5 mM MgCl₂, 5 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 0.15 nmol of each primer and 1 μ L of purified total DNA (~ 150 ng in

sterile QIAGEN Inc. elution buffer). Different sets of primers were used for *C. coli* and *C. jejuni* but PCR conditions were the same (24, 25). A 505-bp product for *C. coli* and a 673-bp product for *C. jejuni* were generated following conditions previously described (25). The PCR products were purified by the QIA-quick purification columns (QIAGEN Inc), according to the manufacturer's instructions, and sent for sequencing at the Sheldon Biotechnology Center, McGill University, Montréal, Canada.

Comparison of mismatch amplification mutation assay (MAMA) PCR to sequencing

The MAMA PCR was also used to evaluate the reliability of this technique as an alternative to sequencing. A conserved forward primer and a reverse mutation detection primer were used for *C. jejuni* and *C. coli* (24, 25). As expected, a 265-bp PCR product for *C. jejuni* and a 192-bp PCR product for *C. coli* were a positive indication of the presence of the Thr-86→Ile (ACT→ATT in *C. coli* and ACA→ATA in *C. jejuni*) mutation in *gyrA* gene. PCR reactions were performed as described above for the QRDR excepted that only 0.1 nmol of each primer was used. PCR products were generated following conditions previously described (25). The PCR products were run on 2% agarose gels and stained with ethidium bromide.

RESULTS

Identification of *Campylobacter* isolates

In this study, 23 isolates from humans, 180 isolates from broilers and no isolate from pigs were identified as *C. jejuni* whereas 16 isolates from humans, seven isolates from broilers and 96 isolates from pigs were identified as *C. coli*.

Susceptibility testing

Results obtained for MICs, MICs at which 50% of the isolates are inhibited (MIC_{50s}), MIC_{90s} and the proportion of resistant isolates are shown in Table 1 for *C. coli* and in

Table 2 for *C. jejuni*. The highest rate of resistance in each population of *C. coli* and *C. jejuni* isolates was observed for tetracycline (Tables 1 and 2).

For *C. coli*, there was no significant difference between resistance rates to the fluoroquinolones ciprofloxacin and enrofloxacin for isolates from swine, poultry and human even if no resistance to quinolones was observed in *C. coli* from broilers. Resistance rates to clindamycin and erythromycin, were significantly higher ($P < 0,001$) in *C. coli* from pigs (59.4% and 61.4%, respectively) than for *C. coli* from poultry (0%) and humans (12.5%). For *C. coli*, resistance to ampicillin was observed from swine and poultry isolates only. The proportion of isolates resistant to streptomycin was higher in pigs (66.7%) than in humans (25%) ($P = 0.002$). The *C. coli* isolated from pigs were not significantly more resistant than those isolated from humans and poultry to gentamicin (5.2% versus 0%; $P = 0.5$ and $P = 0.7$ respectively) and to sulfamethoxazole (14.6% versus 0%; $P = 0.1$ and $P = 0.3$ respectively). In this study, 17.7% of the *C. coli* from swine, 0% of the *C. coli* from chicken broilers and 6% of the *C. coli* from humans were resistant to four or more of different antibiotic classes, and thus considered as multiresistant isolates.

For *C. jejuni*, all isolates were susceptible to chloramphenicol, gentamicin, and sulfamethoxazole. The proportion of isolates resistant to ampicillin varied from 8.7% in humans to 21.7% in broilers. This difference was slightly below the statistical significance level ($P = 0.08$). Rates of resistance to clindamycin, erythromycin, and fluoroquinolones (ciprofloxacin and enrofloxacin) were not either statistically different among the various population of *C. jejuni* isolates. The proportion of resistant isolates to streptomycin was significantly higher ($P = 0.04$) in humans (17.4%) than in broilers (5.0%) whereas the proportion of resistant isolates to tetracycline was significantly higher ($P = 0.008$) in broilers (66.5%) than in humans (39.1%). Multiresistance was recovered from only 1% of the *C. jejuni* isolates from broilers while no multiresistant isolate from humans were observed.

Prevalence of *tetO*

With the first set of primers, the 2 kb genetic determinant *tetO* was recovered from 82.8, 70.2, and 100% of tetracycline-resistant isolates from swine, poultry and humans, respectively. On the other hand, 17.2 and 4.0% of the susceptible isolates from swine and poultry, respectively, had the *tetO* determinant. Results in regard with the presence of the *tetO* determinant varied for isolates showing intermediate resistance rates to tetracycline. In swine, 80% of the intermediate isolates possessed the determinant but it was recovered from only 37.5% of the intermediate broilers isolates and from no intermediate humans isolate. In comparison, with the second set of primers, *tetO* was detected from all the resistant isolates.

MAMA PCR and sequence analysis of *gyrA*

Isolates resistant to fluoroquinolones by agar dilution were sequenced at the QRDR level. Results are shown in Tables 3 and 4. In *C. coli*, all human isolates found resistant to fluoroquinolones and 63.6% (7/11) of swine isolates had the transition of one nucleotide (ACT→ATT) associated with a change from a threonine to an isoleucine at position 86 of GyrA. These findings were in accordance with result obtained for the detection of this mutation by MAMA PCR where the wild-type amino acid-86 codon was not amplified with the reverse mutation primer. In *C. jejuni*, this mutation was not observed in isolates from broilers. Accordingly, these isolates were all negative by MAMA PCR. On the other hand, fluoroquinolone-resistant isolates from humans were found positive in both tests for the presence of the mutation in *gyrA*. For resistant isolates where this mutation was absent, no other amino acid substitution was observed.

DISCUSSION

The development of antimicrobial resistance in pathogenic bacteria is a great matter of concern. Since thermophilic *Campylobacter* are recognized as zoonotic pathogens, resistance among isolates in animal reservoirs could have consequences for the treatment of infections in human. Antimicrobial susceptibility tests for

Campylobacter are not standardized and there are no internationally accepted performance standards. As a matter of consequence, discrepancies are often observed in scientific literature while reporting *Campylobacter* susceptibility patterns (11).

Erythromycin is considered the drug of choice in *C. jejuni* infections. Most of the *Campylobacter* isolates were susceptible to erythromycin and clindamycin, excepted for *C. coli* isolates from pigs where, as previously reported, (1) a high proportion of isolate was resistant for erythromycin. These high rates of resistance among *C. coli* could be due to a selective pressure caused by the wide use of tylosin in swine production (1). Resistance to gentamicin, chloramphenicol and sulfa drugs are rare in *Campylobacter* whereas 15 to 60% of the organisms are reported to be resistant to ampicillin (9, 20). In the current study, the highest rate of resistance for ampicillin was observed in *C. jejuni* from broilers. Resistance to streptomycin was more frequent among *C. coli* from pigs as reported elsewhere (1). Multiple drug resistances are rare but possible in *Campylobacter* (21). In the current study, multiresistant isolates were more common in *C. coli* than in *C. jejuni*.

The highest rates of resistance observed in the current study were for tetracycline. It ranged from 65.3% to 71.4% in *Campylobacter* from food animals. In a similar study conducted in Belgium, a high rate of resistance to tetracycline was also observed, mainly for *C. coli* from pigs and broilers (62.3% and 51.5% respectively) (21). Similar results were obtained in another study done in Italy (14). Tetracycline resistance was less common for isolates from humans (39.1%); this rate is in accordance with data (46%) reported by the National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) in the USA in 1998 (2). The rate of resistance to tetracycline increased in the past few years. In Canada, Gaudreau and Gilbert (6) reported a significant increase in the resistance of *C. jejuni* to tetracycline, varying from 19.1% in 1985-1986 to 55.7% in 1995-1997. Tetracyclines are relatively inexpensive drugs with a broad spectrum of activity. For this reason, they have been widely used in the prophylaxis and therapy of human and animal infections as well as

animal growth promoters. These selective pressures have resulted in the emergence of resistant organisms which could spread their resistance genes by conjugal transfer of plasmid (4).

So far, *tetO* is the only reported gene responsible for the resistance in *Campylobacter*. In this study, a small proportion of the broilers and swine tetracycline-susceptible isolates possessed the determinant but did not express it. Since a particular DNA sequence upstream of this gene is required for high-rate of resistance, (22) it can be supposed that this sequence might have been altered in those isolates, affecting the expression. Primers described by Taylor were found to be more sensitive as all resistant isolates of the current study were detected against a detection rate of 82.8% among swine and 70.2% among poultry isolates. Variations in primers recognition sequences might be more frequent for the Widdowson primers. The Taylor primers could be considered more powerful if only a molecular detection is done to evaluate resistance to tetracycline among *Campylobacter*.

Resistance to fluoroquinolones in *Campylobacter* from food animal origin is recognized as an important emerging public health threat (5). The use of these antimicrobials for the treatment of traveler's diarrhea and other gastroenteritis as well as the recent use in food animal productions may be responsible for these increases in resistance rates. The rate of resistance passed from 3.5% in 1992-1993 to 12.7% in 1995-1997, for *C. jejuni* clinical isolates from humans in Québec (6). In the current study, a resistance rate to ciprofloxacin of 8.7% was observed in *C. jejuni* from humans. For quinolones, poultry had been reported as a possible source of resistant bacteria to human given the past use of enrofloxacin in animal production and the known epidemiological link between poultry and human campylobacteriosis (16). In the Netherlands, almost 30% of *Campylobacter* isolates from broilers were resistant to fluoroquinolones (7). In the current study, the resistance rate to fluoroquinolones observed for isolates from broilers was not significantly higher than for isolates from human. This rate remains lower than 10%, being similar to the one reported in a

Danish study (1). This suggests that resistant bacteria from broilers would not be the main cause of the quinolone-resistance increase observed in humans in Québec by Gaudreau and Gilbert (6).

Mutations in *gyrA* were reported as mainly responsible for quinolone resistance. In the current study, only the Thr-86 mutation has been observed. This mutation has been associated with MICs of 16-64 $\mu\text{g/mL}$ while mutations in Asp-90 and in Ala-70 have been associated with lower MICs (5). Since we observed some isolates with high MIC without the mutation Thr-86→Ile in *gyrA*, it suggests that the resistance could be linked to others genes, such as *gyrB*, topoisomerase IV, *parC* and *parE*, or to efflux pumps or permeability factors (24). In addition, based on the results obtained in the current study, the MAMA PCR could be considered as a reliable technique to detect the Thr-86→Ile mutation and as a valuable alternative to sequencing since PCR results observed in this study were correlated by sequencing.

Isolates from poultry and humans included in the current study had been previously characterized by PFGE and biotyping (12). We compared the antimicrobial-resistance profiles for isolates clustered inside PFGE-*KpnI* genotypes. In 76% of the genotypes (26/34), isolates had the same antimicrobial profile or only one isolate differed for one antimicrobial agent. The PFGE analysis revealed that 5 *C. jejuni* isolates from humans were associated to isolates from poultry (12). In three associations, isolates clustered in the same genotype had the same antimicrobial-resistance profile (data not shown). These results suggest that some *C. jejuni* strains are present in both human and poultry populations and that poultry could be a reservoir of resistant *C. jejuni* strains for humans but, the low recovery of resistance to quinolones in poultry would not be responsible for the increase observed in isolates from humans. Establishing association between antimicrobial use and resistance is a complex process but nonetheless, antimicrobial use in animals apparently contributes to the selection and spread of resistance among populations of bacteria in human and animals (10).

ACKNOWLEDGEMENT

We would like to thank Manon Caron and Serge Messier for the technical assistance and Bruce Kilmer at Bayer inc for kindly providing us the ciprofloxacin and enrofloxacin reagents. We also acknowledge the Laboratoire d'hygiène vétérinaire et alimentaire (Saint-Hyacinthe) for access to their facilities and Santé Canada for the financial support.

REFERENCES

1. **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(10):2244-50.**
2. **Anonymous.** 2000. NARMS 2000 annual report. <http://www.cdc.gov/narms>.
3. **Blaser, M. J.** 1997. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *J Infect Dis.* **176 Suppl 2:S103-5.**
4. **Chopra, I., and M. Roberts.** 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* **65(2):232-60.**
5. **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(1):24-34.**
6. **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(8):2106-8.**
7. **Jacobs-Reitsma, W. F., P. M. Koenraad, N. M. Bolder, and R. W. Mulder.** 1994. *In vitro* susceptibility of *Campylobacter* and *Salmonella* isolates from broilers to quinolones, ampicillin, tetracycline, and erythromycin. *Vet Q.* **16(4):206-8.**

8. **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(3):456-9.**
9. **Lachance, N., C. Gaudreau, F. Lamothe, and L. A. Lariviere.** 1991. Role of the beta-lactamase of *Campylobacter jejuni* in resistance to beta-lactam agents. *Antimicrob Agents Chemother.* **35(5):813-8.**
10. **McEwen, S. A., and P. J. Fedorka-Cray.** 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin Infect Dis.* **34 Suppl 3:S93-S106.**
11. **Nachamkin, I., J. Engberg, and F. M. Aarestrup.** 2000. Diagnosis and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* species, p. 45-66. *In* I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington DC, USA.
12. **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(1):73-8.**
13. **Nielsen, E. M., J. Engberg, and M. Madsen.** 1997. Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Danish patients, poultry, cattle and swine. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **19(1):47-56.**
14. **Pezzotti, G., A. Serafin, I. Luzzi, R. Mioni, M. Milan, and R. Perin.** 2003. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. *Int J Food Microbiol.* **82(3):281-7.**
15. **Prats, G., B. Mirelis, T. Llovet, C. Munoz, E. Miro, and F. Navarro.** 2000. Antibiotic resistance trends in enteropathogenic bacteria isolated in 1985-1987 and 1995-1998 in Barcelona. *Antimicrob Agents Chemother.* **44(5):1140-5.**
16. **Smith, K. E., J. B. Bender, and M. T. Osterholm.** 2000. Antimicrobial resistance in animals and relevance to human infections, p. 483-495. *In* I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington DC.

