

Université de Montréal

***Campylobacter* dans différents environnements aquatiques : quantification et géotypage
afin de mieux évaluer les risques potentiels d'infection pour l'être humain**

par

Maxime Gosselin-Théberge

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

Mai, 2015

© Maxime Gosselin-Théberge, 2015

Résumé

Campylobacter est l'agent pathogène zoonotique responsable de la majorité des gastro-entérites d'origine bactérienne chez l'homme. Les produits de volaille représentent la principale source d'infection; toutefois, l'exposition peut également découler de contacts directs avec les animaux ou avec l'eau. Une forte variation saisonnière est présente dans les cas rapportés, qui n'est toujours pas élucidée : les eaux environnementales, sources d'infection connues, sont soupçonnées. Cette étude transversale a été réalisée dans la région Sud-Est du Québec (Canada) où *Campylobacter* fut quantifié et génotypé à partir de différentes sources d'eau (eaux de captage, récréatives et usées) et de cas cliniques afin d'évaluer les risques potentiels posé par l'eau environnementale. Différents essais PCR en temps réel furent appliqués à l'eau environnementale et comparés: 2 ont été sélectionnés pour leur spécificité et sensibilité de quantification. Les courbes standards ont été calibrées en utilisant la PCR digitale pour déterminer précisément les concentrations. Les isolats environnementaux et cliniques furent comparés génétiquement en utilisant le CGF (« comparative genomic fingerprinting »). Les eaux usées étaient plus contaminées que les eaux de captage et récréatives (3.9Log, 1.7Log et 1.0Log cellules/L en moyenne, respectivement). Six pour cent des isolats d'eaux environnementales étaient génétiquement similaires (100 % homologie) aux isolats cliniques. Les cas cliniques de campylobactériose d'été montraient des isolats avec davantage de similarités génétiques avec les isolats retrouvés dans l'eau environnementale comparativement aux autres saisons ($p < 0.01$). Les faibles concentrations et similarités génétiques entre les isolats d'eau et cliniques suggèrent un risque de transmission possible, mais faible.

Mots-clés : *Campylobacter*; Eaux environnementales; PCR en temps réel; PCR digitale; Comparaison d'empreintes génomiques; Épidémiologie moléculaire; Isolats environnementaux; Isolats cliniques.

Summary

Campylobacter is a zoonotic pathogen that is responsible for the majority of cases of bacterial gastroenteritis. Among the numerous *Campylobacter* transmission routes including direct contact, food and water, poultry consumption has been recognized as the major route. A strong seasonal variation in campylobacteriosis cases exists for reasons that are not well understood; environmental water is suspected to be involved. This cross-sectional study was conducted in the Southeastern region of Quebec (Canada), wherein *Campylobacter* from different waters (drinking water source, recreational and sewage) and clinical sources was quantified and genotyped in order to evaluate the potential risks posed by environmental water. Several real-time PCR assays were compared for specific application to environmental water: two were selected for their specificity and sensitivity of quantification. Standard curves were calibrated using digital PCR to accurately determine concentrations. *Campylobacter* isolates from clinical and water sources were genetically compared using CGF (comparative genomic fingerprinting). Sewage waters showed the highest *Campylobacter* concentrations, while drinking water source and recreational waters showed the lowest (average of 3.9Log, 1.7Log and 1.0Log cells/L, respectively). CGF revealed that 6% of water isolates were genetically similar (100% homology) to clinical isolates. Summer cases of campylobacteriosis revealed isolates showing more genetic similarities with environmental water isolates compared to other seasons ($p < 0.01$). The low *Campylobacter* concentrations and genetic similarities between water and clinical isolates from the same region, suggests that these environmental waters pose a real, but low risk of transmission.

Keywords: *Campylobacter*; Environment waters; Real-time PCR; Digital PCR; Comparative genomic fingerprinting; Molecular epidemiology; Environmental isolates; Clinical isolates.

Table des matières

Résumé.....	i
Summary.....	i
Table des matières.....	ii
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	x
Liste des sigles et abréviations.....	xii
Introduction.....	1
Objectifs.....	2
Recension des écrits.....	3
<i>Campylobacter</i> (général).....	3
Histoire et taxonomie.....	5
Physiologie (bactériologie).....	6
Pathogenèse.....	7
Maladie.....	11
Traitements chez les humains.....	13
Épidémiologie de <i>Campylobacter</i>	14
Incidence.....	14
Sous-déclaration des cas.....	15
Facteurs de variation du risque.....	16
Âge.....	16
Genre.....	16
Facteurs affectant la réponse immunitaire de l'hôte.....	17
Voyages à l'étranger, statut social et appartenance ethnique.....	18
Milieux ruraux et urbains.....	19
Saisonnalité.....	20
Facteurs météorologiques.....	21

Impact social et économique.....	22
Hôtes et réservoirs.....	23
Voies de transmission de la campylobactériose.....	25
Alimentaire	25
Contact direct avec des hôtes.....	26
Vecteurs environnementaux.....	27
Le rôle et l'importance de l'eau dans la transmission.....	28
Survie de <i>Campylobacter</i> dans l'eau environnementale.....	29
Fréquences et facteurs de variations de la contamination dans différentes sources d'eau environnementales	33
Eaux de captage et de surface	33
Eaux récréatives	34
Eaux usées.....	36
Eaux de puits.....	37
Eaux d'irrigation	37
Stratégies de désinfection	39
Eau potable.....	39
Aliments.....	40
Méthodes de détection et quantification	41
Concentration d'échantillons d'eau par filtration ou centrifugation.....	41
Milieux de culture	43
Nombre le plus probable (NPP).....	46
Méthodes de détection et quantification moléculaires.....	47
Réaction en chaîne par polymérase (PCR)	47
PCR en temps réel.....	49
Inhibiteurs de détection et quantification moléculaire.....	51
Limites de détection et quantification moléculaire.....	52
PCR digitale	53
Viabilité (qPCR)	54
Techniques de génotypage.....	55
Typage du gène <i>flaA</i>	56

Électrophorèse en champ pulsé.....	57
Typage génomique multilocus	59
Comparaisons génomiques utilisant les biopuces à ADN	60
CGF.....	61
Séquençage du génome entier.....	62
Sommaire de techniques génotypage présentées	65
Exposé et analyse des résultats	67
Comparative evaluation of different real-time PCR assays and standard curve optimisation for enhanced accuracy in quantification of <i>Campylobacter</i> in environmental waters.....	68
ABSTRACT.....	69
1. Introduction.....	70
2. Materials and Methods.....	71
2.1 QPCR Assay selection	71
2.2 In silico assay simulation	71
2.3 <i>Campylobacter</i> environmental water isolates and DNA preparation	72
2.4 Real-Time PCR.....	73
2.5 Digital PCR-based standard curve	74
2.6 Data analysis	74
2.6.1 The standardized ratio C _{qi} /C _{qref} determination.....	74
2.6.2 Real time PCR data analysis	75
2.6.3 Digital PCR standard curve application to real time PCR data and comparison to spectrophotometry-based standard curve.....	76
3. Results.....	77
3.1 Selection of <i>Campylobacter</i> qPCR assays.....	77
3.2 MIST results.....	78
3.3 Laboratory confirmation using environmental water isolates	78
3.4 Digital PCR standard curve calibration	80
4. Discussion.....	81
5. Conclusions.....	87
Acknowledgements.....	87

References.....	87
Tables.....	95
Figures.....	98
Supplementary material	102
Investigating <i>Campylobacter</i> in environmental waters as a potential source of human infection in Southern Quebec, Canada, using real-time PCR and genotyping.....	106
ABSTRACT.....	107
1. Introduction.....	108
2. Materials and methods	109
2.1 Water samples.....	109
2.1.1 Collection.....	109
2.1.2 Filtration.....	110
2.1.3 DNA extraction.....	110
2.1.4 <i>Campylobacter</i> culture isolation from water	111
2.2 Clinical isolates.....	112
2.2.1 Collection.....	112
2.2.2 <i>Campylobacter</i> culture isolation from stool	112
2.3 QPCR and PMAqPCR.....	113
2.4 Comparative genomic fingerprinting.....	114
2.5 Statistical analyses	115
3. Results.....	116
3.1 Frequency of detection and concentrations of <i>C. spp.</i> and <i>C. jejuni</i> in water	116
3.2 Species distribution among different sources	117
3.3 Genetic characterization.....	117
3.3.1 CGF cluster diversity	117
3.3.2 Genetic similarities between clinical and water isolates.....	118
3.3.3 Comparison of the clinical and water isolates with the Canadian CGF database for clinical association.....	118
3.3.4 Comparison of the clinical and water isolates with the Canadian CGF database for source associations	119
3.4 Characteristics of the campylobacteriosis cases	119

4. Discussion.....	120
4.1 <i>Campylobacter</i> presence in water.....	120
4.2 Genetic characterization and similarities between environmental water and clinical <i>Campylobacter</i> isolates.....	122
4.3 Epidemiology of <i>Campylobacter</i> based on a molecular approach.....	125
5. Conclusions.....	126
Acknowledgements.....	126
References.....	127
Tables.....	136
Figures.....	144
Discussion générale	149
Nouveauté et implications des résultats.....	150
Limites de l'étude	152
Directions futures.....	158
Conclusion	159
Sources documentaires.....	161
Appendices.....	xviii
Annexe 1. Carte des cas cliniques et des sites de collecte des eaux environnementales... xviii	

Liste des tableaux

Table I. Facteurs de virulence et de survie de <i>Campylobacter</i> impliqués dans la campylobactériose.....	9
Table II. BLAST analysis of hydrolysis probe-based qPCR assays targeting <i>Campylobacter</i>	95
Table III. Comparison of the sensitivity and specificity of <i>Campylobacter</i> detection using different qPCR assays on 61 environmental water isolates.....	96
Table IV. Comparison of the accuracy of quantification based on the standardized ratio C_{qi}/C_{qref} values for <i>C. jejuni</i> isolates that were not detected by one or more <i>C. jejuni</i> specific qPCR assays	97
Table V. Selected qPCR assays for MIST analysis and in-lab experimentation on environmental <i>Campylobacter</i> isolates.....	103
Table VI. Water sample-related information over the 4 years of the study including: sample source, number of sampling sites, frequency of sampling and analyses performed.....	137
Table VII. Percentage of <i>Campylobacter</i> detection in three different environmental water sources using culture isolation and qPCR targeting <i>C. spp.</i> and <i>C. jejuni</i>	138
Table VIII. <i>Campylobacter</i> viability estimation based on total (qPCR) and viable (PMAqPCR) DNA percentage of detection targeting <i>C. spp.</i> and <i>C. jejuni</i> in three different environmental water sources.....	139
Table IX. Percentage of <i>Campylobacter</i> species identified from culture-positive clinical samples and water sources.....	140

Table X. Percentage of *C. jejuni* and *C. coli* water isolates with genetic similarity to clinical isolates gathered in this study. 141

Table XI. Percentage of *C. jejuni* and *C. coli* isolates gathered in this study with genotypes that were not reported in the Canadian CGF database or that were reported from clinical isolates in the database..... 142

Table XII. Characterisation of clinical cases and percentage of water-related isolates from the same region. 143

Liste des figures

- Figure 1.** Microbial *in silico* typing (MIST) performance simulation of 9 *Campylobacter* specific qPCR assays against 211 genomes of *C. jejuni* (black bars, n=183) and *C. coli* (gray bars, n=28). 98
- Figure 2.** The standardized ratio C_{qi}/C_{qref} (SR C_{qi}/C_{qref}) distribution of 61 environmental water isolates of *Campylobacter* was determined for each of the 3 *C. spp.* and 6 *C. jejuni* qPCR assays..... 100
- Figure 3.** *Campylobacter* standard curves generated using the Josefsen qPCR assay targeting *C. spp.* (A) and Best qPCR assay targeting *C. jejuni* (B) using spectroscopy (solid line) and digital PCR (dotted line)-based DNA calibration. 101
- Figure 4.** Gate clustering of fluorescence amplification in dPCR using the Josefsen *C. spp.* primers/probe. 104
- Figure 5.** Gate clustering of fluorescence amplification in dPCR using the Best *C. jejuni* primers/probe. 145
- Figure 6.** QPCR concentration ranges for *C. spp.* and *C. jejuni* in the three water sources: recreational water (RW) (n=415), drinking water source water (DWSW) (n=96) and sewage water (SW) (n=13). 145
- Figure 7.** Dendrogram depicting the presence/absence of 40 genes according to CGF genotyping binary results of the 191 *C. jejuni* and *C. coli* (“cc”) isolates from clinical (red), recreational water (RW; blue), drinking water source water (DWSW; green) and sewage water (SW; grey) samples collected in this study. 146

Figure 8. Rarefaction curves showing and comparing genetic diversity among *C. jejuni* and *C. coli* isolated from three different water sources (recreational, drinking water source water and sewage) and clinical samples, based on CGF typing at the 90% homology level..... 147

Figure 9. CGF database host sources of the *C. jejuni* and *C. coli* genotypes corresponding to isolates obtained in Southern Quebec, similar at the 100% homology level..... 145

Figure 10. Représentation des cas de campylobactérioses et des sites de collecte des différentes sources d'eau par municipalité dans la région sud-est du Québec. xviii

Liste des sigles et abréviations

°	Degré
°C	Degré Celsius
µl	Microlitre
µm	Micromètre
µM	Micromolaire
AB	Alberta
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ASPC	Agence de la santé publique du Canada
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AVCI	Années de vie corrigées de l'incapacité
BHQ ₂	<i>Black Hole Quencher Dye</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Paire de bases (<i>base pair</i>)
BSA	Albumine de sérum bovin (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Cytosine
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>C. concisus</i>	<i>Campylobacter concisus</i>
<i>C. curvus</i>	<i>Campylobacter curvus</i>
<i>C. fetus</i>	<i>Campylobacter fetus</i>
<i>C. gracilis</i>	<i>Campylobacter gracilis</i>
<i>C. hominis</i>	<i>Campylobacter hominis</i>
<i>C. hyointestinalis</i>	<i>Campylobacter hyointestinalis</i>
<i>C. insulaenigrae</i>	<i>Campylobacter insulaenigrae</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>C. lanienae</i>	<i>Campylobacter lanienae</i>
<i>C. lari</i>	<i>Campylobacter lari</i>
<i>C. mucosalis</i>	<i>Campylobacter mucosalis</i>