17. **National Committee Clinical Laboratory Standards.** 1999. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard M31-A, Wayne, Pa.
18. **Swartz, M. N.** 2002. Human diseases caused by foodborne pathogens of animal origin. *Clin Infect Dis.* **34 Suppl 3**:S111-22.
19. **Taylor, D. E., K. Hiratsuka, H. Ray, and E. K. Manavathu.** 1987. Characterization and expression of a cloned tetracycline resistance determinant from *Campylobacter jejuni* plasmid pUA466. *J Bacteriol.* **69(7)**:2984-2989.
20. **Trieber, C. A., and D. E. Taylor.** 2000. Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter*, p. 441-454. In I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington DC.
21. **Van Looveren, M., G. Daube, L. De Zutter, J. M. Dumont, C. Lammens, M. Wijdooghe, P. Vandamme, M. Jouret, M. Cornelis, and H. Goossens.** 2001. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* strains isolated from food animals in Belgium. *J Antimicrob Chemother.* **48(2)**:235-40.
22. **Wang, Y., and D. E. Taylor.** 1991. A DNA sequence upstream of the *tet(O)* gene is required for full expression of tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **35(10)**:2020-5.
23. **Widdowson, C. A., K. P. Klugman, and D. Hanslo.** 1996. Identification of the tetracycline resistance gene, *tet(O)*, in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **40(12)**:2891-3.
24. **Zirnstein, G., L. Hesel, Y. Li, B. Swaminathan, and J. Besser.** 2000. Characterization of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter coli* by DNA sequence analysis and MAMA PCR. *FEMS Microbiol Lett.* **190(1)**:1-7.
25. **Zirnstein, G., Y. Li, B. Swaminathan, and F. Angulo.** 1999. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* isolates: detection of *gyrA* resistance mutations by mismatch amplification mutation assay PCR and DNA sequence analysis. *J Clin Microbiol.* **37(10)**:3276-80.

Table 1. Antimicrobial susceptibility of *C. coli* isolated from pigs, chicken broilers and humans

Antimicrobial agent	Pigs (n = 96)			Broilers (n = 8)			Humans (n = 16)					
	MIC ₅₀ ^a	MIC ₉₀	range	%R ^b	MIC ₅₀	MIC ₉₀	range	%R	MIC ₅₀	MIC ₉₀	range	%R
Ampicillin	4	16	≤0.25-64	17.7	4	4	4-32	12.5	2	8	2-16	0
Chloramphenicol	2	4	≤0.25-8	0	4	4	1-4	0	2	2	2-4	0
Ciprofloxacin	≤0.25	0.5	≤0.25-32	11.4	≤0.25	≤0.25	≤0.25-0.25	0	16	16	≤0.25-16	18.8
Clindamycin	4	32	≤0.25-128	59.4	≤0.25	≤0.25	≤0.25-0.5	0	1	1	≤0.25-8	12.5
Enrofloxacin		≤0.25	≤0.25-16	7.3	≤0.25	≤0.25	≤0.25	0	≤0.25	≤0.25	≤0.25-8	12.5
Erythromycin	32		≤0.25-128	61.4			0.5-2	0	0.5	4	≤0.25-128	12.5
Gentamicin		0.5	≤0.25-128	5.2	≤0.25	≤0.25	≤0.25-0.25	0	0.5	0.5	≤0.25-2	0
Streptomycin	64		0.5-128	66.7	4	4	≤0.25-128	50	0.5	64	0.5-128	25
Sulfamethoxazole	64	256	≤0.25-512	14.6	8	8	4-64	0	8	8	4-256	0
Tetracycline	32	64	≤0.25-128	67.7	2	2	≤0.25-64	50	1	64	≤0.25-128	56.3

^a MIC in µg/mL^b percentage of resistant isolates

Table 2. Antimicrobial susceptibility of *C. jejuni* isolated from chicken broilers and humans

Antimicrobial agent	Humans (n = 23)			Broilers (n = 180)		
	MIC ₅₀ ^a	MIC ₉₀	%R ^b	MIC ₅₀	MIC ₉₀	%R
Ampicillin	1	2	8.7	2	64	21.7
Chloramphenicol		2	0	2		0
Ciprofloxacin		≤0.25	8.7		≤0.25	1.1
Clindamycin		1	8.7	≤0.25	≤0.25	6.7
Enrofloxacin			4.3		≤0.25	1.1
Erythromycin	0.5	4	8.7		2	6.7
Gentamicin	≤0.25		0			0
Streptomycin		64	17.4		0.5	5
Sulfamethoxazole	8	64	0		32	0
Tetracycline	≤0.25	64	39.1		32	66.5

^a MIC in µg/mL^b percentage of resistant isolates

Table 3. Mutations in the *gyrA* QRDR region of *C. coli* isolates and MICs to ciprofloxacin and enrofloxacin

Source	Isolates No	Ciprofloxacin MIC ^a	Enrofloxacin MIC ^a	Putative <i>gyrA</i> aa 86 mutation ^b	MAMA PCR results
Swine	188	16	4	-	-
	195	32	8	+	+
	231	32	8	+	+
	246	16	2	-	-
	349	8	4	-	-
	408	16	4	+	+
	590	16	8	+	+
	594	16	2	+	+
	599	32	8	+	+
	835	8	2	+	+
	948	32	16	-	-
Humans	56967	16	8	+	+
	57530	16	0.25	+	+
	58776	16	8	+	+

^aMIC in $\mu\text{g/mL}$

^bMutants have a substitution of Thr-86 \rightarrow Ile (ACT to ATT)

Table 4. Mutations in the *gyrA* QRDR region of *C. jejuni* isolates and MICs to ciprofloxacin and enrofloxacin

Source	Isolates no	Ciprofloxacin MIC ^a	Enrofloxacin MIC ^a	Putative <i>gyrA</i> aa 86 mutation ^b	MAMA PCR results
Broilers	1889	32	8	-	-
	1944	32	4	-	-
Humans	57751	64	8	+	+
	H8	8	0.25	+	+

^aMIC in $\mu\text{g/mL}$

^bMutants have a substitution of Thr-86→Ile (ACT to ATT)

5. MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS
ARTICLE 3

**Antimicrobial Agents Resistance Profiles of *Campylobacter* and *Escherichia coli*
from Swine Herds with Various Therapeutic Regimens**

E. Guévremont and S. Quessy

Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000,
St-Hyacinthe, Québec, Canada.

Manuscrit en préparation

Abstract

Rates of antimicrobial resistance to tetracycline and enrofloxacin in *Campylobacter coli* and *Escherichia coli* isolates from swine herds using or not these antimicrobial agents were analyzed in this study. Prevalence and antimicrobial resistance patterns were also evaluated in humans taking care of the animals. A pool of feces from 10 pens in each of the 27 herds was taken to culture *C. coli* while attempts to isolate *E. coli* were done in 14 herds. A total of 441 and 378 isolates were found for *C. coli* and *E. coli* respectively. The agar dilution technique and the disk diffusion method were used to evaluate resistance to enrofloxacin and tetracycline. Among *C. coli* isolates from swine, 51% of pens from herds using tetracycline and 34.3% of pens from herds not using tetracycline harbored bacteria showing resistance to this agent. Among herds using enrofloxacin, 13% of the pens had enrofloxacin-resistant bacteria against 24% of pens from herds not using enrofloxacin. In both cases, this difference was not statistically significant. For *E. coli*, resistance to enrofloxacin was observed only in one pen from the 8 herds using enrofloxacin. There was neither no significant difference between *E. coli* resistance to tetracycline percentages, respectively 85% and 87% in pens from herds using or not tetracycline. No *C. coli* was recovered from humans and no difference was observed between resistance to tetracycline among *E. coli* from humans working in herds whether or not tetracycline was used. Genetic analysis of selected genes coding for resistance was conducted by PCR among tetracycline and enrofloxacin resistant *C. coli*. A high prevalence of *tetO* genetic determinants as well as the classical mutation at codon 86 of the quinolone resistance-determining region of the *gyrA* gene was observed. This study revealed that resistance profiles to antimicrobial agents observed in isolates from a particular herd are not exclusively associated with the types of antimicrobial agent used in the herd.

Introduction

The use of antimicrobial agents in animal feed for growth promotion, for improved feed efficiency, and for control and prevention of disease is very common (11). Consequently, feeding sub-therapeutic and therapeutic rates of tetracycline to pigs may lead to high percentages of tetracycline-resistant bacteria in the feces and intestinal tracts of swine (21). Recently, an increase in antimicrobial agents resistance has been reported in many countries among *Campylobacter*, especially for tetracycline, fluoroquinolones and erythromycin (5, 7, 15). Actually, resistance to fluoroquinolones is recognized as an emerging public health problem (5). On the other hand, tetracycline has been and is still widely used to prevent or treat human and animal infections (3). It has been suggested that the use of antimicrobial agents in food animal productions is in part responsible for the increased resistance among food-borne bacterial pathogens (12). Some authors even suggested that the use of antimicrobial agents in livestock played a key role in the selection and the dissemination of antimicrobial resistances from animals to human population (19). Also, commensal microflora including indicator bacteria such as *Escherichia coli*, may possess genetic elements encoding resistance genes which can be transferred to other enteric bacteria (1).

Previous studies focused on a possible link between the antimicrobial use in food animals and bacterial resistant infections, particularly for *C. jejuni*, in humans and the resistance to fluoroquinolones (17). In fact, many countries have withdrawn the use of some antimicrobial agents as growth promoter in food animal production. In Canada, tetracyclines like tetracycline, chlortetracycline or oxytetracycline are still widely used as therapeutic agent in finishing hogs as well as for the treatment of various infections. No fluoroquinolone formulation for feed stuff or drinking water is used in Canada but, nowadays, enrofloxacin (brand name Baytril®) is seldom used intramuscularly in injection for treating piglets.

Campylobacter species are now recognized as the most common cause of bacterial enteric illness in humans worldwide. Campylobacteriosis is generally associated with sporadic episodes of diarrhea linked with consumption of improperly handled or cooked food. Animal productions such as swine, cattle and poultry are potential reservoirs for these bacteria which could be spread throughout the slaughtering and processing steps and reach human populations. It has been often shown in the past that *Campylobacter* from animals can be transferred to humans (2). The principal determinant for tetracycline resistance in *Campylobacter* is carried on a plasmidic gene belonging to the Tet family proteins (TetO) which act by protecting the ribosome from the action of tetracycline (3). For fluoroquinolones, mutations in the genes encoding subunits of the DNA gyrase (*gyrA*) and topoisomerase IV (*parC*) appeared to be mainly responsible for the resistance. The transition at codon 86 of a threonine to an isoleucine in *gyrA* is often associated with high-rate resistance to nalidixic acid and ciprofloxacin (20).

The aims of this study were first, to evaluate the prevalence of food borne pathogen *Campylobacter* and indicator bacteria *E. coli* in different swine herds and among humans in close contact with animals and to compare the resistance rates to tetracycline and fluoroquinolones between bacteria recovered on farms using or not these antimicrobial agents. Finally, we wanted to study the distribution of genetic determinants responsible for resistance to tetracycline and to fluoroquinolones among the recovered *Campylobacter* isolates.

Material and methods

1. Herds selection

The selection of herds was done as follow. They had to be part of farrow-to-finish exploitations, with or without use of tetracyclines (tetracycline, chlortetracycline or oxytetracycline) or enrofloxacin and be located within a radius of 150 km from the Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec. Access to this information was made possible with the permission of the Canadian

Quality Assurance program provincial authorities (CQA™). This organization keeps registers of the pharmaco-therapeutic regimens, validated each year by a veterinarian, of each herd participating to the program. Among the 27 herds evaluated for the presence of *Campylobacter*, there were 20 herds using tetracycline and 7 not using tetracycline. Also, 10 herds using enrofloxacin and 17 herds without enrofloxacin use were analyzed. The same herd may use or not both antimicrobial agent. Half of the 27 herds (n=14) were evaluated for the presence of resistant indicator bacteria *E. coli*. Herds were visited once from June to August 2002. The therapeutic regimen was also checked to ensure conformity at the time of sampling.

2. Samples collect and bacterial identification

Sampling was done among pens of the finishing unit of each herd. Randomly, 10 pens per farm were selected and samples, consisting of a pool of 5 times one g of feces, taken at various locations in each pen were collected. When possible, 2 Cary-Blair swabs (Becton-Dikenson) were given to people working on a regular basis at the exploitation in order to obtain samples from humans in contact with animals. Samples were kept on ice for a maximal delay of 2 hours until processing at the laboratory. Samples from animals were homogenized in 10 mL of PBS prior to plating. For *Campylobacter* recovery, fecal swabs and one loopful from the homogenate were directly inoculated onto charcoal-based selective medium (CSM) (*Campylobacter* agar base, Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) with supplements (*Campylobacter* selective supplement SR167E, Oxoid) and incubated at 42°C in anaerobic jars (Oxoid), under microaerophilic atmosphere (Campy gen™, Oxoid) for 48 h (10). Classical biochemical tests were done as previously described (8). For *E. coli*, fecal swabs and one loopful from the homogenate were enriched in 10 mL of nutrient broth and incubated at 35°C for 24 h. One loopful was streaked onto MacConkey agar and incubated at 35°C for 24 h. Lactose-positive colonies with characteristic *E. coli* morphology were selected. *E. coli* was defined as indole positive, Simmons citrate negative, urease negative and hydrogen sulfide negative (6). Confirmation of some isolates was made by the API 20E® identification system

(bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). In both methods and for each plate, three typical colonies, with the exception of human sampling where 5 colonies were tested, were analyzed as described.

3. Susceptibility to antimicrobial agents

Antimicrobial agents enrofloxacin (Bayer, Kansas City Mo), and tetracycline (Sigma Chemical Co., St.Louis, Mo) were used. For *Campylobacter*, minimal inhibitory concentrations (MIC) determination was performed by the agar dilution method. The dilutions ranged from 0.5 $\mu\text{g/mL}$ to 16 $\mu\text{g/mL}$ for enrofloxacin and from 1 $\mu\text{g/mL}$ to 64 $\mu\text{g/mL}$ for tetracycline. Briefly, a bacterial suspension was prepared in Mueller-Hinton broth (Oxoid) at a density adjusted to a 0.5 McFarland turbidity standard and diluted 1:10 to get 1×10^7 bacteria/mL. Approximately 2×10^4 CFU were deposited on the surface of antibiotic-containing Mueller-Hinton agar (Oxoid) supplemented with 5% sheep blood with a 3-mm Cathra replicator (Oxoid). The plates were incubated for 48 h at 37°C under microaerophilic atmosphere. The MIC was defined as the lowest concentration producing no visible growth. For *E. coli*, the disk diffusion method was used as described previously (13). The breakpoint values were designated as recommended by National Committee for Clinical Laboratory Standards (1997) for veterinary pathogens (13). Briefly, breakpoint values of the CMI for resistance were as follows: for ciprofloxacin, clindamycin, and enrofloxacin over or equal to 4 $\mu\text{g/ml}$; for erythromycin, higher or equal to 8 $\mu\text{g/ml}$; for gentamicin and tetracycline, higher or equal to 16 $\mu\text{g/ml}$; for ampicillin and chloramphenicol, higher or equal to 32 $\mu\text{g/ml}$; for streptomycin, higher or equal to 64 $\mu\text{g/ml}$ and finally, higher or equal to 512 $\mu\text{g/ml}$ for sulfamethoxazole. The following control strains *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 25922 were included.

4. Statistical analysis

The non-parametric Wilcoxon test and the Pearson Chi-Square test were used for the statistical analysis of difference in resistance rates. An α of 0.05 was used to determine statistical significance.

5. DNA isolation, PCR, and DNA sequencing

Total cellular DNA was isolated using a DNeasy tissue system kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. For detection of *tetO* determinant, primers used were previously described (23). Amplification reactions were performed as previously described (9). The 2 kb amplification products were run on 1% agarose gels and stained with ethidium bromide. Characterization of the fluoroquinolone was based on the *gyrA* gene. The MAMA (mismatch amplification mutation assay) PCR protocol was used as a reliable alternative technique to the sequencing as previously described for *C. coli* (24). A 192-bp PCR product revealed the presence of the Thr-86-to-Ile mutation in *C. coli*. The PCR products were run on 2% agarose gels and stained with ethidium bromide. For validation, a subset of isolates was sequenced. First, a PCR product containing the quinolone resistance-determining region (QRDR) was generated. Amplification conditions were performed as previously described (9). A 505-bp product for *C. coli* was generated with primers and PCR conditions previously described (24). The product was purified by the QIA-quick (Qiagen) purification columns, according to the manufacturer's instructions, and sent for sequencing at the Sheldon Biotechnology Center - McGill University, Montreal, Canada.

Results

1. Prevalence of *Campylobacter* and *E. coli* in studied herds

Campylobacter, as well as *E. coli*, were recovered among all the sampled herds from feces collected in pens during the finishing production stage. All isolates from the current study were identified as *C. coli*. For *C. coli*, the isolation rate varied from 1 to 10 positive pens by herd with an average of 6.8 positive pens by herd. For *E. coli*, bacteria were recovered from 7 to 10 positive pens by herd with an average of 9.4 positive pens by herd. Among 42.2% of the pens, it was possible to isolate 3 distinct colonies of *Campylobacter* while 3 distinct *E. coli* colonies were recovered from 85.0% of the pens. A total of 441 *C. coli* isolates were recovered among all the sampled pens (n=270) while 378 *E. coli* isolates among the 14 herds were analyzed.

Among isolates from humans (n=37), only one was positive for the presence of *Campylobacter* and was identified as *C. jejuni*. Thirteen *E. coli* isolates were recovered from feces of humans (n=22) working on the 14 tested farms.

2. Antimicrobial agents resistance profiles

The agar dilution method was performed on all *C. coli* from swine (n=441). A pen was considered as being resistant when one resistant isolate of *C. coli* was recovered. The distribution of pens harboring *C. coli* resistant to tetracycline or enrofloxacin according to the type of production is shown in Table 1 to Table 4. No significant difference was observed between the absolute percentage (number of resistant pens over total number of pens) of pens containing tetracycline-resistant *C. coli* in relation with the use or not of this agent in herds ($P= 0.54$). Among the herds using tetracycline, an average of 5.1 pens contained feces with tetracycline-resistant isolates of *C. coli* compared to an average of 3.43 pens among the herds not using tetracycline. In 60% (12/20) of herds using tetracycline, 5 pens or more harbored resistant *C. coli* against 43% for herds without tetracycline. This difference was not found significant ($P = 0.25$). However, it was possible to observe 2 herds without tetracycline use where no resistant *C. coli* was present.

The distribution of pens with indicator bacteria *E. coli* resistant to tetracycline according to the type of production is shown in Table 5 and Table 6. No significant difference was observed between the percentage of pens harboring tetracycline-resistant *E. coli* in herds using or not of this agent ($P= 0.82$). Among the herds using tetracycline, an average of 8.5 pens contained feces with tetracycline-resistant isolates of *E. coli* compared to an average of 8.7 pens among the herds not using tetracycline.

Among the herds using or not enrofloxacin, no significant difference between the percentage of pens where resistant *C. coli* was recovered was observed in relation with the use of this agent in herds ($P = 0.46$). In average, 1.3 pens contained enrofloxacin-resistant *C. coli* among herds using enrofloxacin while an average of 2.4

pens per herds without enrofloxacin use were colonized with resistant *C. coli*. No herd using enrofloxacin had 5 or more pens with resistant bacteria compared to 24% in herds without enrofloxacin use. For *E. coli*, among the herds with or without enrofloxacin use, only one pen where enrofloxacin was used harbored resistant *E. coli* in swine. Among all herds using enrofloxacin, enrofloxacin-resistant *E. coli* was isolated in 1.4% of pens.

For the analysis of human isolates, in order to optimize the possibility of isolating resistant bacteria, 5 colonies were tested. One sample was considered as resistant if one colony was found to be resistant to the antimicrobial agent. Among *E. coli* isolates from humans, no resistance to enrofloxacin was observed. Otherwise, the incidence of tetracycline-resistant *E. coli* from humans working on herds using or not tetracycline was of 37.5% (3/8) and 40% (2/5) respectively, which was found to be not statistically significant ($P = 1$).

Among the pens where 3 colonies of *C. coli* were isolated, it was observed that when isolates were resistant to tetracycline or enrofloxacin, all three isolates were resistant in 61% and 71% of the time, respectively. On the other hand, 9% of the time only one isolate over the three was resistant to tetracycline or to enrofloxacin.

3. Prevalence of *tetO*

The genetic determinant *tetO* was recovered from 69% (76/110) of the tetracycline-resistant isolates from swine and from 69% (9/13) of the intermediate isolates. These isolates came from herds with tetracycline use as well as from herds without tetracycline use. On the other hand, 13% (12/90) of the susceptible isolates from swine had the *tetO* determinant. Interestingly, all these isolates came from herds without use of tetracycline.

4. Analysis of *gyrA*

In *C. coli*, 95.3% (41/43) of the swine isolates had a positive reaction by PCR based on the detection of the transition of one nucleotide (ACT→ATT) associated with a change from a threonine to an isoleucine at position 86 of GyrA. These findings were in accordance with result obtained for sequencing. For the resistant isolates where this mutation was absent, no other substitution of amino acid was observed in the QRDR.

Discussion

It is well accepted that antimicrobial-resistant food-borne bacteria represent a risk to human health, in part at least as a result of the selective pressure applied by antimicrobial use in food animals (17). Besides the fact that pork meat represent a lower risk of transmission of *Campylobacter* bacteria to humans than poultry, the wide use of antimicrobial agents can exert a selective pressure among bacteria recovered from swine herds (8). In order to evaluate the impact of antimicrobial agents use at the farm level on the distribution of resistant *Campylobacter* and indicator bacteria such as *E. coli*, various swine herds with different pharmacotherapeutic regimens of tetracycline or fluoroquinolone were followed. To our knowledge, it is the first time that a study is performed on *Campylobacter* resistance rates to antimicrobial agents in swine herds in respect with the use or not of selected antimicrobial agents.

C. coli is known to be predominant in swine (14). The prevalence of this bacteria observed in this study among swine herds was in accordance with previous studies (8, 14, 22). As part of the intestinal microflora, high levels of *E. coli* among swine have also been reported elsewhere (18). By sampling people working in close contact with the animals, it was possible to evaluate if this population was more at risk of being infected or colonized by *Campylobacter*. It is well known that the number of campylobacteriosis may be underestimated since many cases are sporadic or not diagnosed. In the current study, no human harbored *C. coli* in their feces suggesting

that people working in close contact with animals were not more at risk to be colonized than other people.

There was no difference observed in the current study between the resistance rates to tetracycline among *C. coli* and *E. coli* recovered from herds using or not tetracycline. Tetracyclines are relatively inexpensive drugs with a broad spectrum of activity. For this reason, they have been widely used in the prophylaxis and therapy of human and animal infections as well as animal growth promoters (3). In a study conducted on *Campylobacter* isolates from bovine feces, there was no difference observed in tetracycline resistance rate between organic and conventional farms (16). This situation was also observed for *E. coli* where there was a high prevalence of tetracycline resistance determinant in swine herds whether or not they were fed with antimicrobial agent (11). However, the authors observed a difference in the distribution of tetracycline resistance determinant classes between herds exposed or not to antibiotics. In the current study, previous utilisation of this agent in another production cycle or the transmissible nature of the resistance determinant may explain the recovery of resistant isolates in herds without tetracycline use.

The introduction of fluoroquinolones, such as enrofloxacin, in veterinary medicine could be responsible for the increase in resistance. In this current study, we found no significant difference in resistance rates to enrofloxacin among *C. coli* between herds with or without enrofloxacin use. It has been observed that a five day enrofloxacin treatment in piglets contributed to the emergence and persistence for up to five weeks of enrofloxacin resistant *C. coli* (4). Even if no treatment was given for the studied period of time, resistant bacteria from a previous cycle of production can persist in the environment despite regular washing and disinfection procedures. Also, periodical introduction of replacement animals in herds may be a source of resistant bacteria. For *E. coli*, the low prevalence (1.4%) among herds using enrofloxacin was in accordance with published literature. Percentages of resistance varied from 0% in

Sweden to 1% in the Netherlands (21). A very low prevalence was also observed in the current study among human isolates.

The single point mutation in the *gyrA* QRDR was often observed in this study (95.3% of isolates). It was observed in another study where 100% of the enrofloxacin resistant *C. coli* had this mutation (4). Regarding the prevalence of *tetO* determinant, some tetracycline resistant *C. coli* did not express this gene, suggesting that other determinants could be responsible for the resistance. A possible transfer of resistance among the commensal microflora in animals, may harbor potential genetic elements encoding resistance like the numerous *tet* determinants in *E. coli*, should be further investigated (1).

Establishing an association between antimicrobial use and resistance is a complex task. However, results obtained in this study suggest that the resistance profiles to tetracycline and enrofloxacin observed in isolates from a particular herd is not exclusively associated with the use of these antimicrobial agents and that many factors may affect the antimicrobial resistance patterns of bacterial isolates found in a particular operation.

Acknowledgments

We would like to thank Jessicâ Pothier for technical assistance and Guy Beauchamp for statistical analysis.

References

1. **Blake, D. P., R. W. Humphry, K. P. Scott, K. Hillman, D. R. Fenlon, and J. C. Low.** 2003. Influence of tetracycline exposure on tetracycline resistance and the carriage of tetracycline resistance genes within commensal *Escherichia coli* populations. *J Appl Microbiol.* **94**(6):1087-97.
2. **Blaser, M. J.** 1997. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *J Infect Dis.* **176 Suppl 2**:S103-5.
3. **Chopra, I., and M. Roberts.** 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* **65**(2):232-60.
4. **Delsol, A. A., J. Sunderland, M. J. Woodward, L. Pumbwe, L. J. Piddock, and J. M. Roe.** 2004. Emergence of fluoroquinolone resistance in the native *Campylobacter coli* population of pigs exposed to enrofloxacin. *J Antimicrob Chemother.*
5. **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**(1):24-34.
6. **Farmer-III, J. J.** 1999. Enterobacteriaceae: introduction and identification, p. 442-459. *In* P. R. Murray, Baron, E.J., Tenover, M.A., et al (ed.), *Manual of Clinical Microbiology.* ASM Press.
7. **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**(8):2106-8.
8. **Guevremont, E., R. Higgins, and S. Quessy.** 2004. Characterization of *Campylobacter* isolates recovered from clinically healthy pigs and from sporadic cases of campylobacteriosis in humans. *Journal of Food Protection.* **67**(2):228-34.

9. **Guevremont, E., É. Nadeau, M. Sirois, and S. Quessy.** 2004. Antimicrobial susceptibilities of thermophilic *Campylobacter* spp. from humans, swine, and poultry. **Manuscrit en préparation.**
10. **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(3):456-9.**
11. **Lee, C., B. E. Langlois, and K. A. Dawson.** 1993. Detection of tetracycline resistance determinants in pig isolates from three herds with different histories of antimicrobial agent exposure. *Appl Environ Microbiol.* **59(5):1467-72.**
12. **McEwen, S. A., and P. J. Fedorka-Cray.** 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin Infect Dis.* **34 Suppl 3:S93-S106.**
13. **NCCLS.** 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard - Second Edition M31-A2. NCCLS.
14. **Nielsen, E. M., J. Engberg, and M. Madsen.** 1997. Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Danish patients, poultry, cattle and swine. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **19(1):47-56.**
15. **Prats, G., B. Mirelis, T. Llovet, C. Munoz, E. Miro, and F. Navarro.** 2000. Antibiotic resistance trends in enteropathogenic bacteria isolated in 1985-1987 and 1995-1998 in Barcelona. *Antimicrob Agents Chemother.* **44(5):1140-5.**
16. **Sato, K., P. C. Bartlett, J. B. Kaneene, and F. P. Downes.** 2004. Comparison of prevalence and antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* spp. isolates from organic and conventional dairy herds in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol.* **70(3):1442-7.**
17. **Smith, K. E., J. B. Bender, and M. T. Osterholm.** 2000. Antimicrobial resistance in animals and relevance to human infections, p. 483-495. *In* I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington DC.

18. **Sunde, M., K. Fossum, A. Solberg, and H. Sorum.** 1998. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of swine. *Microb Drug Resist.* 4(4):289-99.
19. **Swartz, M. N.** 2002. Human diseases caused by foodborne pathogens of animal origin. *Clin Infect Dis.* 34 Suppl 3:S111-22.
20. **Trieber, C. A., and D. E. Taylor.** 2000. Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter*, p. 441-454. In I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington DC.
21. **van Den Bogaard, A. E., N. London, and E. E. Stobberingh.** 2000. Antimicrobial resistance in pig faecal samples from the Netherlands (five abattoirs) and Sweden. *J Antimicrob Chemother.* 45(5):663-71.
22. **Weijtens, M. J., P. G. Bijker, J. Van der Plas, H. A. Urlings, and M. H. Biesheuvel.** 1993. Prevalence of campylobacter in pigs during fattening; an epidemiological study. *Vet Q.* 15(4):138-43.
23. **Widdowson, C. A., K. P. Klugman, and D. Hanslo.** 1996. Identification of the tetracycline resistance gene, *tet(O)*, in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 40(12):2891-3.
24. **Zirnstein, G., L. Hesel, Y. Li, B. Swaminathan, and J. Besser.** 2000. Characterization of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter coli* by DNA sequence analysis and MAMA PCR. *FEMS Microbiol Lett.* 190(1):1-7.