<i>C. rectus</i>	<i>Campylobacter rectus</i>
<i>C. showae</i>	<i>Campylobacter showae</i>
<i>C. spp.</i>	<i>Campylobacter spp.</i>
<i>C. sputorum</i>	<i>Campylobacter sputorum</i>
<i>C. upsaliensis</i>	<i>Campylobacter upsaliensis</i>
<i>C. ureolyticus</i>	<i>Campylobacter ureolyticus</i>
<i>C. volucris</i>	<i>Campylobacter volucris</i>
CA	Californie (<i>California</i>)
CC	<i>Clonal complex</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CÉGEP	Collège d'enseignement général et professionnel
CEPCM	Centre européen de prévention et contrôle des maladies
CFU	<i>Colony-forming unit</i>
CGF	<i>Comparative genomic fingerprinting</i>
cm	Centimètre
CO ₂	Dioxyde de carbone
Cq	Cycle de quantification (<i>quantification cycle</i>)
CSSS	Centre de santé et des services sociaux
CSSSC	<i>The Campylobacter Sentinel Surveillance Scheme Collaborators</i>
<i>D. sertularia</i>	<i>Dinobryon sertularia</i>
DMIQE	<i>Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Mélange des quatre désoxyribonucléotides (<i>deoxy- nucleotide triphosphates</i>)
DPCR	PCR digitale (<i>digital PCR</i>)
DWSW	Eau de captage (<i>drinking water source water</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eff.	Efficacité d'amplification (<i>efficiency</i>)
EMA	Ethidium monoazide

et al.	et collaborateurs (<i>and others</i>)
F	femelle (<i>female</i>)
FAM	5' FAM reporter dye : 6-carboxyfluorescein
FoodNet	Foodborne Diseases Active Surveillance Network (USA)
FoodNet Canada	Foodborne Diseases Active Surveillance Network (Canada)
FSA	Food Standards Agency
G	Guanine
hr	heure (<i>hour</i>)
HRM	Courbes de fusion à haute résolution (<i>high resolution melt</i>)
ID	Idaho
ISO	Organisation internationale de normalisation (<i>International Organization for Standardization</i>)
ITS	Région intergénique transcrite (<i>Internal transcribed spacer</i>)
IUT	Institut universitaire de technologie
kGy	Kilogray
km	Kilomètre
L	Litre
<i>L. salivarius</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
LFZ	Laboratory for Foodborne Zoonoses
LOD	Limite de détection (<i>Limite of detection</i>)
log	Logarithme de base 10
LOS	Lipooligosaccharide
M	mâle (<i>male</i>)
m ²	Mètre carré
MA	Massachusetts
Mal-ED	<i>The Malnutrition and Enteric Disease Network</i>
Mb	Mégabase
mCCDA	<i>Charcol Cefoperazone Deoxycholate Modified Agar</i>
MDDELCC	Ministère du Développement durable, de l'Environnement et Lutte contre les changements climatiques

MGB	<i>Minor groove binder</i>
MH	Müller-Hinton
MIQE	<i>Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments</i>
MIST	<i>Microbial in silico typing</i>
ml	Millilitre
MLST	Typage de séquences multi-locus (<i>multi-locus sequence typing</i>)
mm	Millimètre
MO	Missouri
mol	Moles
MPa	Mégapascal
MPN	Nombre le plus probable (<i>most probable number</i>)
N ₂	Diazote
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
ng	nanogramme
nm	Nanomètre
No.	Nombre de (<i>number of</i>)
NPP	Nombre le plus probable
NTC	<i>no template control</i>
NY	New York
O ₂	Dioxygène
OD	Densité optique (<i>optic density</i>)
OMS	Organisation mondiale de la santé
ON	Ontario
p	valeur p (<i>p-value</i>)
PCR	Réaction en chaîne par polymérase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFGE	Électrophorèse sur gel en champs pulsé (<i>pulse-field gel electrophoresis</i>)
pH	Potentiel hydrogène

PHAC	<i>Public Health Agency of Canada</i>
PI	Indice de performance (<i>performance index</i>)
PMA	Propidium monoazide
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
PW1	Solution #1 de la trousse PowerWater
PW6	Solution #6 de la trousse PowerWater
QC	Québec
QPCR	PCR quantitatif ou PCR en temps réel
r^2	Coefficient de détermination (<i>Coefficient of determination</i>)
RDML	<i>Real-Time PCR Data Markup Language</i>
RFLP	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (<i>restriction fragment length polymorphism</i>)
rMLST	<i>Ribosomal Multilocus Sequence Typing</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rRNA	<i>Ribosomal RNA</i>
RT	Transcriptase inverse (<i>reverse transcriptase</i>)
RW	Eau récréative (<i>recreational water</i>)
SC	Courbe standard (<i>standard curve</i>)
sec	seconde (<i>second</i>)
SGB	Le syndrome de Guillain-Barré
SIDA	Le syndrome d'immunodéficience acquise
sous-esp.	Sous-espèce
ST	<i>Sequence type</i>
STP	Usine de traitement des eaux usées (<i>sewage treatment plant</i>)
SVR	<i>Short Variable Region</i>
SW	Eau usée (<i>sewage water</i>)
TDC	<i>Total droplets count</i>
TSP	Trisodium triphosphate
U	Unité d'activité enzymatique
UFC	Unité formant une colonie

UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
USA	<i>United States of America</i>
USEPA	<i>US Environmental Protection Agency</i>
UT	Utah
UV	Rayonnement ultraviolet
<i>V. jejuni</i>	<i>Vibrio jejuni</i>
VBNC	Viable non cultivable (<i>viable but nonculturable</i>)
VIC	<i>VIC 5' reporter dye</i>
W	Watt
WTP	Usine de traitement de l'eau potable (<i>water treatment plant</i>)
ZEN	<i>ZEN Double-Quenched Probe</i>

Introduction

Les maladies endémiques requièrent une certaine attention afin de protéger la population. Des études sur l'incidence et la transmission de ces différentes maladies dictent les prises de décisions et l'élaboration de politiques en matière de santé publique. De plus, différents facteurs populationnels et d'expositions vont influencer le fardeau généré par ces maladies. Parmi les maladies endémiques, la campylobactériose représente une importante cause de gastro-entérites engendrant des coûts considérables dans les pays développés. L'agent étiologique de cette maladie, *Campylobacter*, est une bactérie pouvant infecter et persister dans différentes hôtes animaux et est fréquemment retrouvée dans l'environnement, rendant l'identification de ses différentes routes de transmission complexes. La nature délicate de ce microorganisme fait en sorte que la réalisation d'études fondamentales ou épidémiologiques est difficile et exigeante. Dans ce projet de maîtrise, l'interface humain-eau environnementale a été étudiée dans un espace géographique et temporel bien délimité.

Plusieurs outils de détection et de quantification de *Campylobacter* ont été décrits par le passé, qui sont majoritairement séparés en deux catégories : 1) les techniques utilisant les milieux d'enrichissement et de culture spécifiques afin de promouvoir la croissance d'isolats de *Campylobacter* à partir de différentes matrices, et 2) les techniques moléculaires ciblant directement des composantes moléculaires spécifiques à *Campylobacter*. De nouvelles technologies de détection et quantification en émergence sont plus performantes en ce qui a trait à la sensibilité et spécificité de détection ainsi qu'à la précision de quantification. Elles sont plus en plus accessibles pour les laboratoires de diagnostics et surveillances; elles pourraient redéfinir certains protocoles considérés comme standards pour les investigations concernant *Campylobacter*. D'autres outils nous permettent de caractériser phénotypiquement et génétiquement des souches de *Campylobacter* et s'avèrent intéressants lorsqu'on tente d'investiguer des possibles liens épidémiologiques entre différents isolats provenant de différentes sources. L'adoption d'une bonne démarche scientifique lors de l'optimisation et du développement des techniques de détection, quantification et génotypage pour des applications spécifiques est importante pour la validité des résultats.

Objectifs

Ce projet de maîtrise visait à optimiser puis à appliquer différentes techniques de détection, quantification et génotypage afin d'évaluer spécifiquement les risques potentiels posés par différentes sources d'eaux environnementales dans la transmission de la campylobactériose aux humains dans la région sud-est du Québec. Les objectifs spécifiques étaient de :

- Évaluer différents essais PCR en temps réel ciblant *Campylobacter* dans le but d'optimiser l'application de cette technique pour l'eau environnementale en termes de sensibilité et spécificité de quantification, et utiliser les nouvelles technologies émergentes de PCR digitale afin d'augmenter la précision de quantification.
- Quantifier par PCR en temps réel les concentrations de *Campylobacter* et utiliser cette dernière technique en combinaison avec le propidium monoazide (PMAqPCR) afin de décrire sa viabilité dans différentes sources d'eaux environnementales.
- Comparer les empreintes génomiques (CGF) des isolats de *Campylobacter* provenant de différentes sources d'eaux environnementales avec des isolats cliniques provenant de la même région afin d'investiguer la possibilité de liens génétiques entre les isolats.
- Comparer les génotypes des isolats provenant d'eaux environnementales collectés dans cette étude avec ceux de la banque de données canadienne CGF afin d'identifier ceux déjà répertoriés lors de cas cliniques et de décrire des sources de contamination potentiellement possible.

Recension des écrits

Cette revue de la littérature décrit l'importance de *Campylobacter* comme agent causal de gastro-entérite bactérienne aiguë et l'épidémiologie de la campylobactériose avec une attention particulière portée à l'eau environnementale comme route de transmission de la maladie. Un volet méthodologique important de la revue décrit différentes techniques de détection, quantification et de caractérisation génétique de *Campylobacter* applicables lors d'investigations dans les eaux environnementales.

***Campylobacter* (général)**

Campylobacter est un genre bactérien dont certaines espèces, majoritairement *Campylobacter jejuni*, causent des gastro-entérites chez les humains. Une infection par ce microorganisme provoque de sévères crampes abdominales et des diarrhées aiguës. Dans de rares cas, des complications comme l'arthrite ou l'apparition de maladies auto-immunes telles que le symptôme de Guillain-Barré peuvent avoir lieu (Keithlin et al., 2014). Cet agent pathogène zoonotique cause des infections qui seraient principalement dues à un manque d'hygiène et une mauvaise salubrité entourant la manipulation des viandes, souvent reliée à une contamination croisée des aliments. En effet, les animaux de la ferme comme les poulets, les porcs, les dindes, les vaches ou encore les moutons peuvent être porteurs asymptomatiques de populations importantes de *Campylobacter* dans leur tractus intestinal. Suite aux processus d'abattage, les poulets et les dindons en particulier pourront présenter des concentrations importantes de *Campylobacter* sur leur carcasse (Bily et al., 2010; Chokboonmongkol et al., 2013; Hansson et al., 2015) tandis que cette contamination est moins importante sur les carcasses des autres animaux (Abley et al., 2012; Bohaychuk et al., 2011) étant donné les différents processus d'abattage et de refroidissement des carcasses. Les animaux de la ferme ne sont pas contaminés à leur naissance; ils se contaminent dans l'environnement de la ferme ou lors d'un contact avec d'autres animaux porteurs.

Campylobacter représente un fardeau important en santé publique en ce qui a trait aux infections d'origine alimentaire et engendrerait des coûts importants (Sheerin et al., 2014). Les organisations de santé publique, surtout dans les pays développés, mettent en place des systèmes de surveillance permettant d'estimer le risque d'infection. Parallèlement, de bonnes pratiques sont instaurées au niveau des fermes, des industries agroalimentaires (Muellner et al., 2013; Umaraw et al., 2015) et dans la vente au détail (Stern et al., 2003) afin de limiter les contaminations de *Campylobacter* dans les aliments. Dans un monde idéal, les mesures mises en place pour réduire une telle contamination dépendraient de la connaissance détaillée des niveaux et sources de contamination de ce microorganisme, des différentes conditions environnementales favorisant une infection, des facteurs de virulence et des conditions affectant leur expression. Grâce aux avancées en génomique, le génome de *Campylobacter* est de plus en plus étudié et plusieurs séquences génomiques entières sont disponibles dans le domaine public. Ces analyses génomiques révèlent que *Campylobacter* possède un petit génome avec peu de systèmes de régulation connus chez d'autres bactéries. Malgré le fait que *Campylobacter* est de plus en plus étudié par la communauté scientifique, il reste un pathogène mystérieux : on se demande entre autres pourquoi le taux d'incidence des infections à *Campylobacter* présente des tendances saisonnières et comment ce pathogène, de nature fragile, peut survivre et se transmettre dans l'environnement. D'autres sources de contamination moins souvent rapportées dans la littérature scientifique, comme le contact avec des animaux domestiques ou encore avec l'eau environnementale, pourraient aider à répondre à cette question d'intérêt en santé publique. Même si *Campylobacter* est un microorganisme microaérophile ayant une croissance optimale à de hautes températures, il est connu pour sa capacité à survivre de longues périodes dans l'environnement et plus particulièrement dans l'eau (Cools et al., 2003) où certaines souches pourraient survivre jusqu'à 64 jours. Cette survie est souvent caractérisée par un état viable non cultivable qu'adopte *Campylobacter*, ce qui pourrait expliquer pourquoi sa présence dans l'eau environnementale ainsi que l'implication de l'eau dans sa transmission sont moins rapportés. L'eau environnementale contaminée à *Campylobacter* pourrait avoir un impact direct sur les infections humaines, ou encore indirect en étant une source d'infection pour les animaux de la ferme.

Histoire et taxonomie

Il est bien rapporté de nos jours que *Campylobacter* est l'une des principales causes de toxoinfection alimentaire dans les pays industrialisés, mais historiquement, *Campylobacter* était associé à des problèmes de santé chez les animaux. Les premiers cas d'infection par *Campylobacter* chez les humains ont été observés et décrits par Escherichia à partir d'échantillons de selles diarrhéiques d'enfants en 1886 en Allemagne. Le premier isolement en culture fut fait en 1913 par McFadyean et Stockman (Skirrow, 2006). Dans les années 1950, des bactéries spiralées appelées vibrions étaient souvent identifiées et associées à des problèmes d'avortement et des épisodes de diarrhée chez les ovins et les bovins. Le caractère microaérophilique de ces bactéries les distinguait des autres vibrions; on a donc donné le nom de *Vibrio fetus* à celles isolées des avortements et *Vibrio jejuni* et *Vibrio coli* à celles isolées des selles. La première mention de l'implication de ces bactéries dans une maladie d'origine alimentaire fut par Levy (1946) lors d'une épidémie de gastro-entérite dans une prison de l'Illinois aux États-Unis. *V. jejuni* a été retrouvé dans les selles de 20 % des patients, ainsi que dans le lait distribué aux prisonniers.