Table 1. Number of pens where *C. coli* resistant to tetracycline were detected in herds using tetracyclines

Herd no	No of pens (%)
1	9 (90)
2	10 (100)
3	3 (30)
4	5 (50)
5	6 (60)
6	5 (50)
7	6 (60)
8	9 (90)
10	6 (60)
11	6 (60)
12	5 (50)
13	4 (40)
14	7 (70)
15	3 (30)
16	1 (10)
17	2 (20)
18	1 (10)
19	3 (30)
20	1 (10)
21	5 (50)

Table 2. Number of pens where *C. coli* resistant to tetracycline were detected in herds not using tetracyclines

Herd no	No of pens (%)
9	10 (100)
22	0 (0)
23	0 (0)
24	3 (30)
25	6 (60)
26	1 (10)
27	9 (90)

Table 3. Number of pens where *C. coli* resistant to enrofloxacin were detected in herds using enrofloxacin

Herd no	No of pens (%)
11	4 (40)
12	1 (10)
13	0 (0)
14	2 (20)
15	0 (0)
17	0 (0)
18	0 (0)
19	3 (30)
20	2 (20)
21	1 (10)

Table 4. Number of pens where *C. coli* resistant to enrofloxacin were detected in herds not using enrofloxacin

Herd no	No of pens (%)
1	7 (70)
2	9 (90)
3	0 (0)
4	0 (0)
5	3 (30)
6	2 (20)
7	0 (0)
8	1 (10)
9	2 (20)
10	5 (50)
16	0 (0)
22	0 (0)
23	0 (0)
24	1(10)
25	4 (40)
26	7 (70)

Table 5. Number of pens where *E. coli* resistant to tetracycline were detected in herds using (+) or not (-) tetracyclines

Herd no	Use	No of pens (%)
14	+	6 (60)
15	+	10 (100)
16	+	7 (70)
17	+	10 (100)
18	+	8 (80)
19	+	10 (100)
20	+	7 (70)
21	+	10 (100)
22	-	9 (90)
23	-	7 (70)
24	-	8 (80)
25	-	10 (100)
26	-	10 (100)
27	-	8 (80)

Table 6. Number of pens where *E. coli* resistant to enrofloxacin were detected in herds using (+) or not (-) enrofloxacin

Herd no	Use	No of pens (%)
14	+	0 (0)
15	+	0 (0)
16	-	0 (0)
17	+	0 (0)
18	+	0 (0)
19	+	0 (0)
20	+	1 (10)
21	+	0 (0)
22	-	0 (0)
23	-	0 (0)
24	-	0 (0)
25	-	0 (0)
26	-	0 (0)
27	-	0 (0)

6. DISCUSSION GÉNÉRALE

Campylobacter est l'agent bactérien responsable du plus grand nombre de diarrhées d'origine bactérienne chez l'humain à travers le monde. Dans la grande majorité des cas rapportés, les épisodes de campylobactériose sont considérés comme des infections sporadiques. Par contre, diverses épidémies de diarrhées impliquant *Campylobacter* ont déjà été rapportées dans le passé. Dans la plupart des cas, la source de contamination pour l'humain est la consommation ou la manipulation de viande contaminée. L'explication provient du fait que cette bactérie colonise le tractus digestif de la plupart des animaux de consommation comme le porc, la volaille et les bovins. Ainsi, la viande peut être contaminée dès l'étape de l'abattage. De plus, ce microorganisme peut également se retrouver dans l'eau et dans le lait non-pasteurisé. Parallèlement, afin de protéger les animaux de consommation de différentes infections et de promouvoir leur croissance, l'usage d'agents antimicrobiens en production animale fait souvent partie des méthodes de régie des élevages. Cette utilisation pourrait exercer une pression sélective sur le nombre d'isolats bactériens résistants aux antimicrobiens. Ceux-ci pourraient éventuellement atteindre l'humain par les mêmes modes de transmission. En plus de causer la diarrhée, certains sérotypes de *C. jejuni* seraient associés au développement du syndrome Guillain-Barré, affection entraînant une paralysie plus ou moins sévère des membres. Des études sont donc nécessaires afin d'analyser de façon plus approfondie le risque de transmission de cette bactérie du porc à l'humain. De plus, il est essentiel dans le contexte actuel de déterminer quel est le profil de résistance à différents agents pour des isolats de *Campylobacter* provenant de différentes populations humaines et animales au Québec. Finalement, l'impact associé à l'utilisation ou non d'agents antimicrobiens à la ferme sur la prévalence d'isolats résistants de *Campylobacter* permettra une meilleure identification des mesures de gestion à prendre en production animale pour diminuer le risque de transmission de gènes de résistance chez l'humain.

En ce moment, plusieurs organismes nationaux de santé publique s'intéressent à la surveillance de ce pathogène. Aux États-Unis, le Foodborne Diseases Active

Surveillance Network (FoodNet), en collaboration avec le Center for Diseases Control, surveille l'incidence de cette bactérie parmi la population humaine. Au Canada, la campylobactériose est considérée comme une maladie à déclaration obligatoire et son incidence est recensée par Santé Canada pour l'ensemble du territoire. Le défi pour les organismes oeuvrant en santé publique est d'analyser les facteurs de risque pouvant mener à la propagation de cette bactérie dans la population. Il devient alors essentiel d'identifier et de caractériser différents dangers potentiels afin de dresser un portrait représentatif de la situation au Québec.

Un risque potentiel de transmission de *Campylobacter* à l'humain est associé à la prévalence élevée de cette bactérie au niveau intestinal chez le porc. L'animal est colonisé principalement par *C. coli* alors que cette bactérie représente 5 à 10% des cas de campylobactérioses chez l'homme (59). Un des premiers objectifs du projet était la recherche de similitudes entre les isolats provenant de cas cliniques de campylobactériose et les isolats d'origine porcine afin de caractériser le risque pour la santé humaine que représentait la présence de *Campylobacter* parmi l'espèce porcine. En effet, le manque de connaissance quant à la prévalence et à la caractérisation de *Campylobacter* chez le porc, au Canada, faisait en sorte que le risque pour l'humain, associé à la présence de ce pathogène chez le porc, restait méconnu.

6.1 Incidence de *Campylobacter* chez le porc

La première étape dans l'évaluation d'un risque pour la santé publique consiste à identifier un danger susceptible d'affecter l'humain. Il est rapporté dans la littérature que plus de 85% des porcs sont porteurs de *Campylobacter* au niveau de l'intestin et que cette colonisation a lieu en très bas âge et persiste jusqu'au moment de l'abattage (110). Étant donné cette forte prévalence, le processus d'abattage des animaux, spécialement l'étape de l'éviscération, pourrait favoriser la contamination des carcasses et de la viande. La possible contamination lors de l'abattage représente donc un risque pour la santé publique. Malgré le fait que le nombre de bactéries

retrouvées sur les carcasses à la fin du processus de refroidissement soit souvent inférieur à celui retrouvé lors de l'éviscération, certaines bactéries subsistent et pourraient atteindre le consommateur par l'entremise de la viande. Il s'avérait donc important de recueillir des données épidémiologiques quant à l'incidence de cette bactérie chez le porc au Québec. En particulier, il nous apparaissait également utile de déterminer si *C. jejuni* peut être isolé d'un nombre significatif d'animaux, étant donné l'importance de ce pathogène en santé publique et sa grande prévalence au niveau de la volaille.

Parmi les 850 animaux échantillonnés dans cette étude, 77.6% étaient porteurs de *Campylobacter* au niveau intestinal. *C. coli* était majoritairement présent (95.7%) et aucun *C. jejuni* n'a été isolé bien que la méthode d'isolement utilisée dans la présente étude ait permis d'isoler *C. jejuni* à partir de la volaille (61). Bien que certaines études rapportent une prévalence plus élevée de *C. jejuni* par rapport à *C. coli* parmi certains élevages porcins (29, 114), *C. coli* demeure l'espèce colonisant principalement le tractus intestinal de cet animal (66). L'incidence observée dans la présente étude est en accord avec les données provenant de différents pays. Il est rapporté au Danemark que l'incidence de *Campylobacter* chez le porc se chiffre à 46% alors qu'elle passe à 85% aux Pays-Bas (66, 108). Lors d'une étude similaire réalisée aux États-Unis, l'incidence de *Campylobacter*, *C. coli* principalement, au niveau intestinal est de 80% (72). Il est à supposer que les différences dans les régies d'élevages de même que les variations entre les techniques d'isolement utilisées dans les différentes études pourraient faire varier les résultats et rendraient ainsi la comparaison difficile entre les études. Il faut par contre s'appuyer sur ces données puisqu'il n'y a pas encore de méthodes standardisées pour l'isolement de *Campylobacter*.

L'abattoir visité lors de la présente étude reçoit principalement les animaux provenant des producteurs des porcs de la région de St-Hyacinthe. Dès leur arrivée, les animaux sont répartis dans différents parcs et seront ensuite dirigés vers la chaîne

d'abattage. Le nombre d'animaux par lots peut varier d'un producteur à l'autre et plusieurs lots d'animaux peuvent donc être mélangés. Ainsi, en échantillonnant de façon aléatoire au poste d'éviscération, la diversité au niveau de la provenance des isolats est plus élevée permettant ainsi une meilleure représentativité de la production porcine dans la région de St-Hyacinthe. Le fait de prélever des échantillons parmi plusieurs productions porcines permettrait d'augmenter les chances de relier des isolats de *Campylobacter* d'origine humaine aux isolats porcins s'il y eu transmission dans la même région géographique. En effet, un point intéressant de cette étude est que l'échantillonnage est concentré dans la même région d'abattage et de distribution des produits transformés que les cas cliniques de campylobactériose. À la fin de l'abattage, les carcasses sont refroidies à l'air. Ainsi, à cause de la susceptibilité à l'assèchement de *Campylobacter*, le taux de contamination des carcasses est généralement de moins de 2% en ce qui a trait à la contamination de la viande de porc. Une étude réalisée dans quatre chaînes de supermarchés américains a révélé un niveau de contamination de 1.7% du produit fini, principalement par *C. coli* (115). Une étude réalisée dans une usine d'abattage et de transformation a permis d'observer la présence de *C. coli* dans l'environnement de transformation au niveau des planches à découper, une présence résultant probablement d'une contamination croisée (72). Il aurait été intéressant d'analyser la viande distribuée dans la région de même que l'environnement d'abattage et de transformation de la viande. Par contre, ce volet n'a pas été considéré dans la présente étude puisque la très faible prévalence dans le produit fini aurait rendu l'exercice très difficile.

6.2. Caractérisation des isolats de *Campylobacter* chez le porc

6.2.1 Géotypage des isolats

Il a été considéré que la forte prévalence de *Campylobacter* au niveau intestinal chez les porcs pourrait représenter un danger pour la santé publique. Il convenait donc d'évaluer plus à fond la nature du risque associé à la présence de

Campylobacter en caractérisant les microorganismes retrouvés, afin de pouvoir ultérieurement les relier à des isolats retrouvés chez l'humain. Parmi les techniques de génotypage moléculaire, le PFGE a été choisi pour son grand pouvoir discriminant. Jusqu'à ce jour, cette technique ainsi que celle de l'AFLP, demeurent les deux méthodes de typage les plus puissantes pour distinguer génétiquement de isolats bactériens, surpassant le PCR-RFLP et le ribotypage (66, 107). Dans la présente étude, suite au génotypage, une forte diversité génétique a été observée parmi les isolats de *Campylobacter* d'origine porcine et humaine (Article 1). Par exemple, le PFGE réalisé avec l'enzyme *KpnI* a permis d'observer 81 profils génétiques différents parmi 93 isolats bactériens d'origine porcine. Cette diversité génétique a été rapportée parmi d'autres études similaires (51). Dans une étude de Petersen et On (78), 28 profils de PFGE parmi 30 isolats de *C. jejuni* ont été observés suite à une digestion par l'enzyme *KpnI*.

6.2.2. Diversité génétique des isolats

Étant donné la diversité génétique observée parmi les échantillons analysés, nous avons évalué s'il pouvait en être ainsi à l'échelle du même animal. Effectivement, plus d'un profil génétique a été observé par animal (Article 1). Dans certains cas, jusqu'à quatre profils différents sur cinq isolats caractérisés ont été observés. Cette observation a été rapportée aussi par Weijtens *et al.* (109). Brièvement, en utilisant la méthode d'ERIC-PCR, jusqu'à 5 génotypes d'isolats de *C. coli* ont été retrouvés dans un même échantillon individuel de fèces porcines. Toujours selon la même méthode, jusqu'à 8 génotypes différents de *C. coli* ont été isolés chez le porc durant une période d'engraissement de 15 jours. Ceci implique qu'un site d'élevage, contrairement à ce qui est observé chez la volaille, peut héberger un grand nombre de génotypes de *Campylobacter*. En effet, les résultats de notre étude démontrent aussi qu'il y a presque autant de profils génétiques dans une même ferme et dans le temps que le nombre d'échantillons prélevés. Il aurait pu être intéressant de mesurer la diversité génétique selon les différents types de régions

d'élevage : naisseur-finisser versus finisseur seulement ou système de production en tout-plein-tout-vide versus en continue.

Cette variation du nombre de profils peut provenir du fait que la plupart des animaux arrivant en engraissement sont déjà porteurs de divers génotypes de *C. coli*, provenant de la mère (110). De plus, les porcs pourraient recueillir d'autres génotypes de *C. coli* provenant d'autres sources comme les autres animaux d'engraissement, les rongeurs ou le personnel travaillant la ferme. Également, il a été proposé que cette variation serait le résultat d'événements de recombinaisons génétiques à large échelle parmi les espèces de *C. coli* et *C. jejuni* (17). Il se pourrait aussi que ce phénomène soit le résultat d'échanges génétiques intra- ou inter-espèces entre les souches de *Campylobacter* puisque cette bactérie est naturellement compétente. Elle pourrait donc intégrer du matériel génétique provenant de son environnement. Cette diversité génétique pourrait être associée à la présence de régions hyper-variables pour les gènes responsables de la biosynthèse ou de la modification des composantes de surface, tel que démontré dans l'analyse du génome complet de *Campylobacter* (71). Il peut être supposé que cette propriété aurait un rôle à jouer comme mécanisme utilisé par la bactérie pour échapper au système immunitaire de l'hôte. Nous pouvons donc affirmer, suite à notre étude, qu'il est important de caractériser plus d'une colonie par échantillon dans des études épidémiologiques concernant *Campylobacter* chez l'espèce porcine.

6.2.3. Facteurs associés à la virulence

Afin de caractériser les bactéries du genre *Campylobacter* et de surmonter le problème de la diversité génétique qui pourrait être causée par l'instabilité du génome chez *Campylobacter*, il est recommandé d'utiliser une combinaison de méthodes de typage. L'utilisation d'une méthode phénotypique combinée à une méthode génotypique offre un bon potentiel de discrimination entre les isolats. Dans la présente étude, la caractérisation des facteurs de virulence associés à la production de

toxines complète l'analyse des isolats retrouvés chez le porc et aussi, nous permet d'obtenir des indications sur le potentiel de virulence de ces isolats.

La production d'entérotoxine n'a pas été observée dans la présente étude. Tel que rapporté dans l'article 1, sa production par *Campylobacter* est toujours controversée puisqu'il a été difficile de détecter son activité dans plusieurs études. De plus, des homologies au niveau génétique avec des gènes codant pour des toxines comme CT de *Vibrio cholerae* et LT d'*Escherichia coli* n'ont pas encore été observées (104). Parmi les méthodes de détection, deux techniques sont principalement utilisées jusqu'à présent soit l'ELISA GM₁, ciblant un récepteur cellulaire ganglioside GM₁, ou la culture de cellules CHO. Bien que la méthode ELISA soit plus sensible, un plus grand nombre des chercheurs qui ont observé la production d'une entérotoxine avaient utilisé la méthode des cellules CHO (104). Cette dernière technique a été utilisée dans la présente étude afin d'augmenter les possibilités de détection d'une activité reliée à la présence d'une entérotoxine. Toutefois, des études visant la détection d'une toxine potentielle à l'aide d'un modèle animal ou à partir d'une librairie de gènes d'expression permettront d'infirmier ou de confirmer la production d'une telle toxine chez *Campylobacter*.

Dans la présente étude, une activité hémolytique lors d'un essai d'hémolyse de contact en micro-plaque a été observée parmi 63% des isolats de *C. coli* d'origine porcine. Les titres d'activité hémolytique étaient en général assez faibles, soit environ 80% des isolats hémolytiques ayant un titre entre 1:2 et 1:4 ce qui laisse supposer que cette activité ne conférerait pas un potentiel de pathogénicité très élevé parmi ces isolats. En ce qui a trait à l'activité hémolytique de *C. coli*, il existe peu d'étude sur la prévalence de cette activité puisque *Campylobacter* est considéré comme non-hémolytique sur agar. Par contre, les résultats d'une étude avec *C. jejuni* ont démontré que 94% des isolats étaient hémolytiques (96). Cette activité hémolytique serait associée à la cellule et serait médiée par une phospholipase A. Les phospholipases sont associées à la lyse des érythrocytes chez plusieurs espèces

bactériennes et agiraient comme facteur de virulence en permettant l'accès au fer pour les bactéries. Présentement, chez *Campylobacter* les mécanismes de virulence ne sont pas totalement élucidés mais, l'utilisation de mutants dont la phospholipase A (PldA-) est non-fonctionnelle a permis de démontrer une diminution de l'activité hémolytique. Ceci laisse supposer que l'hémolyse pourrait être associée à la pathogénèse (26).

Actuellement, il n'y a pas de consensus en ce qui a trait à la production de toxines parmi les bactéries du genre *Campylobacter*. Les mécanismes d'action, l'importance clinique et leur classification demeurent vagues malgré le fait que la présence d'une activité cytotoxique soit rapportée parmi les *Campylobacter*. Un effet toxique sur les cellules CHO a été observé parmi 11% des isolats de *C. coli* de la présente étude. Encore une fois, le rôle de cette toxine dans la pathogénie n'est pas clairement établi. Les études rapportées dans la littérature varient énormément les unes des autres, principalement en ce qui a trait aux méthodologies utilisées. Les milieux et les conditions de cultures, les méthodes d'extraction, comme la sonication et l'extraction à la polymyxine B, et la grande variation des modèles de culture de cellules font en sorte que les résultats sont difficiles à comparer. Par le passé, les méthodes classiques de purification biochimique n'ont pas permis de produire des molécules en quantité et en pureté suffisante pour des analyses de fonction et de structure (104). Ainsi, la différenciation des activités est basée principalement sur les effets observés sur différentes lignées cellulaires. Dans la présente étude, le modèle sur cellules CHO a été choisi parce que ces cellules parviennent à détecter la plupart des effets cytotoxiques rapportés dans la littérature. Les effets observés sur les cellules CHO sont l'arrondissement, le détachement et la mort des cellules. Ces observations ne coïncident pas avec les effets provoqués par la toxine CDT, toxine la mieux caractérisée parmi les *Campylobacter*. Cette toxine provoque une distension des cellules qui progressent vers la mort cellulaire. Malgré le fait que la plupart des *Campylobacter* possèdent les gènes *cdt* responsables de la production de cette toxine, environ 40% des *C. jejuni* et *C. coli* produisent la toxine (81). Ceci explique le choix du modèle *in vitro* qui a été préféré à la détection des gènes par PCR. Ces effets

provoqués par la toxine CDT peuvent être observés sur les lignées cellulaires HeLa, CHO, Hep-2 et Vero bien que les cellules HeLa soient le plus fréquemment utilisées (79). Dans la présente étude, l'absence d'effet cytotoxique relié à la toxine CDT pourrait être relié à l'utilisation de la polymixine B dans le protocole pour lyser les bactéries. La polymixine B agit comme détergent en augmentant la perméabilité membranaire et en libérant des protéines solubles. Or, l'activité produite par la toxine CDT serait fortement associée avec les fractions membranaires des bactéries lysées et il n'existe pas de détection de cette toxine soluble dans le surnageant (79). De plus, la filtration des échantillons pourrait limiter l'observation des effets de cette toxine. Par contre, un effet cytotoxique sur cellules CHO a été observé dans cette étude, suggérant qu'il existe d'autres molécules ayant un effet sur la lignée cellulaire.

Un analogue de CDT, la CLRT, a été observé sur culture cellulaire avec les cellules CHO dans une étude similaire (88). Comme dans la présente étude, les chercheurs ont observé un arrondissement des cellules CHO en présence de certains sonicats bactériens. Dans certains cas, une combinaison de CDT et CLRT a également été observée parmi les souches de *Campylobacter* analysées. Cette activité serait observable sur cellules Vero ce qui pourrait s'apparenter à l'activité de la toxine Vero-active décrite par Wassenaar (104). En définitive, le nombre de toxines différentes retrouvées chez *Campylobacter* demeure indéterminé. Les faibles titres des ces toxines pourraient être le résultat d'une composante ou d'une combinaison de composantes, comme des protéines libérées lors de la sonication ou de la lyse cellulaire par la polymixine B, présentes dans la préparation. Une meilleure caractérisation au niveau protéique et génétique de même qu'avec un modèle animal pourra faire la lumière sur ce facteur potentiel de virulence.

6.3. Relation entre les isolats d'origine porcine et humaine

Afin d'évaluer si la présence de *Campylobacter* chez le porc représente un risque potentiel pour l'humain, il est nécessaire de caractériser l'exposition de celui-ci

aux *Campylobacter* d'origine porcine. À partir des résultats obtenus dans la première étape de cette étude, il a été établi que la plupart des porcs était porteur de *C. coli*, que plusieurs génotypes peuvent co-exister et que les isolats sont peu virulents en ce qui a trait à l'activité cytotoxique. De plus, 5 à 10% des cas de campylobactériose sont reliées à *C. coli* (59).

Il a été possible de récupérer les échantillons de matières fécales soumis au laboratoire médical pour fin d'analyse avec la collaboration du personnel du centre hospitalier. Par contre, aucune information sur l'âge, le sexe, l'historique de voyage ou la raison du prélèvement n'a pu être utilisée pour des raisons de confidentialité. Les échantillons ont été traités de la même façon que les échantillons d'origine porcine. La répartition observée chez l'humain des espèces de *Campylobacter* dans cette étude est en accord avec la littérature : 92% de *C. jejuni* et 8% de *C. coli*. Suite au génotypage, une grande diversité génétique a également été observée parmi ces échantillons (Article 1). Les isolats provenaient de cas cliniques de nature sporadique et non épidémique et ainsi, les sources de contamination pourraient être diversifiées. En ce qui a trait au potentiel toxique de ces souches, elles se sont avérées légèrement plus virulentes, surtout au niveau cytotoxique (Article 1). Les deux souches de *C. coli* n'étaient pas cytotoxiques alors que les souches cytotoxiques de *C. jejuni* démontraient des titres d'activité de 1 :16 et 1 :64. Il est rapporté que des isolats de *C. jejuni* provenant de la volaille ont des titres d'activité variant entre 1 :16 et 1 :128 pour 88% des isolats testés (60). Or, comme la volaille serait une source importante de *C. jejuni* transmissible à l'humain, cette différence au niveau des titres pourrait être expliquée par la source de contamination des isolats retrouvés chez l'humain.

Lorsque les génotypes des isolats d'origine humaine et porcine ont été comparés et reliés entre eux par la création d'un dendrogramme, deux regroupements distincts ont été observés soit un regroupement comprenant la majorité des isolats d'origine humaine et l'autre, la majorité des isolats d'origine porcine (Article 1). Les deux souches de *C. coli* d'origine humaine n'ont pas été reliées avec les isolats de *C.*

coli d'origine porcine. Ainsi, il a été impossible de démontrer un lien génétique entre les différents isolats de *Campylobacter* dans cette étude. Pourtant, un avantage de cette étude était qu'elle a été réalisée dans une région géographique limitée pour augmenter les chances d'observer des liens génétiques. De plus, cette approche s'est déjà avérée utile puisque des liens génétiques entre des souches provenant de la volaille et de l'humain ont été démontrés de la même façon (61). Même si le porc est porteur de *C. coli*, puisque que les bactéries présentes sont peu virulentes, du moins au niveau de la production de toxines, et puisque qu'aucun lien génétique entre les isolats n'a pu être observé dans cette étude, nous pouvons considérer que la consommation de la viande de porc comme facteur de risque pour la transmission de *C. coli* à l'humain, est limitée. On peut se demander toutefois si la diversité génétique observée entre les isolats et au sein d'un même animal n'est pas de nature à rendre plus difficile l'établissement d'un tel lien. Également, le personnel travaillant à la ferme ou à l'abattoir représente probablement une population plus à risque pour la campylobactériose par *C. coli*. Il a donc été considéré qu'une étude ciblant ces populations et mesurant d'autres facteurs de virulence comme l'adhésion et l'invasion et la recherche plus spécifique de la toxine CDT pourrait fournir d'autres données sur *C. coli*.

6.4. La résistance aux agents antimicrobiens chez *Campylobacter* d'origine porcine, aviaire et humaine

Puisque *C. coli* d'origine porcine ne semble pas représenter un risque important quant à une transmission directe pour la population humaine comme pathogène d'origine alimentaire mais qu'elle est très prévalente chez le porc, tout comme *C. jejuni* est fortement prévalent au niveau de la volaille, il devenait important de déterminer si ces espèces animales pouvaient représenter un réservoir de bactéries résistantes aux agents antimicrobiens. En effet, les modes de production des animaux de consommation au Québec favorisent l'utilisation de différents agents

antimicrobiens soit à titre de promoteurs de la croissance ou dans une perspective thérapeutique. De plus, il a été rapporté dans le passé que l'utilisation massive d'antimicrobiens exercerait une pression sélective sur les souches bactériennes résistantes qui pourraient par la suite être transmises à l'humain. Cette réalité a même conduit certains pays comme la Suède à retirer toute utilisation d'agents antimicrobiens comme promoteurs de croissance en production animale. Par contre, l'ampleur du phénomène de la transmission de résistances bactériennes des animaux à l'humain demeure difficile à quantifier. Plusieurs pays, dont le Canada, surveillent les niveaux de résistances chez les bactéries zoonotiques comme *Salmonella*, *E. coli* et *Campylobacter*. Afin d'évaluer si l'utilisation d'agents antimicrobiens conduit à des populations bactériennes résistantes, il apparut important d'identifier la nature de ce danger en mesurant et en caractérisant la résistance à différents agents antimicrobiens chez des *Campylobacter* d'origine porcine, aviaire et humaine.

6.4.1. Incidence de la résistance

Le premier objectif de ce volet était d'évaluer l'incidence et la distribution de la résistance aux antimicrobiens parmi les *Campylobacter* retrouvés chez le porc, la volaille et l'humain au Québec. Un des problèmes rencontrés lors du design de ce type d'études pour *Campylobacter*, que ce soit au niveau du génotypage, des mécanismes de virulence ou encore de l'antibiorésistance est le manque de standardisation des méthodes. Conséquemment, il y a beaucoup de variabilité dans les données de susceptibilité aux agents antimicrobiens rapportées dans la littérature. Dans la présente étude, la méthode de dilution en agar a été sélectionnée parce qu'elle permet d'évaluer la susceptibilité des isolats aux agents antimicrobiens en fonction de leur CMI et qu'elle constitue en ce moment la méthode de référence pour *Campylobacter*. Entre autres, les méthodes de diffusion comme le E-test peuvent être difficiles à interpréter puisque la lecture des plaques est variable et subjective (24). Il y a donc moins d'erreur d'interprétation en utilisant le paramètre de la croissance et de l'absence de croissance d'une bactérie avec la méthode de dilution en agar. Comme il

n'existe pas de valeur de référence pour *Campylobacter*, l'interprétation des résultats est basée sur les recommandations du NCCLS pour les bactéries à croissance aérobie. Dans la nouvelle version du cahier pour les bactéries aérobies isolées chez les animaux, une méthode standardisée pour *Campylobacter* est suggérée pour la première fois (62). La méthode de dilution en agar avec la souche *C. jejuni* ATCC 33560 comme contrôle de qualité y est proposée. Dans la présente étude, le choix des agents antimicrobiens a été fait en considérant l'utilité de retenir un représentant de chaque grande classe d'agents antimicrobiens tout en considérant également leur usage en médecine humaine et vétérinaire.