Grâce aux nouvelles technologies d'analyse d'ADN, les vibrions microaérophiles faisant partie du genre *Vibrio* furent déplacés par Sebald et Veron (1963) dans un nouveau genre : *Campylobacter* (de l'étiologie grecque *kampulos* = recourbé, *bacter* = bâtonnet). Depuis, les nouvelles avancées en taxonomie ont permis de mettre en place une classification pour les bactéries du genre *Campylobacter* en créant la famille des *Campylobacteraceae* avec *Arcobacter* et *Sulfurospirillum*. La famille des *Campylobacteraceae* fait partie de l'ordre des *Campylobacterales* (comportant aussi les familles *Helicobacteracea* et *Hydrogenimonadacea*). Aujourd'hui, le genre *Campylobacter* comporte 23 espèces (Sebald et Veron, 1963; Vandamme et al., 2010) retrouvées dans différents habitats allant de la cavité buccale de l'homme (*C. concisus*, *C. curvus* et *C. showae*) à la cavité du prépuce des bœufs (*C. fetus* sous-esp. *venerealis*) ou encore aux tubes digestifs des animaux à sang chaud (*C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*). *C. coli* (Gurtler et al., 2005), *C. concisus* (Kirk et al., 2015), *C. curvus* (Wetsch et al., 2006), *C. fetus* (Cypierre et al., 2014), *C. gracilis* (de Vries et al., 2008), *C. hominis* (Linscott et al., 2005), *C. insulaenigrae* (Chua et al., 2007), *C. jejuni* (Dasti

et al., 2010), *C. lari* (Morishita et al., 2013), *C. mucosalis* (Soderstrom et al., 1991), *C. rectus* (Leo et Bolger, 2014), *C. showae* (Suzuki et al., 2013), *C. sputorum* (Tee et al., 1988), *C. upsaliensis* (Man, 2011), *C. ureolyticus* (Bullman et al., 2013) et *C. volucris* (Kweon et al., 2015) sont les espèces de *Campylobacter* reconnues pour être pathogènes chez les humains.

En microbiologie clinique, les *Campylobacter* sont séparés en deux groupes (I et II). Seulement le groupe I, aussi appelé le groupe des « vrais *Campylobacter* », comporte les espèces d'intérêt médical. Le groupe I peut se diviser en deux différents sous-groupes : les sous-groupes IA et IB. Le sous-groupe IA a la particularité de pouvoir croître à 42°C et de causer des entérites chez l'être humain, tandis que le sous-groupe IB comprend les *Campylobacter* commensaux ou pathogènes pour les animaux, qui sont rarement responsables d'infection humaine. Les *Campylobacter* thermophiles et entéropathogènes (sous-groupe IA) comprend *C. jejuni* sous-esp. *jejuni*, *C. jejuni* sous-esp. *doylei*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* et le sous-groupe IB (appelé aussi « les autres vrais *Campylobacter* ») comprennent *C. fetus* sous-esp. *fetus*, *C. fetus* sous-esp. *veneralis*, *C. hyointestinalis*, *C. sputorum* biovar *sputorum*, *C. sputorum* biovar *bubulus* et *C. sputorum* biovar *fecalis* (Couture, 1997).

Physiologie (bactériologie)

Campylobacter est un bacille Gram négatif ayant une forme particulière spiralée au microscope. La structure fine et recourbée de *Campylobacter* mesure entre 1µm et 8µm de diamètre (Couture, 1997). Cette structure ainsi que la présence d'un flagelle à l'une des deux extrémités polaires confèrent à *Campylobacter* une forte mobilité, qui est d'ailleurs un excellent indice au microscope lors de l'identification (Couture, 1997). Ces bactéries peuvent adopter une forme plus coccoïde de plus ou moins 0.5 micron de diamètre après quelques jours passés en culture (Tholozan et al., 1999); ce changement de structure serait associé au stade viable non cultivable (VBNC) de *Campylobacter*. Ce microorganisme ne produit pas de spore et possède parfois une capsule (Garénaux et al., 2008). *Campylobacter* est considéré comme une bactérie microaérophile, car sa croissance est optimale dans un environnement pauvre en oxygène (5 à 10 % O₂) (Carlone et Lascelles, 1982). Un environnement riche en oxygène cause l'accumulation de peroxydes dans la cellule, inhibant ainsi la croissance de

Campylobacter. Cette bactérie est aussi considérée comme capnophile, car elle requiert un environnement enrichi en dioxyde de carbone pour croître (généralement 10 % de CO₂) (Carlone et Lascelles, 1982). Dans un laboratoire de microbiologie typique, les conditions atmosphériques appropriées pour la culture de ce microorganisme sont 5 % O₂, 10 % CO₂ et 85 % N₂. *Campylobacter* est mésophile, car toutes les espèces du genre peuvent croître à 37°C. Les températures de prolifération se situent généralement entre 30 et 45°C (Couture, 1997). Afin d'isoler les *Campylobacter* thermotolérants pathogènes pour l'homme et certains animaux en laboratoire, on utilise généralement une température d'incubation de 42°C. Bien que *Campylobacter* soit considéré comme un microorganisme préférant les environnements de pH neutre, il semble résister davantage dans des conditions acides que dans des conditions basiques. Sa zone de pH optimale se situe entre 6.5 et 7.5 (Garénaux et al., 2008). *Campylobacter* possède une faible halotolérance, car sa croissance est inhibée par le sel à partir d'une concentration de 1.5 % (Doyle et Roman, 1982). Sur gélose, les colonies prennent entre 24 et 48 heures pour se former et peuvent adopter 3 aspects différents. L'aspect lisse montre des colonies rondes, élevées et convexes avec un diamètre relativement petit (1 à 2 mm), brillantes avec des contours réguliers bien définis et pouvant montrer des reflets métalliques lorsque la maturité est atteinte (Couture, 1997). L'aspect rugueux montre des colonies qui sont plus étendues, plates, grises et parfois granuleuses et transparentes avec un contour irrégulier. L'aspect dit « verre frité » présente des colonies avec des diamètres plus petits que 1 mm, rondes, élevées et translucides reflétant la lumière (Couture, 1997; Garénaux et al., 2008).

Pathogenèse

La susceptibilité de l'hôte et la virulence de la souche de *Campylobacter* sont deux facteurs qui peuvent influencer l'interaction hôte-pathogène conduisant à une campylobactériose. Pour amorcer l'infection, le microorganisme doit pénétrer la couche de mucus gastro-intestinal de l'hôte en utilisant sa motilité et sa forme spiralée. Il doit ensuite adhérer aux entérocytes de l'intestin. Par la suite, il peut sécréter des toxines qui causeront la diarrhée et/ou envahir les cellules épithéliales. Cette invasion peut créer des dommages à la muqueuse et causer de l'inflammation. Il n'est pas clair si cette inflammation joue un rôle direct sur les dommages

aux cellules épithéliales et le développement de la diarrhée. Une infection systémique peut parfois s'en suivre où la bactérie adoptera une voie pluricellulaire (van Vliet et Ketley, 2001). Différentes souches de *Campylobacter* sécrètent différentes toxines, principalement des entérotoxines et des cytotoxines, conférant un pouvoir pathogène qui varie d'une souche à l'autre (Wallis, 1994). Ensuite, *Campylobacter* doit contrer la réponse immunitaire de l'hôte grâce à différents mécanismes de réponse aux stress. Plusieurs facteurs de virulence spécifiques ont été identifiés et étudiés à ce jour (Table I); ils pourraient être des cibles moléculaires intéressantes pour le diagnostic de la maladie ou encore pour la caractérisation génétique de *Campylobacter* dans le but de faire de l'épidémiologie moléculaire. Avec le récent séquençage du génome entier de *C. jejuni* NCTC 11168, les mécanismes de virulence de *Campylobacter* sont davantage connus, mais restent relativement incompris en comparaison à d'autres pathogènes à cause entre autres de l'absence de modèles animaux appropriés.

Table I. Facteurs de virulence et de survie de *Campylobacter* impliqués dans la campylobactériose.

Facteurs de virulence	Fonctions	Gènes	Références
Motilité	Composantes du flagelle	<i>flaA, flaB, fliD, fliF, fliM, fliY, flgH, flgE, flgK, fliA, rpoN</i>	Carrillo et al., 2004; Hendrixson, 2006; Lertsethtakarn et al., 2011; Nachamkim et al., 1993; Simmerlad et Hendrixson, 2007; Wassenaar et al., 1993; Yeh et al., 2014
	Glycosylations du flagelle	<i>cj1321, cj1325/6</i>	Champion et al., 2005
Chimiotactisme	Protéines de la chimiotaxie	<i>cheA, cheB, cheR, cheV, cheW, cheZ, tlp1, tlp4, tlp10, cetA, cetB, acfB</i>	Golden et Acheson, 2002; Hamer et al., 2010; Marchant et al., 2002
	Régulateurs de la rotation du flagelle	<i>cheY</i>	Hermans et al., 2011
	Gènes de biosynthèse	<i>luxS</i>	Hermans et al., 2011; Quinones et al., 2009
Adhésion	Adhésines	<i>cadF, peb1a, flpA, capA, jlpA</i>	Flanagan et al., 2009; Jin et al., 2001; Konkel et al., 1997; Pei et Blaser, 1993
	Phospholipases	<i>pldA</i>	Dekker, 2000; Ziprin et al., 2001
	Protéines de transport	<i>peb3</i>	Min et al., 2009
	Chaperonines	<i>peb4</i>	Kale et al., 2011
	Systèmes de sécrétion type IV	<i>virB11</i>	Bacon et al., 2000; Dasti et al., 2010
Invasion	Systèmes de sécrétion type III	<i>flhA, flhB, fliQ, fliP, fliO, fliR, flaC</i>	Carrillo et al., 2004; Konkel et al., 2004
	Protéines d'invasion	<i>ciaB, ciaC, iamA</i>	Carvalho et al., 2001; Christensen et al., 2009; Euker et Konkel, 2012; Konkel et al., 2004; Rivera-Amill et al., 2001
	Survie intracellulaire	<i>cial</i>	Buelow et al., 2011
	Chaperonines	<i>htrA</i>	Baek et al., 2011

Facteurs de virulence	Fonctions	Gènes	Références
	Défenses contre peptides antimicrobiens Apoptose	<i>virK</i> <i>fspA</i>	Novik et al., 2009 Poly et al., 2007
Toxines	CDT 1,3-galactosyltransférases	<i>cdtA, cdtB, cdtC</i> <i>cgtB, wlaN</i>	Asakura et al., 2008 Gilbert et al., 2000; Linton et al., 2000 Bachtiar et al., 2007; Bacon et al., 2001; Jones et al., 2004
Capsule	Gènes de transport M Gènes de biosynthèse	<i>kspM</i> <i>kspE</i>	Bacon et al., 2001
Système N-glycosylation	N-glycosylation	<i>pgI</i>	Hendrixson et DiRita, 2004; Jones et al., 2004; Karlyshev et al., 2004
Systèmes d'acquisition du fer	Entérobactines Lipoprotéines Récepteurs de la membrane externe	<i>cfrA, cfrB, TonB, ExbB, ExbD</i> <i>ceuE</i> <i>cj0178, chuA, fur</i>	Palyada et al., 2004; Xu et al., 2010; Zeng et al., 2013a Ketley, 1997; Park et Richardson, 1995 Bang et al., 2003; Woodall et al., 2005
Résistance à la bile et autres substances	Pompes CME Répresseurs de pompes CME	<i>cmeA, cmeB, cmeC</i> <i>cmeR</i>	Lin et al., 2002 Lin et al., 2002
Réponses aux stress	Réponses stringentes Catalases Réductases Péroxidases Protéines antioxydantes HSP	<i>spoT</i> <i>katA</i> <i>ahpC, cj545c</i> <i>tpx, cj0358, cj0020c, sod</i> <i>cj0012c, cj1371</i> <i>dnaJ</i>	Gaynor et al., 2005 Atack et Kelly, 2009; Bingham-Ramos et Hendrixson, 2008 Atack et al., 2008; Wang et Maier, 2004 Mihaljevic et al., 2007 Garénaux et al., 2008 Konkel et al., 1998; Ziprin et al., 2001

*Tableau adapté de la revue de Bolton (2015).

Maladie

Campylobacter est reconnu pour être infectieux à de faibles doses. La probabilité de développer une campylobactériose suite à l'ingestion d'une seule cellule est évaluée à 1/150 (Medema et al., 1996), tandis que des infections expérimentales sur des humains montrent que quelques centaines de bactéries sont suffisantes pour causer la maladie la plupart du temps (Black et al., 1988). À partir de la dose infectieuse minimale, la probabilité d'infection augmenterait de manière exponentielle en fonction de la dose ingérée (Teunis et al., 2005). Un humain souffrant de campylobactériose peut excréter entre 10^6 et 10^8 bactéries par gramme de fèces, faisant contraste avec la quantité moyenne requise pour causer l'infection (Robinson, 1981; Taylor et al., 1993). Le système immunitaire de l'hôte et la souche de *Campylobacter* impliquée affecteraient la probabilité de colonisation et de maladie (Park, 2002).

Chez l'humain, la campylobactériose se caractérise par une période d'incubation variant de 24 à 72 heures, mais il est possible que cette période s'étende au-delà d'une semaine surtout si l'inoculum ingéré est faible (Skirrow et Blaser, 1995). La phase prodromique de la maladie est caractérisée par la présence de fièvre, maux de tête, douleurs musculaires et frissons, qui ne sont pas des symptômes spécifiques à la campylobactériose. *C. jejuni* sous-esp. *jejuni* est l'espèce la plus fréquemment impliquée dans les cas humains de campylobactériose. Elle peut causer deux types de diarrhée : une diarrhée aqueuse ou une diarrhée sanguinolente (dite aussi diarrhée inflammatoire) présentant des leucocytes. Ce dernier type de diarrhée suggère que *Campylobacter* est capable d'envahir la muqueuse intestinale et pourrait expliquer les cas de bactériémie ou de septicémie parfois observés lors de campylobactériose, surtout chez des gens ayant un système immunitaire affaibli (Font et al., 1997). Dans le cas d'une diarrhée aqueuse, *Campylobacter* serait capable de produire une entérotoxine thermolabile très similaire à celle produite par *Vibrio cholerae* et *Escherichia coli* (Olsvik et al., 1984). Les symptômes typiques de la campylobactériose sont une diarrhée aiguë accompagnée de crampes abdominales intenses comparables à une appendicite et pouvant persister jusqu'à 48 heures (Blaser, 1997). *C. coli*, *C. lari* et *C. upsaliensis* causent les mêmes signes

cliniques que *C. jejuni*, mais on les rencontre beaucoup plus rarement dans les cas humains. *C. fetus* peut être responsable d'infections extra-intestinales diverses (septicémies, méningites, salpingites) chez des gens ayant un système immunitaire affaibli et plus rarement, il peut affecter le fœtus et provoquer un avortement (Cypierre et al., 2014). Parmi les autres *Campylobacter* thermophiles et entéropathogènes, *C. hyointestinalis* a déjà été isolé dans des diarrhées aqueuses, *C. sputorum* biovar *sputorum* est une bactérie commensale de l'intestin chez environ 2 % des humains en faisant partie de la flore intestinale normale et *C. concisus* est fréquemment associé à des gingivites de patients souffrant de périodontites (Garénaux et al., 2007; Loesche et Gibbons, 1965). Selon des données provenant de la population québécoise, le risque d'un événement récurrent de campylobactériose était plus élevé pour une période de 4 ans suivant le premier événement pour ensuite diminuer (Arsenault et al., 2011).