Il a été observé dans cette étude que pour la clindamycine, l'érythromycine, la streptomycine et la tétracycline, plus de 50% des isolats de *C. coli* d'origine porcine sont résistants (Article 2). Ces hauts niveaux de résistance pourraient être influencés par les régimes médicamenteux utilisés en production animale. La résistance aux macrolides clindamycine et érythromycine pourrait provenir de la pression sélective du tylosin, un facteur de croissance fréquemment utilisé en production porcine. La même explication pourrait justifier la forte résistance à la tétracycline puisqu'elle est fréquemment ajoutée dans la moulée pour les animaux au stade de l'engraissement à des doses sub-thérapeutiques. Bien que la streptomycine ne soit pas utilisée de façon aussi généralisée, bien que celle-ci et d'autres aminoglycosides soient encore utilisés, des niveaux similaires de résistance ont été rapportés dans le passé (1). Dans la littérature, parmi les isolats de *C. coli* d'origine porcine, la même tendance au niveau de la résistance aux agents antimicrobiens a été observée par rapport à d'autres pays (1, 100). Parmi les isolats à l'étude, des taux de résistance de 11.4% pour le ciprofloxacine et de 7.3% pour l'enrofloxacine ont été observés pour une autre classe d'antimicrobiens, les fluoroquinolones. Il est à noter que les fluoroquinolones ne sont pas utilisés de façon généralisée en production porcine au Québec. C'est un médicament qui est dispendieux et qui est utilisé principalement hors homologation pour traiter les problèmes de diarrhée chez les porcelets. Il y a peu d'étude sur la prévalence de cette résistance chez le porc puisque cet agent a surtout été utilisé en

production aviaire dans plusieurs pays européens tels les Pays-Bas et le Royaume-Uni (91). La présence de résistance à l'ampicilline (17.7%) et l'absence de résistance significative au chloramphénicol, à la gentamicine et au sulfaméthoxazole complète l'analyse du réservoir potentiel d'isolats de *C. coli* provenant du porc.

Chez la volaille, des isolats de *C. coli* et *C. jejuni* ont été retrouvés. Parmi la population de *C. coli*, le nombre d'isolats étudié était relativement faible pour tirer des conclusions (n=8). Par contre, 50% des isolats de la présente étude sont résistants à la streptomycine ou à la tétracycline et 12.5% sont résistants à l'ampicilline. Les valeurs de résistance associées à ces agents et rapportées dans la littérature peuvent varier. En effet, des résultats similaires ont été observés dans une étude menée en Belgique alors qu'au Danemark, aucune résistance significative pour ces agents n'a été observée (1, 100). Dans notre étude, parmi les isolats de *C. jejuni*, la résistance à la tétracycline est plus prévalente que les autres molécules avec 66.5% des isolats résistants, suivie par l'ampicilline (21.7%) et par l'érythromycine et la clindamycine (6.7%). Un faible taux de résistance aux fluoroquinolones dans la volaille a été observé, seulement 1.1% chez *C. jejuni*. Cet agent n'est homologué au Canada en production aviaire que pour le trempage des œufs. Dans certains pays européens, de même qu'aux États-Unis, l'apparition de résistances aux quinolones chez des bactéries d'origine humaine comme *Campylobacter* a été observée suite à l'introduction de ces agents en production animale, surtout au niveau de la volaille (91). Comme la viande de volaille serait un vecteur de transmission important de *C. jejuni* à l'humain, plusieurs de ces pays ont par la suite interdit l'utilisation des fluoroquinolones chez les animaux de consommation. Aux États-Unis, la Food and Drug Administration a proposé le retrait des fluoroquinolones en 1997. Cet agent était utilisé dans l'eau de boisson pour traiter les lots de poulets affectés par des infections à *E. coli*. À partir de données de surveillance, les Américains ont observé que 14% des produits de volaille analysés contenaient des isolats de *C. jejuni* résistants au ciprofloxacine. Il a été observé chez certaines de ces souches des profils génétiques

identiques à des souches ciprofloxacine-résistantes provenant des cas humains, ce qui suggère une association entre les souches (91).

En ce qui a trait aux *Campylobacter* d'origine humaine, des résistances à la clindamycine et l'érythromycine, aux fluoroquinolones et à la tétracycline ont été observées lors de cette étude. Ces agents représentent par ordre d'importance les drogues de choix pour le traitement de la campylobactériose. Ces résistances sont également fréquentes parmi les *Campylobacter* d'origine porcine ou aviaire de cette étude. La prise d'antibiotiques chez l'humain peut diminuer la durée de la période d'excrétion de *Campylobacter* et influencer les profils de résistance observés dans la présente étude.

6.4.2. Caractérisation des déterminants génétiques

Les isolats de *Campylobacter* provenant de différentes populations animales pourraient représenter un réservoir potentiel de bactéries résistantes et de déterminants de résistance transmissibles à l'humain. La résistance à la tétracycline a été observée parmi les isolats de *Campylobacter* provenant des trois populations à l'étude. De plus, la résistance aux fluoroquinolones a également été observée principalement parmi les isolats d'origine porcine et humaine. L'incidence de cette résistance est importante parmi plusieurs programmes de surveillance en santé publique à travers le monde. Le second objectif de ce volet consiste en la caractérisation de certains déterminants de la résistance. Ainsi, l'analyse génétique par la technique de PCR a été l'approche choisie pour la caractérisation de ce danger. Un des avantages d'amplifier par PCR des gènes particuliers est que les produits peuvent être récupérés et analysés de nouveau soit par séquençage, clonage ou par RFLP en plus de cibler des gènes d'intérêt. L'utilisation des sondes génétiques est également une autre méthode utilisée dans la littérature, mais elle se limite principalement à la détection des différents déterminants de résistance. Dans le même ordre d'idée, certains laboratoires, dans la mesure où la technologie et l'expertise sont

disponibles, développent des micro-puces à ADN permettant de détecter plusieurs déterminants de résistance à la fois sans pouvoir récupérer pour autant les produits détectés.

Selon la littérature, le gène responsable de la résistance à la tétracycline chez les *Campylobacter* est le gène *tetO*, principalement de nature plasmidique (99). L'ensemble des isolats de *Campylobacter* a été testé pour détecter ce gène. Dépendamment des amorces utilisées, les isolats classés résistants à la tétracycline par la méthode de dilutions en agar ne sont pas tous les isolats qui possèdent le gène *tetO*. En effet, chez 82.8% des isolats porcins et 70.2% des isolats aviaires de *Campylobacter* résistant, ce gène a été détecté par PCR. Il aurait été attendu que l'ensemble des isolats possède ce déterminant. Pour expliquer cette variation avec les résultats attendus, la détection de résistances à plusieurs autres agents aurait pu suggérer la présence de pompes à efflux. Ces pompes permettent l'expulsion de molécules, comme les antibiotiques, en fonction de leur poids moléculaire mais aussi selon le type de molécule ou la nature du substrat (83). Or ces isolats n'étaient pas résistants à d'autres agents, limitant ainsi la possibilité de la présence de ces pompes pour expliquer le phénotype observé. Par contre, en testant avec une autre paire d'amorces, l'ensemble des isolats résistants a pu être détecté. Cette observation démontre l'importance du bon design des amorces qui peut avoir une influence sur le niveau de détection moléculaire d'un gène. Dans une perspective épidémiologique, les deuxièmes amorces utilisées sont plus sensibles.

À l'opposé, certains isolats classés sensibles à la tétracycline par la méthode de dilution en agar possèdent le déterminant *tetO* mais ne semblent pas l'exprimer. Ainsi, 17.2% des isolats susceptibles provenant du porc et 4% des isolats susceptibles provenant de la volaille possèdent le déterminant. Une explication possible réside dans le fait qu'une séquence en amont du gène serait nécessaire à l'expression de la résistance et que celle-ci pourrait être manquante ou altérée parmi ces isolats (103). Il a également été rapporté qu'une mutation au niveau du gène *rspL*, gène codant pour

la protéine ribosomale S12 chez *E. coli*, diminuerait la résistance à la tétracycline médiée par TetO (97). Si la protéine altérée S12 est liée par TetO, ceci pourrait interférer dans le mécanisme d'action de TetO. D'autres analyses seraient à faire pour élucider ce phénomène.

Afin de vérifier si les séquences génétiques des déterminants *tetO* étaient toutes similaires, les produits PCR ont été digérés avec des enzymes de restriction soit *DraI*, *NdeI* et *MsiI*. Ces enzymes ont été choisies suite à l'analyse de la carte de restriction du gène *tetO* contenu dans Genbank®. Elles scindent les amplicons plusieurs fois, ce qui permet d'analyser les fragments. Ceux-ci sont variables en taille afin d'être séparables et observables sur gel d'agarose. Il s'est avéré que tous les amplicons avaient les mêmes profils de digestion. Ceci limite donc les possibilités de relier entre eux des déterminants d'origines différentes mais peut s'expliquer par le fait que le gène *tetO* est homologue à un gène associé à une fonction cellulaire, soit le facteur d'élongation impliqué dans la synthèse protéique, donc un gène conservé (99).

Pour ce qui est de la résistance aux fluoroquinolones, l'analyse a ciblé le gène de la gyrase A, principal déterminant de cette résistance chez *Campylobacter*. L'objectif était d'évaluer son incidence puisque ce déterminant n'est pas de nature transmissible étant donné qu'il est essentiellement de nature chromosomale. La transmission de résistances est assurée principalement par la pression sélective qu'exerce l'antimicrobien sur les isolats bactériens. Parmi les isolats de l'Article 2, chez 63.6% des isolats d'origine porcine résistants aux quinolones, la mutation au niveau du codon 86 de la région déterminant la résistance aux quinolones (quinolone resistance determining region, QRDR) du gène *gyrA* était présente. Cette mutation provoque la substitution d'une thréonine pour une isoleucine. La mutation était présente également chez les isolats de *C. coli* résistants d'origine humaine. Par contre, la mutation était absente parmi les isolats provenant de la volaille et était présente chez les *C. jejuni* d'origine humaine. Cette incidence grimpe à 95.3% parmi les isolats de l'Article 3. Une incidence de 83.1% de cette mutation parmi les

Campylobacter quinolone-resistant a été observé lors d'une étude similaire réalisée au Royaume-Uni (82). Comme cette mutation est fréquente, l'utilisation de la technique de MAMA-PCR décrite dans cette étude (Article 2) est une bonne alternative au séquençage pour la détection en laboratoire de cette substitution impliquée dans la résistance.

Il est important de déterminer, à cette étape, s'il y a un lien possible entre les isolats résistants de *Campylobacter* d'origine animale avec ceux d'origine humaine. Tout d'abord, en ce qui concerne la résistance à la tétracycline, une transmission d'isolats bactériens résistants à l'humain n'est pas exclue puisque les populations de bactéries colonisant le porc et la volaille sont fréquemment résistantes à cet agent. De plus, les isolats provenant de la volaille et utilisées dans cette étude ont déjà pu être reliés, par génotypage en utilisant le PFGE, à des isolats provenant d'épisodes de campylobactérioses (61). L'analyse des profils d'antibiorésistance observés parmi ces isolats indique des patrons identiques pour 3 associations sur 4 dont deux impliquent des isolats résistants à la tétracycline. Par contre, les isolats provenant de la volaille et de l'humain et reliés par PFGE ne sont pas résistants aux quinolones ce qui ne permet pas de confirmer un transfert de isolats résistantes aux quinolones entre population animale et humaine. L'incidence de la résistance aux quinolones est faible (1%) parmi les *C. jejuni* d'origine aviaire alors quelle est d'environ 9% pour les isolats de *C. jejuni* d'origine humaine au Québec. L'usage de quinolones en médecine humaine, à titre préventif lors de voyages à l'étranger par exemple, pourrait expliquer la résistance observée chez l'humain, minimisant ainsi la responsabilité d'un usage en médecine vétérinaire comme cause principale de l'augmentation des taux de résistance, malgré les évidences rapportées dans la littérature (91).

6.5. Distribution de *Campylobacter* résistants à la tétracycline ou aux quinolones parmi les élevages

Il nous semblait important de vérifier de façon plus approfondie quel est l'impact de l'usage d'agents antimicrobiens en médecine vétérinaire sur la sélection de bactéries résistantes à la tétracycline et aux quinolones. Cette problématique représente donc le dernier volet de cette étude. Dans l'évaluation du risque pour la santé humaine associé à l'incidence des bactéries résistantes dans les populations d'animaux de consommation, il s'avère nécessaire d'évaluer la situation à la source de la problématique, soit à la ferme. Les objectifs sont donc d'évaluer l'incidence des bactéries résistantes parmi les *Campylobacter* retrouvés à la ferme et de comparer les niveaux de résistance à la tétracycline ou aux quinolones des bactéries retrouvées dans des élevages utilisant ou non ces agents antimicrobiens.

Nous avons choisi de mettre l'accent sur la tétracycline, étant donné la forte incidence de bactéries résistantes et, en ce qui concerne les quinolones, le choix a été basé sur l'intérêt croissant pour cet agent en santé publique. L'industrie porcine a été ciblée puisque les niveaux de résistance aux quinolones étaient plus élevés que dans la volaille (7.3% versus 1.1%). De plus, il a été possible d'avoir accès aux registres pharmaco-thérapeutiques des fermes certifiées par le programme d'assurance qualité canadienne à la ferme (AQC™). Il a donc été possible de sélectionner des fermes n'utilisant aucun composé contenant de la tétracycline ou aucune injection d'enrofloxacin chez les porcelets. Par opposition, des fermes utilisant ces agents ont également été sélectionnées. L'échantillonnage des animaux a été limité à l'étape de l'engraissement. Comme ces animaux se dirigent vers l'abattage, il était possible d'obtenir le profil des souches bactériennes composant leur flore intestinale juste avant le processus de transformation. De plus, les élevages de type naisseur-finiisseur ont été privilégiés car il est plus facile d'avoir accès à l'historique des agents antimicrobiens administrés depuis la naissance jusqu'à l'engraissement. Un aspect original de cette étude réside dans l'échantillonnage du personnel en contact avec les

animaux. Il n'y a pas d'étude rapportée portant sur la prévalence de porteurs asymptomatiques chez l'humain dans les pays développés et sur le risque à la ferme de contracter une campylobactériose.

Parmi toutes les fermes échantillonnées (n=27), la présence de *C. coli* a uniquement été détectée. Comme des pools de matières fécales ont servi à l'isolement bactérien, il a été jugé utile d'isoler plus d'une colonie par gélose soit un maximum de trois. Il a été observé que lorsque qu'un parc contient des isolats de *C. coli* résistants à la tétracycline ou à l'enrofloxacin, les trois isolats sont résistants dans 61% et 71% des cas respectivement. Il peut en être conclu que la présence de bactéries résistantes n'est pas un phénomène isolé à l'intérieur des élevages porcins.

L'analyse des échantillons provenant du personnel travaillant dans ces mêmes fermes indique qu'il y a peu de porteur asymptomatique parmi ceux-ci. En effet, seulement un de ces échantillons sur 37 a donné un résultat positif pour la présence de *Campylobacter*. Par contre, cet isolat a été identifié comme étant *C. jejuni*. Comme on retrouve presque exclusivement du *C. coli* chez le porc, la contamination proviendrait vraisemblablement d'une autre source. Ce cas pourrait représenter un cas non-déclaré de campylobactériose, situation qui fait en sorte que l'on sous-estime la prévalence réelle de cette bactérie dans la population puisque, dans la plupart des cas, l'infection se résorbe d'elle-même chez un adulte en santé.

En ce qui a trait à une possible différence entre les fermes utilisant ou non un agent antimicrobien au niveau du taux de bactéries résistantes retrouvées, les données recueillies dans cette étude ne suggèrent pas que l'usage d'antimicrobien favorise de façon significative des populations bactériennes résistantes dans les fermes utilisant ces agents. Que ce soit pour la tétracycline ou pour l'enrofloxacin, aucune différence significative n'a été observée entre les élevages avec ou sans l'utilisation de ces agents antimicrobiens. Cette observation pourrait être expliquée par le fait que les fermes à l'étude utilisent d'autres agents antimicrobiens, tel que rapporté dans les

registres d'assurance-qualité, donc une pression sélective sur les bactéries par résistances croisées s'est peut-être déjà installée dans l'élevage. De plus, il n'est pas exclu que certains agents aient pu être utilisés dans le passé et que des bactéries résistantes auraient persistées dans l'environnement de production. L'information concernant l'usage à la ferme des composés antimicrobiens a été validée pour un an.

Afin de déterminer les causes de l'augmentation des niveaux de résistance bactériennes aux agents antimicrobiens observés en médecine humaine, l'usage de ces produits en médecine vétérinaire est souvent montré du doigt. En effet, depuis quelques années, une augmentation marquée de la résistance aux quinolones a été observées parmi les *Campylobacter* d'origine humaine. Une explication souvent avancée est la relation temporelle entre la licence d'utilisation des fluoroquinolones en production animale, surtout aviaire, et l'apparition subséquente de résistance en médecine humaine (91). Au Québec, la résistance est rare au niveau de la volaille et celle-ci constitue la principale source de transmission de *Campylobacter* à l'humain. L'usage ou non en production porcine ne semble pas avoir d'effet sur le nombre de bactéries résistantes, pour *C. coli* du moins. Il est donc peu probable que le taux de résistance de 10% observé chez l'humain puisse être associé à un usage en médecine vétérinaire. L'usage en médecine humaine reste toujours à évaluer. La démonstration de lien entre la transmission et l'origine de bactéries résistantes est un mécanisme complexe. Plusieurs paramètres peuvent influencer ces mécanismes de transmission : environnement, oiseaux, insectes, rongeurs, abattoir, animaux domestiques, moulée, etc. (49). Il ne faut donc pas considérer exclusivement un seul paramètre comme responsable de la transmission de résistances.

6.6. Prévention de la transmission des *Campylobacter* à l'humain

Basée sur la méthode de l'analyse du risque, la présente étude a permis d'évaluer le risque pour la santé publique que représente la présence de *Campylobacter* chez le porc avec la possible association de cette bactérie à des cas de campylobactériose. Il

s'est avéré que le risque de transmission est peu élevé en considérant la viande, c'est-à-dire les *Campylobacter* entériques susceptibles de contaminer les carcasses et éventuellement la viande, comme source d'exposition. Si l'on considère les producteurs en contact direct avec les animaux comme source d'exposition, ce risque est toujours peu élevé, du moins pour la période couvrant l'étude et avec le type d'échantillonnage utilisé. Seules les sources d'exposition indirecte, comme l'environnement, n'ont pas été évaluées dans cette étude étant donné leur diversité et leur complexité. Également, le risque pour la santé publique associé à la présence de résistance aux agents antimicrobiens parmi les isolats de *Campylobacter* d'origine animale et pouvant constituer un réservoir de déterminants de résistance est peu élevé, tel qu'observé à partir des données recueillies dans la présente étude. En ce qui a trait à l'impact de l'utilisation d'agents antimicrobiens sur la prévalence de résistances chez les bactéries, les données recueillies dans le présent échantillonnage des productions porcines utilisant ou non certains agents indiquent que la présence de résistance n'est pas exclusivement associée à l'usage des agents antimicrobiens.

Afin de limiter la propagation de ces microorganismes, certaines mesures doivent être prises par les différents intervenants pour éviter le développement de maladies. Par exemple, les producteurs de viande et de volaille doivent se conformer au système HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) qui assure des conditions optimales de salubrité lors de l'abattage, la transformation, le transport et l'entreposage des carcasses d'animaux. Le consommateur doit s'assurer de conserver au frais les viandes qu'il consomme de même que de la cuisson adéquate de celles-ci. Les pathogènes et leur transmission peuvent être limités à la ferme par de bonnes mesures d'hygiène et de biosécurité de la part des producteurs, assistés par les vétérinaires. De son côté, la communauté scientifique doit continuer l'analyse et l'étude épidémiologique de ces bactéries pour générer des données qui permettront éventuellement de mieux contrôler leur propagation.

7. CONCLUSIONS

Les données recueillies et leur analyse ont permis d'atteindre les objectifs visés dans ce projet. Nous voulions évaluer le risque pour l'humain que représente la présence de *Campylobacter* chez le porc, et pour ce faire, caractériser de façon génétique et phénotypique les isolats présents chez les animaux et l'humain. La distribution des résistances aux agents antimicrobiens parmi les populations de *Campylobacter* d'origine porcine, aviaire et humaine a été évaluée de même que la présence de certains déterminants génétiques associés à la résistance. Finalement l'impact de l'utilisation au Québec d'agents antimicrobiens en production porcine a été analysé. D'une façon plus particulière, voici les conclusions qui se démarquent suite à cette étude :

1. La présence de *Campylobacter* chez le porc n'est pas associé à un risque important de transmission de *Campylobacter* à l'humain.
2. Les animaux peuvent héberger plus d'une souche au niveau intestinal en accord avec la diversité génétique et phénotypique des *Campylobacter* d'origines porcine et humaine au Québec.
3. La résistance aux quinolones observée parmi les isolats de *Campylobacter* d'origine humaine n'est pas associé à l'usage vétérinaire des quinolones, du moins au cours de la période d'étude.
4. La présence de résistance aux agents antimicrobiens parmi les *Campylobacter* retrouvés chez les animaux en production porcine n'est pas exclusivement associée à l'usage des agents antimicrobiens sur la ferme.

Les données sur l'épidémiologie moléculaire de *Campylobacter* au Québec générées au cours de cette étude fournissent de l'information nouvelle qui permettra une meilleure gestion des risques associés à la présence de cet agent pathogène chez le

porc et rendra également possible une meilleure communication du risque, notamment par la dissémination de cette information à la population.

8. BIBLIOGRAPHIE

1. **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**(10):2244-50.
2. **Anonymous.** 2004. Maladies a declaration obligatoire en direct. Sante Canada.
3. **Anonymous.** 2004. Programme Integre Canadien de surveillance de la Resistance aux Antimicrobiens (PICRA). Sante Canada.
4. **Bager, F.** 2000. DANMAP: monitoring antimicrobial resistance in Denmark. *Int J Antimicrob Agents.* **14**(4):271-4.
5. **Baker, C. N.** 1992. The E-Test and *Campylobacter jejuni*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **15**(5):469-72.
6. **Bang, D. D., E. M. Nielsen, K. Knudsen, and M. Madsen.** 2003. A one-year study of campylobacter carriage by individual Danish broiler chickens as the basis for selection of *Campylobacter* spp. strains for a chicken infection model. *Epidemiol Infect.* **130**(2):323-33.
7. **Bourke, B., S. T. al Rashid, H. L. Bingham, and V. L. Chan.** 1996. Characterization of *Campylobacter upsaliensis fur* and its localization in a highly conserved region of the *Campylobacter* genome. *Gene.* **183**(1-2):219-24.
8. **Butzler, J. P., P. Dekeyser, M. Detrain, and F. Dehaen.** 1973. Related vibrio in stools. *J Pediatr.* **82**(3):493-5.
9. **Caldwell, M. B., P. Guerry, E. C. Lee, J. P. Burans, and R. I. Walker.** 1985. Reversible expression of flagella in *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun.* **50**(3):941-3.
10. **Chang, N., and D. E. Taylor.** 1990. Use of pulsed-field agarose gel electrophoresis to size genomes of *Campylobacter species* and to construct a *SaII* map of *Campylobacter jejuni* UA580. *J Bacteriol.* **172**(9):5211-7.

11. **Chopra, I., and M. Roberts.** 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* **65**(2):232-60.
12. **de Boer, P., B. Duim, A. Rigter, J. van Der Plas, W. F. Jacobs-Reitsma, and J. A. Wagenaar.** 2000. Computer-assisted analysis and epidemiological value of genotyping methods for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Clin Microbiol.* **38**(5):1940-6.
13. **De Melo, M. A., G. Gabbiani, and J. C. Pechere.** 1989. Cellular events and intracellular survival of *Campylobacter jejuni* during infection of HEp-2 cells. *Infect Immun.* **57**(7):2214-22.
14. **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**(1):14-23.
15. **Dorrell, N., J. A. Mangan, K. G. Laing, J. Hinds, D. Linton, H. Al-Ghusein, B. G. Barrell, J. Parkhill, N. G. Stoker, A. V. Karlyshev, P. D. Butcher, and B. W. Wren.** 2001. Whole genome comparison of *Campylobacter jejuni* human isolates using a low-cost microarray reveals extensive genetic diversity. *Genome Res.* **11**(10):1706-15.
16. **Drlica, K., and X. Zhao.** 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev.* **61**(3):377-92.
17. **Duim, B., T. M. Wassenaar, A. Rigter, and J. Wagenaar.** 1999. High-resolution genotyping of *Campylobacter* strains isolated from poultry and humans with amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Appl Environ Microbiol.* **65**(6):2369-75.
18. **Enright, M. C., and B. G. Spratt.** 1999. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.* **7**(12):482-7.
19. **Finlay, R. C., E.D. Mann, and J. L. Horning.** 1986. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* contamination in Manitoba swine carcasses. *Can Vet J.* **27**:185-187.

20. **Fitzgerald, C., R. J. Owen, and J. Stanley.** 1996. Comprehensive ribotyping scheme for heat-stable serotypes of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol.* **34(2):**265-9.
21. **Fitzgerald, C., K. Stanley, S. Andrew, and K. Jones.** 2001. Use of pulsed-field gel electrophoresis and flagellin gene typing in identifying clonal groups of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in farm and clinical environments. *Appl Environ Microbiol.* **67(4):**1429-36.
22. **Franco, D. A.** 1988. *Campylobacter* species: consideration for controlling a foodborne pathogen. *J Food Protect.* **51:**145-153.
23. **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(8):**2106-8.
24. **Ge, B., S. Bodeis, R. D. Walker, D. G. White, S. Zhao, P. F. McDermott, and J. Meng.** 2002. Comparison of the Etest and agar dilution for in vitro antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter*. *J Antimicrob Chemother.* **50(4):**487-94.
25. **Ge, B., D. G. White, P. F. McDermott, W. Girard, S. Zhao, S. Hubert, and J. Meng.** 2003. Antimicrobial-resistant *Campylobacter* species from retail raw meats. *Appl Environ Microbiol.* **69(5):**3005-7.
26. **Grant, K. A., I. U. Belandia, N. Dekker, P. T. Richardson, and S. F. Park.** 1997. Molecular characterization of *pldA*, the structural gene for a phospholipase A from *Campylobacter coli*, and its contribution to cell-associated hemolysis. *Infect Immun.* **65(4):**1172-80.
27. **Hanninen, M. L., P. Perko-Makela, H. Rautelin, B. Duim, and J. A. Wagenaar.** 2001. Genomic relatedness within five common Finnish *Campylobacter jejuni* pulsed-field gel electrophoresis genotypes studied by amplified fragment length polymorphism analysis, ribotyping, and serotyping. *Appl Environ Microbiol.* **67(4):**1581-6.
28. **Harris, L. A., S. M. Logan, P. Guerry, and T. J. Trust.** 1987. Antigenic variation of *Campylobacter* flagella. *J Bacteriol.* **169(11):**5066-71.

29. **Harvey, R. B., C. R. Young, R. L. Ziprin, M. E. Hume, K. J. Genovese, R. C. Anderson, R. E. Droleskey, L. H. Stanker, and D. J. Nisbet.** 1999. Prevalence of *Campylobacter* spp isolated from the intestinal tract of pigs raised in an integrated swine production system. *J Am Vet Med Assoc.* **215(11):1601-4.**
30. **Hassane, D. C., R. B. Lee, and C. L. Pickett.** 2003. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin promotes DNA repair responses in normal human cells. *Infect Immun.* **71(1):541-5.**
31. **Hu, L., and D. J. Kopecko.** 2000. Interactions of *Campylobacter* with eukaryotic 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 DC.
32. **Jacobs-Reitsma, W.** 2000. *Campylobacter* in the food supply, p. 467-481. *In* I. N. a. M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington DC.
33. **Jin, S., A. Joe, J. Lynett, E. K. Hani, P. Sherman, and V. L. Chan.** 2001. *JlpA*, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Mol Microbiol.* **39(5):1225-36.**
34. **Karlyshev, A. V., M. V. McCrossan, and B. W. Wren.** 2001. Demonstration of polysaccharide capsule in *Campylobacter jejuni* using electron microscopy. *Infect Immun.* **69(9):5921-4.**
35. **Ketley, J. M.** 1997. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology.* **143(Pt 1):5-21.**
36. **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(5):953-63.**
37. **Konkel, M. E., B. J. Kim, V. Rivera-Amill, and S. G. Garvis.** 1999. Identification of proteins required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Adv Exp Med Biol.* **473:215-24.**

38. **Kopecko, D. J., L. Hu, and K. J. Zaal.** 2001. *Campylobacter jejuni*--microtubule-dependent invasion. *Trends Microbiol.* **9(8):**389-96.
39. **Lachance, N., C. Gaudreau, F. Lamothe, and L. A. Lariviere.** 1991. Role of the beta-lactamase of *Campylobacter jejuni* in resistance to beta-lactam agents. *Antimicrob Agents Chemother.* **35(5):**813-8.
40. **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(7):**4358-65.
41. **Lin, J., L. O. Michel, and Q. Zhang.** 2002. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother.* **46(7):**2124-31.
42. **Lindstedt, B. A., E. Heir, T. Vardund, K. K. Melby, and G. Kapperud.** 2000. Comparative fingerprinting analysis of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* strains by amplified-fragment length polymorphism genotyping. *J Clin Microbiol.* **38(9):**3379-87.
43. **Lior, H., D. L. Woodward, J. A. Edgar, L. J. Laroche, and P. Gill.** 1982. Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *J Clin Microbiol.* **15(5):**761-8.
44. **Logan, J. M., A. Burnens, D. Linton, A. J. Lawson, and J. Stanley.** 2000. *Campylobacter lanienae* sp. nov., a new species isolated from workers in an abattoir. *Int J Syst Evol Microbiol.* **50 Pt 2:**865-72.
45. **Luber, P., E. Bartelt, E. Genschow, J. Wagner, and H. Hahn.** 2003. Comparison of broth microdilution, E Test, and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Clin Microbiol.* **41(3):**1062-8.
46. **Mafu, A. A., R. Higgins, M. Nadeau, and G. Cousineau.** 1989. The incidence of *Salmonella*, *Campylobacter*, and *Yersinia enterocolitica* in swine carcasses and the slaughterhouse environment. *Journal of Food Protection.* **52:**642-645.