Les complications liées à la campylobactériose sont beaucoup plus rares et peuvent affecter différents organes. Elles incluent la cholécystite, la pancréatite, la cystite et l'avortement septique (Blaser, 1997). Chez la femme enceinte, une bactériémie causée par *C. jejuni* peut avoir des effets dévastateurs sur le fœtus (Smith, 2002). Deux maladies auto-immunes seraient secondaires à une infection à *Campylobacter* : jusqu'à 3 % des patients atteints d'une campylobactériose peuvent développer de l'arthrite réactive (Peterson, 1994) et moins de 0.1 % peuvent développer le syndrome de Guillain-Barré (SGB) (Allos, 2001). Ce dernier est probablement le symptôme le plus sévère pouvant être potentiellement causé par une infection à *Campylobacter*. Le SGB est une maladie neuromusculaire associée à des lésions axonales pouvant provoquer des dommages neurologiques. Plus spécifiquement, le SGB serait dû au mimétisme moléculaire entre certaines structures que l'on retrouve sur les lipopolysaccharides de certaines souches de *Campylobacter* et les glycolipides des nerfs périphériques ou d'autres protéines de la myéline. Le SGB n'est pas associé à la sévérité de la campylobactériose, mais il est soupçonné que des particularités génétiques au niveau des gènes impliqués dans la sialylation des structures LOS (lipooligosaccharides) de la membrane externe seraient impliqués (Taboada et al., 2007). Le SGB se développe habituellement 1 à 3 semaines après l'apparition de la gastro-entérite.

Chez les animaux, *C. jejuni* sous-esp. *jejuni* peut causer des avortements et des infections intestinales chez les animaux de la ferme (plus particulièrement les bovins), mais la plupart de ces animaux seront des porteurs sains excréant le *Campylobacter* dans l'environnement. *C. fetus* sous-esp. *veneralis* fait partie de la flore de la cavité préputiale de bœufs asymptomatiques. Il peut être transmis sexuellement aux vaches et provoquer des infections génitales chez ces dernières ainsi que l'infertilité et des avortements. *C. fetus* sous-esp. *fetus* fait partie de la flore intestinale normale des bovidés et des moutons, où il peut être responsable d'infections d'origines commensales. *C. mucosalis* serait responsable d'entéropathies chez le porc (Couture, 1997).

Traitements chez les humains

Une infection à *Campylobacter* est généralement autolimitante. Dans un premier temps, les patients atteints de forme diarrhéique de campylobactériose pourront recevoir des soins de support tel le maintien de l'hydratation et de la balance électrolytique (Couture, 1997). Un traitement aux antibiotiques s'avère nécessaire dans certaines situations : la diarrhée persiste dans le temps (généralement au-delà de 7 jours), le patient présente une forte fièvre, la diarrhée est sanguinolente, la patiente est enceinte ou encore le patient est immunodéprimé. L'antibiotique de choix est l'érythromycine étant donné son efficacité, son faible coût et sa faible toxicité (Couture, 1977). La proportion d'isolats de *Campylobacter* résistants à l'érythromycine est restée relativement faible au cours du temps lorsqu'on compare avec d'autres antibiotiques dont la ciprofloxacine (Couture, 1997). La prévention de la contamination lors de la manipulation des aliments reste donc la meilleure stratégie à préconiser pour réduire le fardeau de la maladie : par exemple éviter la contamination croisée, se laver les mains ou faire cuire correctement les aliments.

Épidémiologie de *Campylobacter*

Les prochaines sections de la présente revue porteront sur les *Campylobacter* thermophiles entéropathogènes.

Incidence

Campylobacter est la cause la plus fréquente de gastro-entérites bactériennes dans les pays développés. Au Canada, la campylobactériose est la maladie entérique à déclaration obligatoire la plus fréquemment déclarée, avec une incidence d'environ 27 cas déclarés par 100 000 habitants (FoodNet Canada, 2013). Aux États-Unis, l'incidence annuelle moyenne en 2012 se situait à 14 cas déclarés par 100 000 habitants faisant en sorte que *Campylobacter* est le pathogène bactérien le plus fréquemment détecté après *Salmonella* dans les cas de gastro-entérites (CDC, 2014). Depuis 2002, une diminution de l'incidence de campylobactériose a été observée aux États-Unis, qui serait attribuable à l'implantation de nouveaux règlements et moyens de prévention visant la salubrité alimentaire des produits de volailles. Le Centre européen de prévention et contrôle des maladies (CEPCM), en place depuis 2005 afin de recueillir des données de surveillance nationale, rapporte que les 200 000 cas de campylobactériose rapportés annuellement en font la cause de gastro-entérite bactérienne la plus fréquente en Europe (Westrell et al., 2009). Les sites de surveillance du CEPCM couvrent 28 pays où l'incidence globale serait de 51.6 cas par 100 000 habitants (Westrell et al., 2009). La République tchèque serait le pays européen avec le plus haut taux d'incidence correspondant à 296 cas par 100 000 habitants comparativement aux autres pays de l'Europe où l'incidence se situe entre 50 et 90 cas par 100 000 habitants (Westrell et al., 2009). Ces différences pourraient être expliquées par les habitudes différentes des consommateurs relatives à chaque pays d'Europe, mais les facteurs reliés au système de surveillance d'un pays spécifique y joueraient aussi un grand rôle. La représentativité de la population couverte, les techniques de laboratoires utilisées, les systèmes de surveillance actifs ou passifs et les médecins exigeant des cultures sont des exemples de ces facteurs (Westrell et al., 2009). La Nouvelle-Zélande serait le pays où l'incidence serait la plus élevée dans le monde avec 396 cas par 100 000 habitants (Baker et al., 2007). Les éclosions de campylobactériose sont généralement rares, faisant en sorte qu'une grande majorité des

cas de campylobactériose (99 %) seraient sporadiques (Cowden, 1992; Hudson et al., 1999). Les éclosions de *Campylobacter* seraient attribuables principalement à la consommation de lait cru ou non-pasteurisé, suivi des produits de volaille et de l'eau (Taylor et al., 2013).

Campylobacter serait également un agent pathogène représentant un fardeau important et fort probablement sous-estimé dans les pays en voie de développement (Abulreesh et al., 2006; Coker et al., 2002; Platts-Mills et Kosek, 2014). Une étude cas-témoins dans 7 sites répartis dans l'Afrique et l'Asie du Sud, où la diarrhée représente un fardeau important, montre une association significative entre *C. jejuni* et cette diarrhée dans certains sites au Bangladesh et au Pakistan (Kotloff et al., 2013).

Sous-déclaration des cas

Le nombre de cas déclarés de campylobactériose serait sous-estimé par rapport au nombre réel de cas dans la population : il y aurait 7 fois plus de cas réels que rapportés en Angleterre (Wheeler et al., 1999), 34 fois plus aux États-Unis (Samuel et al., 2004) et de 23 à 49 fois plus au Canada (Thomas et al., 2013). Cette sous-estimation pourrait être attribuable aux médecins qui ne demandent pas toujours des cultures pour les selles, à l'isolement difficile de *Campylobacter* en culture ou encore aux gens infectés qui ne consultent pas et guérissent par eux-mêmes au bout de quelque temps. En général, il est estimé que 4 % à 17 % des gens ayant une gastro-entérite présentant des symptômes sévères consulteraient un médecin (de Wit et al., 2001). Plus les symptômes seront sévères, plus les gens seront portés à consulter (Tam et al., 2003). De plus, une fois les échantillons envoyés au laboratoire, des variations dans la proportion d'échantillons rejetés dues à la conservation des souches, à la consistance des fèces de même qu'à la durée d'hospitalisation des patients avec des échantillons multiples peuvent influencer la déclaration des cas de campylobactériose (Flint et al., 2004). La sensibilité des méthodes utilisées pour identifier *Campylobacter* dans les laboratoires canadiens serait située entre 73 % et 89 % (Thomas et al., 2006). En prenant compte de cette sous-estimation, il est estimé que jusqu'à 2 % de la population serait atteinte de campylobactériose

annuellement au Canada et aux États-Unis (Altekruse et Tollefson, 2003; Russell, 1992; Thomas et al., 2006).

Facteurs de variation du risque

Âge

Les enfants âgés de moins de 5 ans seraient plus à risque de développer une campylobactériose (Kapperud et Aasen, 1992). Aux États-Unis, l'incidence serait estimée à 24 cas déclarés par 100 000 habitants pour les enfants âgés entre 0 et 5 ans (CDC, 2014). Une autre étude rapporte que les enfants âgés de moins d'un an sont ceux qui consultent le plus souvent dans le cas d'une campylobactériose (16 %), suivi des enfants plus âgés (6 %) et des adultes (2 %) (de Wit et al., 2001). Par contre, les parents seraient peut-être plus portés à consulter lorsque leurs jeunes enfants sont atteints d'une gastro-entérite et le médecin serait plus porté à demander une culture des selles; ceci pourrait influencer le nombre de cas attribués à cette strate d'âge. D'un autre côté, les cultures de selles sont plus souvent demandées lorsqu'un adulte présente une gastro-entérite sévère comparativement à un enfant présentant une diarrhée qui semble bénigne (Hennessy et al., 2004). Par contre, il est peu probable qu'une diarrhée bénigne soit causée par *Campylobacter* chez les enfants car la sévérité des symptômes de la campylobactériose serait plus importante chez ces derniers et diminuerait avec l'âge (Itoh et al., 1981; Kist, 1981). Les personnes âgées (65 ans et plus) seraient plus à risque d'hospitalisation ou de mortalité lors de campylobactériose (Smith, 1998).

Genre

Les hommes semblent plus à risque de contracter une campylobactériose que les femmes (ratio 1.35 : 1) (Kapperud et Aasen, 1992). Ce ratio homme/femme serait le plus élevé dans la strate d'âge 10-14 ans (Strachan et al., 2008). Les hypothèses soulevées pour expliquer le fait que les hommes sont plus souvent infectés par *Campylobacter* sont que les hommes auraient une plus faible hygiène en général lors de la manipulation de produits contaminés comparativement aux femmes (Patil et al., 2005; Yang et al., 1998)

ou que la main-d'œuvre travaillant dans les endroits les plus exposés comme les abattoirs ou les fermes serait majoritairement composée d'hommes, donc plus à risque de contracter l'infection (Kapperud et al., 2003; Potter et al., 2003; Wilson, 2004). De plus, les hommes consommeraient plus d'aliments à risque de causer la campylobactériose que les femmes (Samuel et al., 2004).

Facteurs affectant la réponse immunitaire de l'hôte

La réponse immunitaire suite à une infection par *Campylobacter* peut varier d'un individu à l'autre (Park, 2002). De même, la durée de la maladie serait influencée entre autre par la réponse du système immunitaire de l'hôte (Schonberg-Norio et al., 2006). Les cas de campylobactériose seraient ainsi plus fréquents chez les gens immunocompromis; toutefois, les médecins sont davantage portés à demander une culture des selles lorsque les patients sont atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), lorsque les selles des patients présentent du sang ou lorsque la diarrhée est persistante (Hennessy et al., 2004), ce qui pourrait surestimer cette association. Dans un même ordre d'idée, les gens ayant des ulcères peptidiques, des hernies hiatales, des maladies du colon ou des conditions gastro-intestinales chroniques seraient plus portés à aller consulter un médecin expliquant le fait qu'ils sont plus souvent associés à une campylobactériose comparativement aux autres gens qui ne sont pas atteints de ces maladies (Danis et al., 2009; Stafford et al., 2008). Les gens atteints du diabète seraient aussi plus à risque : la diminution de l'efficacité du système immunitaire ainsi qu'une déficience au niveau du système nerveux autonome pourraient en être la cause (Neal et Slack, 1997). L'utilisation d'inhibiteurs de pompes à protons serait associée à une récente hausse de cas de campylobactériose aux Pays-Bas (Bouwknegt et al., 2014) : la réduction de la production d'acide gastrique serait la cause (Doorduyn et al., 2010). L'utilisation d'antibiotiques serait également un facteur de risque (Effler et al., 2001).

Voyages à l'étranger, statut social et appartenance ethnique

Une étude rapporte que le risque de contracter une campylobactériose serait augmenté chez les personnes ayant voyagé à l'étranger, quitté le milieu scolaire avant 16 ans et vivant dans la pauvreté (faible revenu) (Scallan et al., 2006). Au Canada, les voyages à l'étranger seraient responsables de 19 % des cas de campylobactériose (FoodNet Canada, 2013). Une étude au Manitoba fait mention d'une incidence significativement plus élevée dans les régions ayant un statut social économique plus élevé, possiblement attribuable à une plus forte fréquentation des restaurants, aux voyages et à la consommation d'aliments de luxe plus à risque comme les fruits de mer et les tartares (Green et al., 2006). En effet, les repas pris en restaurant, préparés sur barbecue ou issus de la restauration rapide augmenteraient le risque de contracter la maladie (Cox, 2002; Gallay et al., 2008; Studahl et Andersson, 2000). Aux États-Unis, les vomissements et diarrhées sanguinolentes dues à *Campylobacter* déclarés par des patients seraient associés à la consommation de certains aliments (saucisses, sandwiches préemballés, produits de volaille autre que le poulet comme la dinde ou le canard) (Gillespie et al., 2006).

La malnutrition chez les enfants favoriserait les infections à *Campylobacter* : une étude des microbiomes d'enfants mal nourris en Inde suggère que les *Campylobacteraceae* étaient 35 fois plus prévalents comparativement à des microbiomes d'enfants bien nourris (Monira et al., 2011). Des chercheurs du réseau Mal-ED (« The Interactions of Malnutrition & Enteric Infections: Consequences for Child Health et Development ») abordent présentement la question des maladies entériques chez les enfants de moins de 2 ans en lien avec la malnutrition, la physiologie de l'intestin, la croissance physique, le développement cognitif et le système immunitaire grâce à un système de surveillance dans 8 sites en Afrique, Asie et Amérique du Sud; *Campylobacter* fait partie des microorganismes étudiés (Mal-ED, 2014). L'allaitement maternel conférerait une immunité à *Campylobacter* dans les pays en voie de développement (Nachamkin et al., 1994; Ruiz-Palacios et al., 1990).

L'appartenance ethnique pourrait avoir un effet sur le risque de contracter la maladie : une étude au Royaume-Uni rapporte une incidence accrue chez les gens d'appartenance

ethnique pakistanaise, mais une incidence très faible chez les gens des communautés noires et indiennes comparativement aux Caucasiens (CSSSC, 2003). Par contre, au Danemark, les gens provenant de pays étrangers sont moins à risque de développer la maladie (Simonsen et al., 2008). Ces différences reliées à l'ethnicité pourraient être explicables par les habitudes alimentaires, l'utilisation des soins de santé, les statuts immunitaires ou les voyages plus fréquents dans les pays d'origine où la prévalence est plus élevée (Samuel et al., 2004).

Milieus ruraux et urbains

Généralement, les différentes études rapportent que les cas de campylobactériose sont plus fréquents dans les régions rurales comparativement aux régions urbaines, surtout chez les enfants (Green et al., 2006; Louis et al., 2005; Potter et al., 2002). Une étude au Michigan a montré une incidence plus élevée dans les régions à forte densité de fermes de volailles comparativement aux régions à faible densité (Potter et al., 2002). L'incidence annuelle de cas de campylobactériose déclarés en Ontario par 100 000 habitants était plus élevée chez les résidents d'une terre agricole (375 cas) comparativement aux autres résidents ruraux (75 cas) (Thompson et al., 1986). Cette différence peut être expliquée par le contact direct avec les animaux ou par la consommation de lait cru : 71 % des gens résidants sur une terre agricole dans cette dernière étude avaient consommé du lait cru (Thompson et al., 1986). D'après des données provenant de la population québécoise, des associations significatives ont été observées entre l'incidence de campylobactériose et le fait d'habiter une région ayant une forte densité de ruminants avec un effet réduit pour les gens plus âgés (Arsenault et al., 2011). Une étude dans la région des Cantons-de-l'Est au Québec a montré que le risque de contracter une campylobactériose était 1.89 fois plus élevé chez les gens habitant dans un milieu rural que urbain (Levesque et al., 2013). Des associations semblables ont été trouvées, avec un risque plus élevé chez les personnes âgées entre 16 et 34 ans habitant une région avec une haute densité de volailles ou comprenant plusieurs abattoirs de volailles (Arsenault et al., 2011). Ces associations étaient constantes d'une saison à l'autre et montraient une relation dose-effet renforçant la plausibilité d'une relation causale, et étaient attribuées à des contacts directs accrus

avec les animaux. Les gens habitant en milieux urbains seraient aussi davantage à risque de contracter une campylobactériose provenant de produits de la volaille comparativement aux gens habitant en milieux ruraux supportant que ces derniers sont exposés à d'autres sources de contamination, dont la contamination environnementale par les ruminants dans cette étude en particulier de Deckert et al. (2014). Une autre hypothèse pourrait être que les gens habitant les régions rurales sont exposé plus constamment à différentes sources de *Campylobacter* leur conférant une meilleure protection immunitaire. Cependant, les gens habitant en milieux urbains consultent davantage pour une maladie diarrhéique que les gens habitant en milieux ruraux (ratio 14 : 1), représentant une sous-estimation de l'impact d'habiter en milieu rural (de Wit et al., 2001). Une étude aux Pays-Bas expose des conclusions contraires à l'étude de Deckert et al. (2014) où une incidence plus élevée en milieu urbain qu'en milieu rural (ratio 1.3 : 1) est rapportée (van Hees et al., 2007). Au Québec, les usines d'abattage de la volaille sont limitées seulement à un faible nombre d'entreprises qui approvisionne la grandeur de la province. Cette caractéristique nous permet d'émettre l'hypothèse qu'il n'y a pas de variation géographique importante dans le risque d'exposition à de la volaille commerciale contaminée et que les variations géographiques dans le risque sont probablement liées à d'autres sources de contamination ou des habitudes des gens à consulter par exemple (Arsenault et al., 2011; Michaud et al., 2005).

Saisonnalité

L'incidence de campylobactériose présente des variations saisonnières, où des pics d'incidence marqués sont observés dans les régions tempérées en été, pics pour lesquels aucune explication ne fait consensus (Louis et al., 2005; Nelson et Harris, 2011; Samuel et al., 2004). L'incidence serait 4 fois plus élevée en été comparativement au reste de l'année (Kovats et al., 2005; Van Loock et al., 2000). D'après les données canadiennes, le pic de cas de campylobactériose déclarés durant l'été surviendrait avant le pic de prévalence sur les poulets crus vendus au détail, suggérant un facteur ou une source autre que le poulet contaminant les humains durant cette période (FoodNet Canada, 2013). Au Québec, le nombre de cas déclarés serait beaucoup plus élevé durant la deuxième moitié

de l'été comparativement au reste de l'année (Arsenault et al., 2011). Une étude dans la région des Cantons-de-l'Est rapporte que le nombre de cas de campylobactériose qui est plus élevé en été ne serait pas relié à la consommation des produits de volailles et suggérerait que d'autres facteurs environnementaux seraient impliqués (Michaud et al., 2005). Le pic de cas de campylobactérioses observés durant l'été serait donc attribuable à d'autres facteurs, par exemple des facteurs environnementaux comme l'exposition à l'eau. Une autre hypothèse avancée serait que durant l'été, les changements au niveau des habitudes alimentaires des consommateurs comme la cuisson sur le barbecue, le niveau de cuisson des viandes et le relâchement des mesures d'hygiène en saison estivale pourraient expliquer cette hausse des cas marquée.

Facteurs météorologiques

Des facteurs de risque liés à la température ont été notés au Canada et en Angleterre où des températures hebdomadaires allant jusqu'à 14°C seraient associées à une hausse de l'incidence de campylobactérioses (Fleury et al., 2006; Tam et al., 2006). Une étude à Philadelphie rapporte que l'incidence était plus élevée lorsque la température était plus chaude et humide et que la température de la rivière utilisée pour approvisionner les habitants en eau potable était plus froide (White et al., 2009). Les événements de fortes précipitations sont souvent associés à la contamination des cours d'eau (Ridley et al., 2014). De manière générale, tel que rapporté dans différentes études, l'incidence de la campylobactériose ne semble pas corrélérer avec une hausse des précipitations moyennes (Jore et al., 2010; Kovats et al., 2005; Tam et al., 2006). Par contre, les événements météorologiques où les précipitations sont extrêmes augmenteraient le risque d'éclosion de maladies d'origine hydrique (Curriero et al., 2001) : à noter qu'aucune analyse spécifique à l'incidence de campylobactérioses lors de ces événements n'a été entreprise. Une étude montre qu'un événement de précipitation extrême avant une compétition de natation en mer aurait été responsable de 5 fois plus de cas de gastro-entérites attribuables entre autres à *Campylobacter* (Harder-Lauridsen et al., 2013).

Impact social et économique

Il est connu aujourd'hui que *Campylobacter* est la cause principale de gastroentérites bactériennes dans les pays industrialisés, mais est-ce que le fardeau engendré par cette maladie est significatif ? Le fardeau attribuable à la campylobactériose serait surtout lié aux hospitalisations, aux consultations médicales et l'absentéisme au travail; une façon de mesurer le fardeau relié à une maladie est d'estimer le nombre d'années de vie perdues corrigées pour le facteur invalidité (AVCI). L'impact de *Campylobacter* aux Pays-Bas serait de 1 780 AVCI par année (Mangen et al., 2013), donc 1 780 années de vies perdues dues à la mortalité ou l'invalidité. Mondialement, les entérites à *Campylobacter* représenteraient 7541 milliers de AVCI pour l'année 2010 (Murray et al., 2012). Aux États-Unis, le fardeau économique relié à la campylobactériose se situerait entre 1.5 et 8 milliards de dollars américains (Buzby et Roberts, 1996), tandis que celui associé au syndrome Guillain-Barré causé par *Campylobacter* se situerait entre 0.2 à 1.8 milliards de dollars américains (Buzby et al., 1997); ainsi, les infections à *Campylobacter* représenteraient un coût total pouvant s'élever jusqu'à 8 milliards de dollars américains selon des études réalisées en 1995. Il coûtait en moyenne environ 315 livres sterling à l'état pour un patient ayant reçu un diagnostic de campylobactériose en 1995 en Angleterre (Roberts et al., 2003). Les éclosions de campylobactériose peuvent également s'avérer coûteuses. Par exemple, une éclosion de campylobactériose d'origine hydrique survenue en Nouvelle-Zélande dans un bassin approvisionnant 1790 personnes a engendré des coûts reliés à la maladie qui se sont élevés à 1.26 million de dollars américains (Sheerin et al., 2014). L'estimation du fardeau de la campylobactériose dans les pays en voie de développement, où la maladie est endémique, est très sous-estimée à cause du manque de ressources pour rapporter la maladie ainsi que du manque d'information sur l'impact de la maladie sur les populations et plus particulièrement sur les enfants (Platts-Mills et Kosek, 2014).

D'autres études se sont intéressées aux bénéfices que pourraient apporter des actions et des décisions prises par les dirigeants politiques régissant les programmes de surveillance, de prévention et de contrôle des pathogènes d'origine alimentaire. Une

étude en Nouvelle-Zélande révèle qu'une intervention de l'état et des industries agroalimentaires dans le domaine de la production et la transformation de la volaille afin de réduire la contamination par *Campylobacter* générerait des bénéfices de 57.4 millions de dollars américains annuellement (Duncan, 2014). En conclusion, il est évident que *Campylobacter* représente un fardeau économique important et que davantage d'efforts doivent être mis dans la biologie de l'organisme en tant que tel, de son épidémiologie et dans les techniques de diagnostic afin de mieux comprendre et prévenir cette maladie.

Hôtes et réservoirs

Les pressions de sélection au cours de l'évolution de *Campylobacter* ont permis à ce dernier de développer des mécanismes optimaux à l'adoption d'une niche écologique aviaire (Lee et Newell, 2006). Il est bien documenté que *Campylobacter* est souvent présent dans les élevages de volaille, incluant les poulets (FSA, 2014) et les dindes (Kashoma et al., 2014). Au Québec, la prévalence de troupeaux de volaille commerciaux colonisés par *Campylobacter* en fin d'élevage a été estimée à 35 % chez les poulets et à 46 % chez les dindes, avec une forte prépondérance de *C. jejuni* (Arsenault et al., 2007). Une autre étude montre que la moitié des lots de poulets de fermes d'élevage biologiques étaient contaminées à *C. jejuni* (Thibodeau et al., 2011). Au détail, la prévalence de poitrines de poulet (sans peau) contaminées varierait de 44 % à 46 % dépendamment des sites et de 17 % à 46 % pour le poulet haché d'après le plus récent rapport de FoodNet Canada (2013).

Au Canada, jusqu'à 60 % des troupeaux de vaches laitières seraient porteurs de *Campylobacter*, mais la prévalence de *Campylobacter* retrouvé sur le bœuf cru vendu au détail serait inférieur à 0.1% (FoodNet Canada, 2007). Une étude menée au Québec dans 40 fermes de vaches laitières a montré que 73 % des fermes comportaient au moins une vache porteuse de *Campylobacter* spp. (Guevremont et al., 2014). L'espèce la plus fréquemment isolée chez les vaches laitières était *C. hyointestinalis* avec une prévalence de 19 % (Guevremont et al., 2014).

Le porc est aussi souvent colonisé par *C. coli* (Davies, 2011). Au Canada, la prévalence de troupeaux porcins porteurs de *Campylobacter* serait estimée entre 40 % et 100 %, mais aucun organisme n'aurait été isolé sur la viande en vente au détail (FoodNet Canada, 2006). Une étude en abattoir au Québec montre que 78 % des carcasses de porcs sont contaminées par *Campylobacter*, avec *C. coli* identifié dans 96 % des cas, mais aucun lien génétique n'a été trouvé entre ces souches et celles provenant de cas humains (Guevremont et al., 2004).

Il est rapporté que *Campylobacter* (principalement *C. lari*) est aussi présent chez les oiseaux sauvages de diverses espèces (Lillehaug et al., 2005). Ces derniers seraient des réservoirs naturels de *Campylobacter* et pourraient jouer un rôle important dans la transmission de la bactérie aux animaux de la ferme, notamment les vaches et les chèvres (Stanley et Jones, 2003). Dans la région de Montréal, la prévalence de colonisation par *C. spp.* a été estimée à 16 % chez les goélands à bec cerclé (Quessy et Messier, 1992). Différents mammifères de la faune sont aussi des sources de différentes espèces de *Campylobacter* comme les chevreuils, les mouflons et les sangliers (Carbonero et al., 2014). Dans cette étude, la prévalence semble plus élevée chez les sangliers comparativement aux autres animaux; la prévalence de *C. lanienae*, l'espèce la plus souvent isolée chez le sanglier, était de 27 % (Carbonero et al., 2014). Généralement, les études portant sur les animaux de la faune rapportent des prévalences très faibles (<5 %) d'animaux porteurs de *C. jejuni*. Tel est le cas pour les lapins (Kohler et al., 2008), les rats musqués et les ours (Pacha et al., 1987), ainsi que les ratons-laveurs et les civettes (Lee et al., 2011). Une autre étude rapporte une prévalence de *C. jejuni* plus élevée chez les rats musqués : 48 % (Pacha et al., 1985). Les otaries seraient aussi des sources naturelles de *Campylobacter* (Gonzalez et al., 2011).

Les animaux domestiques comme les chiens et les chats peuvent également être porteurs de *Campylobacter* pouvant atteindre des prévalences de 58 % (Andrzejewska et al., 2013; Chaban et al., 2010; Leonard et al., 2011; Procter et al., 2014). Certaines études suggèrent des liens possibles entre les souches provenant des animaux domestiques et les souches cliniques basés sur des méthodes de typages (Acke et al., 2011; Mughini Gras et al.,

2013). D'autres animaux de compagnie plus exotiques peuvent aussi être porteurs de *Campylobacter*, comme les hamsters (Fox et al., 1983b), les furets (Fox et al., 1983a) ou encore les reptiles (Giacomelli et Piccirillo, 2014). Les contacts entre les humains et les animaux domestiques peuvent être très fréquents et si ces derniers sont porteurs de *Campylobacter* pathogénique aux humains, les risques de transmission sont bel et bien présents.

Finalement, les humains peuvent être porteurs asymptomatiques de *Campylobacter* : selon certaines études, jusqu'à 1.7 % de la population seraient des porteurs sains (Baffone et al., 1995; Hellard et al., 2000; Tompkins et al., 1999).