47. **Manser, P. A., and R. W. Dalziel.** 1985. A survey of *Campylobacter* in animals. *J Hyg (Lond)*. **95**(1):15-21.
48. **Marano, N. N., S. Rossiter, K. Stamey, K. Joyce, T. J. Barrett, L. K. Tollefson, and F. J. Angulo.** 2000. The National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) for enteric bacteria, 1996-1999: surveillance for action. *J Am Vet Med Assoc*. **217**(12):1829-30.
49. **McEwen, S. A., and P. J. Fedorka-Cray.** 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin Infect Dis*. **34 Suppl 3**:S93-S106.
50. **Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, and R. V. Tauxe.** 1999. Food-related illness death in the United-States. *Emerging. Infect. Dis*. **5**(5):607-625.
51. **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**(7):667-9.
52. **Michaud, S., S. Menard, C. Gaudreau, and R. D. Arbeit.** 2001. Comparison of *SmaI*-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *KpnI*: a population-based study. *J Med Microbiol*. **50**(12):1075-81.
53. **Misawa, N., K. Hirayama, K. Itoh, and E. Takahashi.** 1995. Detection of alpha- and beta-hemolytic-like activity from *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol*. **33**(3):729-31.
54. **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**(Pt 1):153-65.
55. **Moore, J. E., J. Lanser, M. Heuzenroeder, R. M. Ratcliff, B. C. Millar, and R. H. Madden.** 2002. Molecular diversity of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* isolated from pigs at slaughter by *flaA*-RFLP analysis and ribotyping. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. **49**(8):388-93.
56. **Nachamkin, I.** 2002. Chronic effects of *Campylobacter* infection. *Microbes Infect*. **4**(4):399-403.

57. **Nachamkin, I., B. M. Allos, and T. Ho.** 1998. *Campylobacter* species and Guillain-Barre syndrome. *Clin Microbiol Rev.* **11**(3):555-67.
58. **Nachamkin, I., B. M. Allos, and T. W. Ho.** 2000. *Campylobacter jejuni* infection and the association with Guillain-Barré syndrome, p. 155-175. *In* I. N. a. M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington DC.
59. **Nachamkin, I., J. Engberg, and F. M. Aarestrup.** 2000. Diagnosis and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* species, p. 45-66. *In* I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington DC, USA.
60. **Nadeau, E., S. Messier, and S. Quessy.** 2003. Comparison of *Campylobacter* isolates from poultry and humans: association between in vitro virulence properties, biotypes, and pulsed-field gel electrophoresis clusters. *Appl Environ Microbiol.* **69**(10):6316-20.
61. **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**(1):73-8.
62. **NCCLS.** 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard - Second Edition M31-A2. NCCLS.
63. **Newell, D. G., J. A. Frost, B. Duim, J. A. Wagenaar, R. H. Madden, J. v. d. Plas, and S. L. W. On.** 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 DC.
64. **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**(6):2636-40.

65. **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**(10):3800-10.
66. **Nielsen, E. M., J. Engberg, and M. Madsen.** 1997. Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Danish patients, poultry, cattle and swine. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **19**(1):47-56.
67. **On, S. L.** 1996. Identification methods for campylobacters, helicobacters, and related organisms. *Clin Microbiol Rev.* **9**(3):405-22.
68. **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**(2):341-6.
69. **On, S. L., B. Bloch, B. Holmes, B. Hoste, and P. Vandamme.** 1995. *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *lawsonii* subsp. nov., isolated from the porcine stomach, and an emended description of *Campylobacter hyointestinalis*. *Int J Syst Bacteriol.* **45**(4):767-74.
70. **On, S. L., E. M. Nielsen, J. Engberg, and M. Madsen.** 1998. Validity of *SmaI*-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *SalI*, *KpnI*, and *BamHI* polymorphisms: evidence of identical clones infecting humans, poultry, and cattle. *Epidemiol Infect.* **120**(3):231-7.
71. **Parkhill, J., B. W. Wren, K. Mungall, J. M. Ketley, C. Churcher, D. Basham, T. Chillingworth, R. M. Davies, T. Feltwell, S. Holroyd, K. Jagels, A. V. Karlyshev, S. Moule, M. J. Pallen, C. W. Penn, M. A. Quail, M. A. Rajandream, K. M. Rutherford, A. H. van Vliet, S. Whitehead, and B. G. Barrell.** 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature.* **403**(6770):665-8.
72. **Pearce, R. A., F. M. Wallace, J. E. Call, R. L. Dudley, A. Oser, L. Yoder, J. J. Sheridan, and J. B. Luchansky.** 2003. Prevalence of *Campylobacter* within a swine slaughter and processing facility. *J Food Prot.* **66**(9):1550-6.

73. **Pearson, A. D., M. H. Greenwood, R. K. Feltham, T. D. Healing, J. Donaldson, D. M. Jones, and R. R. Colwell.** 1996. Microbial ecology of *Campylobacter jejuni* in a United Kingdom chicken supply chain: intermittent common source, vertical transmission, and amplification by flock propagation. *Appl Environ Microbiol.* **62**(12):4614-20.
74. **Pei, Z., C. Burucoa, B. Grignon, S. Baqar, X. Z. Huang, D. J. Kopecko, A. L. Bourgeois, J. L. Fauchere, and M. J. Blaser.** 1998. Mutation in the *peb1A* locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. *Infect Immun.* **66**(3):938-43.
75. **Penner, J. L., and J. N. Hennessy.** 1980. Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. *J Clin Microbiol.* **12**(6):732-7.
76. **Pesci, E. C., D. L. Cottle, and C. L. Pickett.** 1994. Genetic, enzymatic, and pathogenic studies of the iron superoxide dismutase of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun.* **62**(7):2687-94.
77. **Petersen, L., E. M. Nielsen, and S. L. On.** 2001. Serotype and genotype diversity and hatchery transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial poultry flocks. *Vet Microbiol.* **82**(2):141-54.
78. **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**(1):14-9.
79. **Pickett, C. L.** 2000. *Campylobacter* toxins and their role in pathogenesis, p. 179-190. *In* I. N. a. M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington DC.
80. **Pickett, C. L., T. Auffenberg, E. C. Pesci, V. L. Sheen, and S. S. Jusuf.** 1992. Iron acquisition and hemolysin production by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun.* **60**(9):3872-7.

81. **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* sp. *cdtB* gene. *Infect Immun.* **64**(6):2070-8.
82. **Piddock, L. J., V. Ricci, L. Pumbwe, M. J. Everett, and D. J. Griggs.** 2003. Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* species from man and animals: detection of mutations in topoisomerase genes. *J Antimicrob Chemother.* **51**(1):19-26.
83. **Poole, K.** 2001. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol.* **4**(5):500-8.
84. **Prats, G., B. Mirelis, T. Llovet, C. Munoz, E. Miro, and F. Navarro.** 2000. Antibiotic resistance trends in enteropathogenic bacteria isolated in 1985-1987 and 1995-1998 in Barcelona. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**(5):1140-5.
85. **Prescott, J. F., and D. L. Munroe.** 1982. *Campylobacter jejuni* enteritis in man and domestic animals. *J Am Vet Med Assoc.* **181**(12):1524-30.
86. **Savelkoul, P. H., H. J. Aarts, J. de Haas, L. Dijkshoorn, B. Duim, M. Otsen, J. L. Rademaker, L. Schouls, and J. A. Lenstra.** 1999. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *J Clin Microbiol.* **37**(10):3083-91.
87. **Schultheiss, P. C., H. J. Kurtz, and D. Glassman.** 1989. Retrospective study of *Campylobacter* species isolated from porcine diagnostic case material. *J Vet Diagn Invest.* **1**(2):181-2.
88. **Schulze, F., I. Hanel, and E. Borrmann.** 1998. Formation of cytotoxins by enteric *Campylobacter* in humans and animals. *Zentralbl Bakteriol.* **288**(2):225-36.
89. **Skirrow, M. B.** 1977. *Campylobacter* enteritis: a "new" disease. *Br Med J.* **2**(6078):9-11.
90. **Skirrow, M. B., and M. J. Blaser.** 2000. Clinical aspects of *Campylobacter* infection, p. 69-88. *In* I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington DC.

91. **Smith, K. E., J. B. Bender, and M. T. Osterholm.** 2000. Antimicrobial resistance in animals and relevance to human infections, p. 483-495. *In* I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington DC.
92. **Stanley, J., A. P. Burnens, D. Linton, S. L. On, M. Costas, and R. J. Owen.** 1992. *Campylobacter helveticus* sp. nov., a new thermophilic species from domestic animals: characterization, and cloning of a species-specific DNA probe. *J Gen Microbiol.* **138**(Pt 11):2293-303.
93. **Stanley, J., D. Linton, K. Sutherland, C. Jones, and R. J. Owen.** 1995. High-resolution genotyping of *Campylobacter coli* identifies clones of epidemiologic and evolutionary significance. *J Infect Dis.* **172**(4):1130-4.
94. **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**(7):2346-9.
95. **Swartz, M. N.** 2002. Human diseases caused by foodborne pathogens of animal origin. *Clin Infect Dis.* **34 Suppl 3**:S111-22.
96. **Tay, S. T., S. Devi, S. D. Puthuchear, and I. M. Kautner.** 1995. Detection of haemolytic activity of campylobacters by agarose haemolysis and microplate assay. *J Med Microbiol.* **42**(3):175-80.
97. **Taylor, D. E., C. A. Trieber, G. Trescher, and M. Bekkering.** 1998. Host mutations (*miaA* and *rpsL*) reduce tetracycline resistance mediated by Tet(O) and Tet(M). *Antimicrob Agents Chemother.* **42**(1):59-64.
98. **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**(9):2233-9.

99. **Trieber, C. A., and D. E. Taylor.** 2000. Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter*, p. 441-454. In I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington DC.
100. **Van Looveren, M., G. Daube, L. De Zutter, J. M. Dumont, C. Lammens, M. Wijdooghe, P. Vandamme, M. Jouret, M. Cornelis, and H. Goossens.** 2001. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* strains isolated from food animals in Belgium. *J Antimicrob Chemother.* **48(2):**235-40.
101. **van Vliet, A. H., V. M. Ketley, and S. F. Park.** 2002. The role of iron in *Campylobacter* gene regulation, metabolism and oxidative stress defense. *FEMS Microbiol Rev.* **26(2):**173-186.
102. **Vandamme, P., E. Falsen, R. Rossau, B. Hoste, P. Segers, R. Tytgat, and J. De Ley.** 1991. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol.* **41(1):**88-103.
103. **Wang, Y., and D. E. Taylor.** 1991. A DNA sequence upstream of the *tet(O)* gene is required for full expression of tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **35(10):**2020-5.
104. **Wassenaar, T. M.** 1997. Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clin Microbiol Rev.* **10(3):**466-76.
105. **Wassenaar, T. M., and M. J. Blaser.** 1999. Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. *Microbes Infect.* **1(12):**1023-33.
106. **Wassenaar, T. M., and W. Gaastra.** 2001. Bacterial virulence: can we draw the line? *FEMS Microbiol Lett.* **201(1):**1-7.
107. **Wassenaar, T. M., S. L. W. On, and R. J. Meinersmann.** 2000. Genotyping and the consequences of genetic instability, p. 369-380. In I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington DC.
108. **Weijtens, M. J., P. G. Bijker, J. Van der Plas, H. A. Urlings, and M. H. Biesheuvel.** 1993. Prevalence of campylobacter in pigs during fattening; an epidemiological study. *Vet Q.* **15(4):**138-43.

109. **Weijtens, M. J., R. D. Reinders, H. A. Urlings, and J. Van der Plas.** 1999. *Campylobacter* infections in fattening pigs; excretion pattern and genetic diversity. *J Appl Microbiol.* **86**(1):63-70.
110. **Weijtens, M. J., J. van der Plas, P. G. Bijker, H. A. Urlings, D. Koster, J. G. van Logtestijn, and J. H. Huis in't Veld.** 1997. The transmission of campylobacter in piggeries; an epidemiological study. *J Appl Microbiol.* **83**(6):693-8.
111. **Wesley, I. V., T. P. Sanderson, D. J. Larson, K. M. Harmon, J. J. Andrews, D. W. Miskimins, and D. H. Zeman.** 1997. Application of multiplex polymerase chain reaction for rapid identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* associated with reproductive failure. *Am J Vet Res.* **58**(10):1070-5.
112. **Whitehouse, C. A., P. B. Balbo, E. C. Pesci, D. L. Cottle, P. M. Mirabito, and C. L. Pickett.** 1998. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. *Infect Immun.* **66**(5):1934-40.
113. **Yao, R., D. H. Burr, P. Doig, T. J. Trust, H. Niu, and P. Guerry.** 1994. Isolation of motile and non-motile insertional mutants of *Campylobacter jejuni*: the role of motility in adherence and invasion of eukaryotic cells. *Mol Microbiol.* **14**(5):883-93.
114. **Young, C. R., R. Harvey, R. Anderson, D. Nisbet, and L. H. Stanker.** 2000. Enteric colonisation following natural exposure to *Campylobacter* in pigs. *Res Vet Sci.* **68**(1):75-8.
115. **Zhao, C., B. Ge, J. De Villena, R. Sudler, E. Yeh, S. Zhao, D. G. White, D. Wagner, and J. Meng.** 2001. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C., area. *Appl Environ Microbiol.* **67**(12):5431-6.