Voies de transmission de la campylobactériose

Alimentaire

La transmission de *Campylobacter* via un vecteur alimentaire se produit lorsqu'il y a consommation de produits contaminés. Au Canada, 68 % des cas de campylobactériose seraient d'origine alimentaire (Ravel et al., 2010; Thomas et al., 2013). Les produits de volaille crus ou insuffisamment cuits sont les vecteurs alimentaires les plus souvent responsables de la transmission de cette infection; plus particulièrement, la contamination croisée avec de la viande de poulets crue serait davantage responsable que la consommation de poulet (Damjanova et al., 2011; Engberg, 2006; Stafford et al., 2007). Ainsi, la viande de volaille serait responsable de plus de 40 % des cas sporadiques de campylobactériose selon certaines études épidémiologiques (Hakkinen et al., 2009; Strachan et al., 2009). Le porc, réservoir important de *C. coli*, représente aussi une source de contamination potentielle pour l'homme, mais cette dernière ne serait pas aussi importante que les produits de volaille étant donné que *C. coli* est responsable de moins de cas humains et la viande de porc est rarement contaminée au détail (Davies, 2011) tout comme le bœuf cru (FoodNet Canada, 2007). De plus, les études ayant investigué les souches de *Campylobacter* dans les porcs et les cas cliniques humains rapportent des génotypes différents suggérant une transmission porc-humain peu probable (Denis et al.,

2009; Guevremont et al., 2004). Les fruits et légumes ne représenteraient pas des vecteurs importants de la transmission de la campylobactériose. Les fréquences de détection de *Campylobacter* sur des légumes en champs au Canada est faible : 3.1 % sur la laitue, 2.7 % sur les radis, 2.4 % sur le persil (Park et Sanders, 1992). Cette prévalence semble toutefois inexistante sur un échantillon de 600 légumes vendus au détail au Canada (Bohaychuk et al., 2009). Aux Pays-Bas, 0.2 % des légumes vendus au détail étaient positifs pour la détection de *Campylobacter* (Verhoeff-Bakkenes et al., 2011). Certains fruits de mer sont connus pour être des vecteurs alimentaires potentiels de l'infection comme des petits crustacés et le thon (Roels et al., 1998; Wilson et Moore, 1996).

Aux États-Unis, 81 % des éclosions de campylobactériose seraient associées à des vecteurs d'origine alimentaire (CDC, 2014). Une étude estime que parmi 191 éclosions d'origine alimentaire attribuables à *Campylobacter* au cours des dernières années et rapportés à travers le monde dans des rapports de bonne qualité scientifique, 35 % auraient pour origine des produits laitiers et 35 % seraient liés à des produits de volailles (poulets et dindes) (Greig et Ravel, 2009).

Contact direct avec des hôtes

Le contact direct avec les animaux représenterait jusqu'à 60 % de l'exposition quotidienne à *Campylobacter*, mais cette dernière estimation comporte plusieurs incertitudes (Evers et al., 2008). Cette exposition serait due principalement aux animaux domestiques (surtout les chiens, les chats et les reptiles) qui sont connus pour être porteurs de *Campylobacter* (Acke et al., 2011; Giacomelli et Piccirillo, 2014). Des liens épidémiologiques moléculaires ont d'ailleurs été établis entre des souches de *Campylobacter* provenant des chiens et de leurs propriétaires atteints de campylobactériose (Mughini Gras et al., 2012; Wardak et al., 2009). Les travailleurs agricoles en contact avec les animaux de la ferme et les ouvriers travaillant dans les abattoirs sont aussi plus à risque de contracter la campylobactériose (Potter et al., 2003; Wilson, 2004). Le dernier rapport de FoodNet rapporte que ce type de contact direct avec les animaux serait responsable de 10 % des éclosions (CDC, 2014). De même, les

contacts directs avec les animaux représentent un certain risque concernant les cas sporadiques de campylobactériose (Domingues et al., 2012).

Étant donné la faible dose infectieuse de *Campylobacter* et la charge élevée d'excrétion bactérienne d'une personne infectée, la possibilité de transmission d'une personne infectée vers une personne saine a été soulevée. Toutefois, les éclosions dues à de tels contacts sont rarement rapportées et tout porte à croire qu'elles sont plus susceptibles de se produire dans des centres pour personnes âgées, des hôpitaux ou encore des garderies pour enfants (Allos, 2001; Cowden, 1992; Pasternack, 2002; Tauxe, 1992). Tout de même, les contacts directs avec les humains infectés par *Campylobacter* poseraient un certain risque concernant les cas sporadiques de campylobactériose (Domingues et al., 2012).

Vecteurs environnementaux

Il a été démontré que les échantillons d'air à proximité des poulaillers et à l'intérieur des abattoirs de volaille, plus particulièrement dans les zones de plumaison et d'éviscération, pouvaient contenir du *Campylobacter* à des concentrations avoisinant les 50 UFC/15 m² (Bull et al., 2006; Whyte et al., 2001). Les mouches domestiques (*Musca domestica*) capturées près des fermes et abattoirs sont des vecteurs mécaniques potentiels de *Campylobacter* avec des prévalences de portage variant d'une étude à l'autre, généralement entre 8 % et 50 % (Adhikari et al., 2004; Hald et al., 2004; Rosef et Kapperud, 1983; Wright, 1983). Les mouches domestiques aideraient à la dispersion de *Campylobacter* dans l'environnement sur une échelle très locale, puisqu'elles ne peuvent généralement pas parcourir des distances de plus de 1.6 km (Lysyk et Axtell, 1986). Par contre, les mouches sont connues pour régurgiter et déféquer à des intervalles de 5 minutes tout au long de la journée (West, 1951). Aucune étude ne s'est penchée à savoir s'il existait un lien génétique entre des souches de *Campylobacter* provenant des mouches et celles provenant de cas cliniques humains permettant d'évaluer la probabilité d'une transmission des mouches directement aux hommes. De telles similarités ont été observées entre des souches provenant des mouches et celles provenant de poulets et de

moutons situés à proximité (Hald et al., 2004). Les mouches semblent jouer un rôle dans la contamination des poulaillers. Des études ont montré que les élevages situés dans des poulaillers utilisant des moustiquaires étaient significativement moins à risque d'être colonisés par *Campylobacter* que ceux de poulaillers témoins (Bahrndorff et al., 2013; Hald et al., 2007). Un autre insecte retrouvé fréquemment dans les élevages de volaille, le ténébrion (*Alphitobius diaperinus*), peut aussi être contaminé par *Campylobacter*, mais pour une durée inférieure à 72 heures, suggérant une faible probabilité de transmission peu probable entre les cycles d'élevage (Templeton et al., 2006). La transmission de la campylobactériose par l'eau environnementale est possible et sera couverte dans la prochaine section portant sur le rôle et l'importance de l'eau.

Le rôle et l'importance de l'eau dans la transmission

L'eau environnementale peut être contaminée par *Campylobacter* via la faune, les usines de traitements des eaux usées, les rejets d'abattoirs et le ruissellement à travers les sols contaminés (Pitkanen, 2013). La contamination récurrente des terres agricoles par *Campylobacter* proviendrait majoritairement de l'épandage de fumier (Brown et al., 2004; Ross et Donnison, 2006; Van Donkersgoed et al., 2009). L'eau de consommation contaminée a été incriminée dans plusieurs éclosions de campylobactériose dont certaines furent responsables de milliers de cas (Frost, 2001; Miller et Mandrell, 2005). La première éclosion de campylobactériose d'origine hydrique fut identifiée en 1978 à Bennington au Vermont (Haley et al., 1978). Depuis, plusieurs éclosions ont été rapportées, mais le nombre réel d'éclosions serait plus élevé que le nombre rapporté (Pitkanen, 2010). La majorité de ces éclosions ont été rapportées dans les pays nordiques avec la Finlande arrivant au premier rang (Pitkanen, 2013). La plus importante éclosion de campylobactériose d'origine hydrique rapportée fut au Danemark en 2010 où plus de 20 000 personnes furent contaminées par de l'eau provenant du système d'approvisionnement en eau potable (aqueduc) d'une municipalité (Gubbels et al., 2012). Entre 1974 et 2001, au Canada, 24 éclosions de campylobactériose seraient attribuables à l'eau de consommation contaminée (Schuster et al., 2005). La plus importante éclosion d'une maladie entérique d'origine hydrique survenue au Canada fut en 2000 à Walkerton

où *E. coli* et *Campylobacter* furent les agents pathogènes principalement impliqués dans la contamination d'un puits municipal par du fumier bovin de fermes avoisinantes, causant plus de 2 000 cas de maladie et 7 décès (Clark et al., 2003). Dans la majorité des éclosions de campylobactériose associées aux systèmes d'approvisionnement en eau potable, des défaillances et des surcharges associées à des précipitations extrêmes sont majoritairement en cause, plutôt qu'une désinfection inadéquate de l'eau destinée à la consommation (Breitenmoser et al., 2011; Laine et al., 2011; Risebro et al., 2007).

Outre les éclosions, *Campylobacter* est omniprésent dans les eaux environnementales et représenterait une source qui se manifeste surtout à travers des cas sporadiques de contamination. Nous entendons par eaux environnementales dans ce mémoire toute eau étant exposée à l'environnement naturelle ou affectée par l'être humain tels les lacs, rivières, marais, bassins de rétention d'eau, l'eau d'irrigation, etc. Il est difficile d'associer des cas de campylobactériose à la consommation d'eau contaminée provenant de puits à cause du manque d'informations et de la sous-déclaration des cas; il est d'autant plus difficile d'attribuer des cas à une exposition aux eaux environnementales et plus particulièrement aux eaux de baignade et aux activités récréatives (Olson et al., 2008). Des données issues d'une sollicitation d'experts révèlent que l'eau environnementale pourrait représenter une route de transmission responsable de 9 % des cas sporadiques de campylobactériose (Butler et al., 2015).

Survie de *Campylobacter* dans l'eau environnementale

Différentes souches de *Campylobacter* ne présentent pas les mêmes durées de survie selon différentes expériences investiguant cette propriété du microorganisme (Buswell et al., 1998; Duffy et Dykes, 2006). Les souches ayant comme origine la volaille pourraient être cultivées jusqu'à 52 jours après un entreposage dans l'eau à 4°C (Cools et al., 2003). Des souches d'origine aquatique, clinique et bovine survivraient généralement moins longtemps (jusqu'à 74 %) dans l'eau dans les mêmes conditions, suggérant que les souches provenant de la volaille pourraient jouer un rôle plus important dans la transmission de la campylobactériose à travers l'eau (Cools et al., 2003). Lors

d'inoculations de *Campylobacter* dans de l'eau de consommation embouteillée, le microorganisme serait capable de survivre et de maintenir une population stable pendant 9 jours à 4°C; cette survie serait même prolongée en présence de matières organiques (Tatchou-Nyamsi-Konig et al., 2007).

Dans un environnement aquatique, *Campylobacter* adopte une forme viable non cultivable (VBNC) qui est difficilement détectable par les méthodes de culture; on suspecte que les concentrations de *Campylobacter* rapportées dans différents environnements aquatiques basées sur de telles méthodes sont souvent sous-estimées (Oliver, 2005; Tatchou-Nyamsi-Konig et al., 2007). Différentes souches de différentes origines ont été ressuscitées après 64 jours en milieu aquatique en utilisant un bouillon d'enrichissement (Cools et al., 2003). Des débats dans la communauté scientifique ont eu lieu à savoir si cette forme indique une dégénérescence plutôt qu'un moyen de survie, mais une étude récente a démontré que des cellules de *C. jejuni* ayant adopté une forme VBNC suite à 3 semaines de séjour en milieu aquatique étaient capable d'adhérer à des cellules épithéliales de l'intestin, étant ainsi aptes à causer l'infection (Patrone et al., 2013). Lors du stade VBNC, les bactéries adoptent une réduction de leur activité métabolique et sont incapable de division cellulaire ou croissance normalement possible sur des milieux de culture : elles requièrent des milieux de culture enrichis (Barer et Harwood, 1999). L'expression de certains gènes continue d'avoir lieu durant ce stade : par exemple, le gène *cadF* impliqué dans l'adhésion et l'invasion était exprimé pendant 3 semaines dans des cellules de *C. jejuni* ayant entré un stade VBNC (Patrone et al., 2013). Il est bien connu que lorsque *Campylobacter* entre dans un stade VBNC, la bactérie adopte des changements morphologiques où elle adopte une forme coccoidale non motile (Moran et Upton, 1986). Par contre, ce même changement morphologique est aussi observé en laboratoire lors de la dégénération du microorganisme avant sa mort (Moran et Upton, 1986), ce qui continue à alimenter le débat sur la nature et le rôle de ce stade.

La survie de *Campylobacter* en milieu aquatique est difficilement explicable et semble varier d'une souche à l'autre et selon les caractéristiques de la matrice d'eau (Gonzalez et Hanninen, 2012). Il a été rapporté que *C. lari* survit davantage dans l'eau

environnementale comparativement à *C. jejuni* et *C. coli* (Obiri-Danso et al., 2001). Une autre étude rapporte l'inverse : *C. jejuni* survivrait mieux que *C. lari* en milieu aquatique, sauf à des températures de 15°C (Thomas et al., 1999). Ces études portent à croire que certains aspects génétiques, ou certaines souches de *Campylobacter*, seraient mieux adaptées pour la survie en milieu aquatique (Cools et al., 2003; Sopwith et al., 2008). L'exposition à la lumière du soleil aurait un effet néfaste sur la survie de *Campylobacter* en milieu aquatique (Rodriguez et Araujo, 2012; Sinton et al., 2007). La survie de *Campylobacter* en milieu aquatique est donc favorisée par l'absence de lumière, mais aussi par de faibles températures, de faibles taux d'oxygène et par une faible présence d'autres microorganismes indigènes réduisant la compétition (Cools et al., 2003; Thomas et al., 1999).

La capacité de *Campylobacter* à coloniser certains protozoaires comme *Acanthamoeba* pourrait aussi influencer sa capacité à survivre en milieu aquatique (Lehtola et al., 2006; Vieira et al., 2015). En effet, certaines études rapportent que *Campylobacter* peut se retrouver à l'intérieur des *Acanthamoeba* et il a été démontré que la présence de ces derniers en milieu aquatique augmenterait significativement la survie de *Campylobacter* (Axelsson-Olsson et al., 2005; Olofsson et al., 2013; Parry, 2004; Snelling et al., 2005). Il est intéressant de soulever des questions concernant l'internalisation de *Campylobacter* dans de ce protozoaire : est-ce que *Acanthamoeba* internalise (par exemple, par ingestion) *Campylobacter* et ce dernier serait capable de survivre au processus afin de coloniser le protozoaire, ou *Campylobacter* est-il apte par lui-même à s'internaliser dans *Acanthamoeba* utilisant des mécanismes d'internalisation spécifiques? Des études sur cette internalisation pourraient s'avérer intéressantes pour élucider ces interactions. D'autres organismes dont *Tetrahymena pyriformis*, *Dinobryon sertulia*, *Euglena gracilis* et *Naegleria americana* sont reconnus pour prolonger la survie de *Campylobacter* en co-culture; *D. sertularia* serait le meilleur candidat pour une plus longue survie (Axelsson-Olsson et al., 2010). Les algues du genre *Cladophora* sont aussi reconnues pour conférer une protection et être des sources de nutriments pour différentes bactéries entériques dont *Campylobacter* (Verhougstraete et al., 2010).

Enfin, les *Campylobacter* sont capables de survivre pour une période allant jusqu'à trois semaines en milieu aquatique grâce aux biofilms (Lehtola et al., 2006). Nous entendons par biofilm un regroupement d'une communauté microbienne formant un complexe procurant une matrice adhésive et protectrice. Dans le cas de *Campylobacter*, le microorganisme ne sécrèterait pas de polymères de sucres en tant que tel pour former la matrice en question, mais s'attacherait tout simplement en masse aux surfaces en agrégats et serait capable d'adhérer à des matrices mises en place par d'autres microorganismes (Teh et al., 2014). *Campylobacter* est capable de former des biofilms et de survivre dans ceux-ci sur différentes surfaces en milieu aquatique; plus particulièrement sur les surfaces composées de sédiments marins, de roches métamorphiques et de bois (Maal-Bared et al., 2012). Les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation du biofilm chez *Campylobacter* n'est pas encore complètement élucidé, mais on sait que que certaines protéines de surface, le flagelle et le quorum sensing seraient grandement impliqués (Asakura et al., 2007; Reeser et al., 2007). Les biofilms protégeraient *Campylobacter* des différents stress environnementaux tout en lui fournissant une source de nutriments. Certaines études pionnières concernant les biofilms suggèrent que ces derniers auraient également un rôle de protection contre la prédation provenant de différents protozoaires (Costerton et al., 1994; Decho, 1990). Par contre, des études plus récentes ont montré que la prédation réduisait les biomasses accumulées dans les biofilms (Hahn et Hofle, 2001; Huws et al., 2005). Une étude rapporte même que des flagellés hétérotrophes présents dans des biofilms n'influençaient pas la survie de certaines bactéries suggérant que les dynamiques de prédation pourraient être spécifiques dans certains cas (Hunt et Parry, 1998). Il est donc permis d'émettre l'hypothèse que la prédation pourrait dans certaines circonstances réduire la compétition bactérienne de manière à permettre à *Campylobacter* de survivre davantage dans les biofilms en milieu aquatique.

Fréquences et facteurs de variations de la contamination dans différentes sources d'eau environnementales

Plusieurs études rapportent la présence et parfois des dénombrements de *Campylobacter* dans les eaux environnementales (Hellein et al., 2011; Jokinen et al., 2012; Savill et al., 2001; Thomas et al., 1999). Il est difficile de comparer les résultats qualitatifs et surtout ceux quantitatifs d'une étude à l'autre étant donné le caractère fastidieux de *Campylobacter* et les différentes méthodes employées lors des analyses. De plus, il n'y a aucun standard dans la méthodologie employée pour la détection et quantification de *Campylobacter* dans l'eau, rendant difficile les comparaisons entre différentes études. La détermination de liens probables entre ces différentes sources d'eau contaminées et les cas humains de campylobactériose représente donc un défi limité par les techniques d'investigation et le caractère fragile du microorganisme.

Eaux de captage et de surface

Les eaux de captage sont celles destinées à être traitées pour ensuite être redistribuées à la population pour des fins de consommation. Ces eaux proviennent de rivières et de lacs dans la majorité des cas, ou d'eaux de surface. Dans la présente section, il faut être conscient du fait que les différentes études présentées utilisent des méthodes variées et que les volumes d'eau filtrés ne sont pas toujours les mêmes : ces caractéristiques protocolaires influencent beaucoup la sensibilité de détection et sont très importantes lorsqu'on compare différentes études.

La fréquence de détection de *Campylobacter* dans des échantillons d'eaux de captage provenant de 3 différentes stations d'un lac en Ontario était en dessous de 10 % (Edge et al., 2013). Une étude similaire réalisée en Colombie-Britannique rapporte quant à elle 45 % de détection dans de telles sources d'eau en provenance de rivières (Jokinen et al., 2010). Une étude de plus grande envergure réalisée en Ontario et comprenant 24 sites de collecte a évalué à 11 % la fréquence de détection de *Campylobacter* dans l'eau environnementale; une augmentation notable serait attribuable à des températures ambiantes plus fraîches et à l'application de fumier dans les champs environnants,

particulièrement pendant les saisons du printemps et de l'automne (Wilkes et al., 2011). En France, une étude rapporte que 50 % des échantillons d'eau de captage étaient contaminés, provenant de 5 stations échantillonnées mensuellement au courant d'une année dans une rivière (Denis et al., 2011). En Nouvelle-Zélande, le pays ayant le plus grand nombre de cas de campylobactériose déclarés, l'eau de captage serait contaminée dans 60 % des échantillons et les concentrations atteindraient un maximum de 110 cellules/L en utilisant la méthode MPN (Savill et al., 2001). Une moyenne de 70 UFC/L est rapportée pour une station d'eau de captage étudiée en Ontario utilisant une PCR quantitative (Van Dyke et al., 2010). Aux États-Unis, deux études portant sur les eaux de surface fortement influencées par des rejets d'eaux usées rapportent des concentrations de *Campylobacter* pouvant aller jusqu'à 4 600 000 cellules/L par PCR quantitative et 595 000 cellules/L par ensemencement direct (Hellein et al., 2011; Vereen et al., 2007). Une étude africaine utilisant une méthode de semi-quantification par enrichissement et culture rapporte jusqu'à 1 000 UFC/L présent dans les eaux de surfaces (Diergaardt et al., 2004). Ces études montrent qu'il y a bel et bien présence de *Campylobacter* dans les eaux de captage à différentes concentrations : l'implantation d'usines de traitement des eaux est donc nécessaire pour éliminer cette présence de *Campylobacter*, mais aussi de plusieurs autres pathogènes et polluants chimiques dans l'eau potable. À ce jour, aucune étude n'a détecté de *Campylobacter* provenant d'eau de captage traitée destinée à la consommation (la section « Stratégies de désinfections » couvre les différentes méthodes de traitement de l'eau potable).

Eaux récréatives

Les eaux récréatives sont connues comme des sources potentielles de *Campylobacter*, et représentent d'autant plus un intérêt en santé publique, car les humains sont en contact direct avec celles-ci. Ces dernières sont souvent assujetties à des normes gouvernementales portant sur la qualité microbienne afin de protéger leurs utilisateurs. Au Québec, un système de surveillance volontaire (le programme Environnement-Plage) mis en place pour s'assurer d'une bonne qualité microbiologique des plages ne permet pas de vérifier la présence de *Campylobacter* directement, mais utilise plutôt des

bactéries indicatrices de contamination fécale (MDDELCC, 2014). Les coliformes totaux et les coliformes fécaux, tels *E. coli* et *Enterococcus*, sont souvent isolés et quantifiés par méthode de culture et analysés en tant qu'indicateurs dans ces programmes de surveillance. Au Québec, une plage comprenant moins de 200 coliformes fécaux/100ml est considérée comme une plage de qualité microbienne satisfaisante pour la récréation. Par contre, ces indicateurs de qualité microbienne de l'eau ne corrélent pas toujours avec les concentrations de *Campylobacter* en milieu aquatique (Hellein et al., 2011; St-Pierre et al., 2009). Une étude en Nouvelle-Zélande a montré une corrélation entre les concentrations d'*E. coli* et *Campylobacter* qui a mené à un changement dans les lignes directrices concernant la surveillance de la qualité microbienne des eaux récréatives du pays (Till et al., 2008). La baignade en eaux récréatives a été identifiée comme un facteur de risque de campylobactériose (Denno et al., 2009; Doorduyn et al., 2010; Schonberg-Norio et al., 2004; Unicomb et al., 2008). Les concentrations dans des eaux de baignade en Finlande peuvent atteindre 100 UFC/L selon des méthodes semi-quantitatives utilisant des méthodes de culture avec enrichissements (Hokajarvi et al., 2013). Étant donné la dose infectieuse de *Campylobacter* de quelques centaines de cellules, ceci impliquerait que l'ingestion de plusieurs litres d'eau lors de la baignade serait requise pour causer une infection. Un adulte va ingérer en moyenne 16 ml d'eau lors de 45 minutes de baignade et un enfant 37 ml (Dufour et al., 2006). Par contre, différentes hypothèses concernant la distribution des *Campylobacter* dans l'eau qui pourraient s'agglomérer en biofilms ou sur des particules de matières organiques, pourraient faire en sorte qu'un petit volume d'eau peut contenir plusieurs bactéries et être apte à causer une infection.

Peu d'études ont utilisé des méthodes moléculaires pour déterminer les concentrations de *Campylobacter* dans les eaux récréatives. Une telle étude au Michigan rapporte des concentrations exorbitantes allant au-delà des 10^7 cellules/L dans des échantillons d'eau de plage (Oster et al., 2014). Dans cette étude, la sélection de ces plages était basée sur une déficience de la qualité de l'eau de certaines régions. La concentration réelle de *Campylobacter* viable dans les de cette étude pourrait être plus basse étant donné le fait que la technique employée quantifie l'ADN total présent dans l'échantillon: des fragments d'ADN de bactéries mortes ont pu être amplifiés et considérés dans le calcul

des concentrations. Une étude réalisée par notre groupe de recherche en Estrie et Montérégie au Québec utilisant une PCR quantitative combinée avec le propidium monoazide (PMA), qui permet de quantifier sélectivement les cellules viables, rapporte quant à elle des concentrations très faibles de *Campylobacter* dans les différentes plages analysées (Guy et al., 2015; manuscrit en préparation). Les concentrations rapportées de ces études énumérées nous portent à croire que certains facteurs environnementaux comme les précipitations ou qu'une source de contamination externe relevant de la proximité aux fermes pourraient grandement augmenter les charges de *Campylobacter* dans les eaux récréatives et poser davantage de risques pour la population.

Eaux usées

Campylobacter semble être présent avec une certaine constance dans les eaux d'égout, où il semble présenter une forte diversité génotypique (Koenraad et al., 1995). D'après une étude réalisée par Wery et al. (2008), les résultats qPCR indiquent des concentrations variant de 1 à 2 500 cellules/L pour l'eau usée non traitée. Des données MPN montrent des concentrations comparables à celles obtenues par qPCR (Betaieb et Jones, 1990). Les ouvriers travaillant dans les usines de traitement des eaux usées sont davantage exposés à *Campylobacter*, mais aucune étude n'a réellement investigué la magnitude de ce risque (Rinsoz et al., 2009).

Les différents types de procédés que les usines utilisent pour traiter les eaux usées varient dans leur efficacité à réduire les concentrations de *Campylobacter*. Étant donné que la plupart des microorganismes se lient sur des particules solides, une sédimentation primaire réduirait de 78 % le nombre de *Campylobacter* (Arimi et al., 1988). Le système des boues activées serait capable de réduire les concentrations de *Campylobacter* de 4 à 100 fois; aussi, *Campylobacter* est très sensible à l'exposition aux UVs, à l'oxygène et à la désinfection par le chlore qui sont des méthodes couramment employées dans le traitement des eaux usées (Koenraad et al., 1994; Stampi et al., 1999). Une étude par Rechenburg et Kistemann (2009) montre que les effluents de différentes usines de traitements des eaux usées contiennent entre 0 et 1 000 UFC/100ml d'eau, mais ne

contribuerait pas à augmenter la concentration de *Campylobacter* totale du cours d'eau en aval de ce dernier. Les pluies causant des inondations peuvent causer un débordement des eaux usées pouvant contaminer les cours d'eau (Rechenburg et Kistemann, 2009; Vestergaardm et al., 2007); les concentrations de *Campylobacter* peuvent atteindre jusqu'à 16 600 UFC/L dans les eaux d'inondation et le risque de contracter une campylobactériose serait 1.5 fois plus élevé chez un enfant jouant dans l'eau dans la rue qu'un piéton (ten Veldhuis et al., 2010).

Eaux de puits

Les gens vivant en milieu rural s'approvisionnent en eau potable majoritairement à partir de puits privés sur leur résidence. Le rapport des cotes établi par une étude en Colombie-Britannique montre que les gens utilisant un puits privé seraient jusqu'à 5 fois plus propices à être infectés par *Campylobacter* que les gens utilisant des systèmes municipaux en approvisionnement d'eau (Galanis et al., 2014; Uhlmann et al., 2009). Pourtant, la contamination par *Campylobacter* dans les eaux de puits semble faible, voire même improbable (Brennhovd et al., 1992; Won et al., 2013). Une étude réalisée au Québec dans les puits d'eau potable privés des résidents des Cantons-de-l'Est rapporte une prévalence de 10 % avec un niveau de contamination moyen se situant entre 1 et 40 cellules de *Campylobacter* par litre (St-Pierre et al., 2009). Par contre, aucune différence significative n'aurait été trouvée entre les cas de campylobactériose et un groupe contrôle concernant la qualité microbiologique (incluant la détection de *Campylobacter*) de l'eau de consommation provenant de puits privés chez les enfants de moins de 5 ans au Québec (Levallois et al., 2014). Des différences dans les densités agricoles ou d'autres facteurs environnementaux dans la zone de captage des puits privés étudiés pourraient expliquer pourquoi certains semblent plus contaminés dans une étude plus que dans l'autre.

Eaux d'irrigation

L'eau d'irrigation utilisée dans les fermes cultivant différents fruits et légumes provient souvent de cours d'eau ou encore d'une accumulation d'eau de pluie dans un étang ou un

bassin de rétention. Des installations sont souvent mises en place pour recycler ou réutiliser cette eau à travers l'ensemble des terres agricoles d'une ferme donnée. Une étude en Floride rapporte une fréquence de détection de *Campylobacter* s'élevant à 19.3 % dans des étangs d'irrigation de 10 fermes maraîchères et cette fréquence serait plus élevée au printemps; les concentrations rapportées atteignent les 140 cellules de *Campylobacter* par litre (Gu et al., 2013). Une étude en Malaisie rapporte que l'eau d'irrigation n'est pas contaminée par *Campylobacter* contrairement aux sols, fumiers et légumes provenant de deux fermes (Chai et al., 2009). Une étude belge rapporte une fréquence de contamination de 22.5 % des eaux d'irrigation de différents sites utilisées dans des champs de laitues avec une fréquence plus élevée en juin (66 %) (Holvoet et al., 2015). Plus spécifiquement, l'eau utilisée lors de la récolte provenant d'un bassin d'eau d'irrigation non protégé (aucune structure empêchant une contamination de l'extérieur) dans un champ de laitues a montré une fréquence de détection de *Campylobacter* s'élevant à 64 % (Holvoet et al., 2015). Par contre, les légumes ne semblent pas être une source de transmission de la campylobactériose importante tel que mentionné plus tôt dans le volet portant sur les voies de transmission. Les fréquences et niveaux de contamination semblent donc varier d'un endroit à l'autre et ceci pourrait être explicable par des différences dans différents facteurs environnementaux ou normes sanitaires suivies en production agricole.

L'irrigation est aussi utilisée pour alimenter les pâturages en eau. En Idaho, la prévalence de *Campylobacter* sur un échantillonnage de 30 étangs d'irrigation provenant de fermes laitières était de 70 % et les concentrations moyennes détectées se situaient autour des 3.7Log cellules/ml déterminées par PCR en temps réel (Dungan et al., 2012). L'irrigation contribuerait à la contamination du sol par *Campylobacter* lorsque du fumier bovin est appliqué dans des pâturages; cependant, les niveaux de contamination détectés dans le ruissellement de ces eaux dans le sol seraient faibles, atteignant des concentrations de 4 cellules/L basées sur des techniques de culture utilisant le MPN (Close et al., 2010). Certaines méthodes employées pour irriguer les champs peuvent générer des quantités d'aérosols importantes, représentant un risque de transmission de la campylobactériose plus élevé pour les gens habitant en proximité de ces champs et pour les gens qui sont

exposés pendant des périodes dépassant 1 heure ou exposés de manières répétées sur plusieurs jours (Dungan, 2014).

Stratégies de désinfection

Eau potable

Lorsqu'on regarde les stratégies de traitement des eaux potables couramment employées, la première étape consiste en un tamisage pour enlever les gros débris suivie d'une étape de clarification où, à l'aide d'ajouts de produits comme le sel d'alun, les particules en suspensions sont agglomérées et éliminées par décantation. Ensuite, l'eau clarifiée est filtrée à travers un lit filtrant composé généralement de sable de silice qui retient la majorité des bactéries et autres matières en suspension restantes. L'implantation de systèmes de traitement par UV dans certaines usines de traitement des eaux potables à cette étape permet d'améliorer la qualité microbienne de l'eau et serait particulièrement efficace pour détruire complètement *Campylobacter* en plus d'autres microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme (Hijnen et al., 2006). L'usage de lampes ultraviolettes disponibles commercialement (radiation de 254 nm) serait suffisant pour éliminer une contamination par *Campylobacter* de l'eau (Butler et al., 1987). Dans certaines usines de traitement de l'eau potable, un processus d'ozonation s'en suit, permettant d'oxyder les bactéries et virus ayant résisté à l'étape de filtration. Enfin, une étape de chloration permet d'empêcher la prolifération microbienne dans le réseau de distribution. Les stratégies de chloration employées dans les usines de traitements des eaux afin de réduire les charges de coliformes sont d'autant plus efficaces en ce qui regarde *Campylobacter* (Blaser et Cody, 1986). Aucune étude à ce jour n'a détecté *Campylobacter* dans l'eau potable issue de telles usines de traitement. Par contre, il a été montré que des bris dans les usines de traitements des eaux potables peuvent être associés à d'importantes éclosions (Clark et al., 2003; Pitkanen et al., 2013). La désinfection solaire de l'eau est une méthode particulièrement utilisée dans les pays en voie de développement et reconnue par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) en ce qui a trait à la désinfection de l'eau potable. Les contenants d'eau potable sont directement

exposés au soleil : 20 minutes d'exposition à une radiation de 1 050 watts/m² serait suffisante pour réduire les charges d'au moins 4 log (Boyle et al., 2008).

Aliments

Campylobacter ne semble pas être résistant aux désinfectants couramment utilisés dans la vie de tous les jours, donc une désinfection des surfaces avant de manipuler les aliments éliminerait les *Campylobacter* présents sur celles-ci. Des températures au-delà de 60°C détruisent toute population de *Campylobacter* sur diverses matrices en quelques minutes seulement (Garénaux et al., 2008). Une irradiation des aliments de moins de 1kGy est suffisante pour prévenir une infection à *Campylobacter* (Lewis et al., 2002). Une exposition de 3 minutes aux micro-ondes (1380 watts) élimine *Campylobacter* dans le lait contaminé; la température atteint 71.1C° (Choi et al., 1993). Une haute pression hydrostatique de 400 MPa réduit de manière importante et significative les populations de *Campylobacter* dans différents aliments contaminés (Solomon et Hoover, 2004). *Campylobacter* ne survit pas bien dans des conditions où le pH est inférieur à 4. L'ajout de sels ou d'acides ascorbiques réduit la contamination à *Campylobacter*. Le chlore est aussi utilisé, notamment aux États-Unis, pour rincer les carcasses afin de réduire la charge bactérienne de *Campylobacter* à 0.5 log UFC (unité formant colonie)/ml (Bashor et al., 2004). Le trisodium triphosphate (TSP) est aussi utilisé pour réduire de 1.2-1.5 log les populations de *Campylobacter* présentes sur les carcasses de poulet en plongeant ces dernières dans une solution de TSP à 10 % à 50°C pendant 15 secondes (Slavik et al., 1994).

D'autres stratégies plus innovatrices pour la réduction de la contamination sont encore étudiées comme l'ajout certains additifs alimentaires d'intérêt. *Lactobacillus salivarius* produirait une bactériocine capable de réduire la charge de *Campylobacter* chez un poulet lorsque ce dernier est colonisé par *L. salivarius* (Stern et al., 2006). La lactoperoxydase provenant du lait cru aurait pour effet de générer des composés antimicrobiens lorsqu'ajoutée à du lait contaminé de manière à réduire grandement la survie de *Campylobacter* (Beumer et al., 1985). D'autres constituants provenant du clou de girofle

et l'origan (Friedman et al., 2002), du thé (Diker et al., 1991) et de la bergamote (Fisher et Phillips, 2006) ont un effet antimicrobien sur *Campylobacter*.

Méthodes de détection et quantification

Concentration d'échantillons d'eau par filtration ou centrifugation

Étant donné les concentrations relativement faibles de *Campylobacter* dans les eaux environnementales, il est important de concentrer la biomasse contenue dans des quantités suffisantes d'eau afin d'être en mesure de détecter, cultiver ou quantifier ce microorganisme. La centrifugation et la filtration sont des techniques couramment utilisées pour concentrer la biomasse des échantillons d'eau. Les différentes techniques de filtration peuvent influencer le recouvrement des *Campylobacter* présents dans l'eau environnementale ainsi que l'amplification d'ADN au niveau moléculaire. Suite à la filtration d'un échantillon d'eau environnementale, le filtre peut être placé en milieu de culture pour isolement bactérien ou l'ADN déposé sur le filtre peut être extrait à l'aide de trousse commerciales adaptées tels le Power Water (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, Californie, États-Unis) ou le SurePrep Water RNA/DNA Purification Kit (Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis). Généralement, des quantités raisonnables d'eau (moins de 1 litre) sont requises pour quantifier *Campylobacter* à l'aide de techniques de filtration, mais il est aussi possible d'isoler *Campylobacter* par centrifugation lorsque plusieurs litres d'eau sont nécessaires pour l'analyse (Fricker et Park, 1989; Khan et al., 2013). Cette technique peut s'avérer particulièrement efficace lorsque les échantillons d'eaux sont très turbides ou contiennent des sédiments, par exemple les eaux usées.

Pour isoler *Campylobacter* dans l'eau environnementale afin d'extraire son ADN, le type de pompe et de filtre vont influencer le taux de récupération d'ADN issus des cellules. La pression exercée par la pompe et la grosseur des pores dans les filtres vont déterminer si les bactéries sont bien retenues par le filtre. Des filtres de 0.45µm sont généralement utilisés pour isoler *Campylobacter* des eaux environnementales (Bopp et al., 2003;

Jokinen et al., 2012; Levesque et al., 2011; Moreno et al., 2003; Savill et al., 2001; Vereen et al., 2013). Par contre, il est possible que certaines cellules de *Campylobacter* réussissent à passer à travers des filtres de 0.45 μ m (Donnison, 2003), c'est pourquoi d'autres groupes de travail utilisent des filtres ayant des pores de 0.22 μ m (Schmidt et al., 2013; Wong, 2009). La pression de succion générée par la pompe demeure donc importante pour s'assurer qu'un minimum de *Campylobacter* passe à travers les filtres, surtout lorsque les pores ont 0.45 μ m de diamètre. L'utilisation de filtres de 0.22 μ m peut devenir problématique lorsque les échantillons d'eau sont turbides étant donné la possibilité d'une saturation rapide des pores causant la technique de filtration à devenir rapidement exigeante en temps et main d'œuvre. Il est alors possible de faire des préfiltrations, par exemple filtrer l'échantillon à travers un filtre de 6 μ m en premier lieu, suivi d'un filtre de 0.6 μ m et 0.45 μ m (Blaser et Cody, 1986). Le taux de récupération suite à ces passages à travers différents filtres est alors similaire à un simple passage à travers un filtre de 0.45 μ m, qui s'avère être une technique de choix lorsque l'eau est peu turbide. Dans un même ordre d'idée, les matériaux composant le filtre vont influencer le type de bactéries retenues et ont un effet inhibiteur au niveau de l'amplification de l'ADN lors de la PCR. Les filtres composés de polytétrafluoroéthylène (PTFE) semblent mieux récupérer des petites quantités de cellules de *Campylobacter* et de faibles quantités d'ADN sont mieux amplifiées par la polymérase comparativement à d'autres filtres composés de difluorures de vinylidène ou de mélanges d'ester de cellulose (Oyofe et Rollins, 1993). Par contre, ces constatations dépendent du type d'eau, des techniques utilisées en laboratoire et des applications visées suite à la filtration.

La nature et les quantités d'eau environnementales filtrées sont des facteurs importants influençant la dénombrement de *Campylobacter* si des techniques de compte de colonies sont utilisées pour la quantification. Ainsi, la filtration de 10ml et 100ml a permis de dénombrer des cellules de *Campylobacter* d'échantillons d'eaux d'étang, mais aucune cellule n'a été dénombrée lorsque 1 000ml étaient filtrés : ceci fut expliqué par le fait que d'autres microorganismes présents lors de l'étape d'enrichissement empêchaient la croissance des *Campylobacter* par compétition (Abulreesh et al., 2006). De plus, l'application du qPCR sur de petits volumes d'eau filtrés comportant des concentrations

très faibles peut conduire à des résultats faussement négatifs lorsqu'on extrapole les concentrations sur des plus gros volumes, tandis que des concentrations trop élevées provenant de grands volumes d'eau filtrés pourraient contenir beaucoup d'inhibiteur de la PCR dépendamment de la source d'eau analysée. Il est donc important de se pencher sur ces technicités protocolaires et la nature de l'eau à analyser afin de mettre en place un protocole apte à répondre aux buts de recherche fixés.

Nous aimerions faire part d'une réflexion concernant la présence potentielle de *Campylobacter* dans les protozoaires, ou en complexe avec des particules plus grosse que la taille d'une bactérie, où une étape de pré-filtration pour réduire la turbidité de l'eau pourrait éliminer ces *Campylobacter* si le filtre utilisé pour la pré-filtration n'est pas analysé. Par contre, lorsqu'une telle étape de préfiltration n'est pas nécessaire, les grosses particules et protozoaires sont trappés sur les filtres 0.45µm et l'ADN de *Campylobacter* peut ensuite être extrait. L'extraction d'ADN à partir de filtres contient souvent une étape de battage avec des particules fines de verre qui viennent briser les parois cellulaires des protozoaires et autres matières solides afin de libérer les *Campylobacter* ainsi que leur ADN.

Milieux de culture

Les milieux de culture employés actuellement pour l'isolement de *Campylobacter* sont issus d'un long historique de développement et de modifications afin d'élaborer des milieux sélectifs pour les différentes espèces de *Campylobacter* et inhibant la compétition microbienne (Corry et al., 1995). Ces milieux de culture furent développés pour des fins d'isolement à partir de selles de patients; le bouillon d'enrichissement Preston suivi d'une sélection sur gélose mCCDA (de l'anglais, « modified Charcoal-Cefoperazone-Deoxycholate Agar) serait la méthode la plus efficace pour isoler les *Campylobacter* thermotolérants et réduire la compétition des autres microorganismes de la flore intestinale (Bolton et al., 1983; Hutchinson et Bolton, 1983; Merino et al., 1986; Piersimoni et al., 1995).

Bolton et Robertson (1982) ont d'abord décrit un bouillon d'enrichissement Preston sélectif basé sur la gélose de Skirrow. Ce bouillon contient de la triméthoprime et de la polymyxine B comme la gélose Skirrow, mais la vancomycine est remplacée par de la rifampicine en raison de sa meilleure capacité à inhiber les bactéries à Gram positif. Par contre, la rifampicine serait toxique pour les cellules faiblement endommagées, rendant ce milieu non applicable lorsque l'on soupçonne une faible présence de *Campylobacter* où les cellules sont endommagées ou en stade viable non-cultivable (Humphrey et Cruickshank, 1985). Des suppléments de pyruvates de sodium, métabisulphites de sodium et de sulfates ferreux sont maintenant ajoutés pour favoriser la croissance de *Campylobacter* de manière à contrer les effets phototoxiques et à augmenter l'aérotolérance (Chou et al., 1983). L'effet de la température et du pH lors de l'enrichissement furent démontrées par Park et al. (1983), qui ont conclu qu'une température de 42°C et un pH de 7.0 permettraient une sensibilité de détection maximale des *Campylobacter*. Le sang fut ajouté au milieu pour ses capacités à neutraliser des dérivés toxiques de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène (Bolton et al., 1984).

Un nouveau bouillon Bolton a plus tard été décrit comme un milieu d'enrichissement qui diffère du Preston par ses capacités à ressusciter des cellules endommagées présentes en faible quantité dans des échantillons de nourriture et environnementaux (Bolton, 1985). Park et Sanders (1991) ont proposé un bouillon d'enrichissement contenant de la vancomycine et de la triméthoprime incubé à 32°C pendant 4 heures, suivi de l'ajout de céfopérazone ainsi que de cycloheximide (inhibiteur de levures), puis incubé à 37°C pendant deux heures, le tout suivi d'une augmentation de température à 42°C pendant 42 heures. Le fait de varier les températures et les temps d'incubation à travers les ajouts d'antibiotiques minimise l'effet inhibiteur de ces derniers sur la croissance de *Campylobacter*.

Pour l'application à l'eau environnementale, les bouillons Preston et Bolton sont les plus fréquemment utilisés et plusieurs études décrivent des conditions d'incubation optimales pour augmenter le taux d'isolement de *Campylobacter* en utilisant ces milieux dans différents types d'eau environnementale (Daczowska-Kozon et Brzostek-Nowakowska,

2001; Hu et Kuo, 2011; Jokinen et al., 2010; Khan et al., 2013; Levesque et al., 2011). Le milieu d'enrichissement sélectif Bolton s'avère être plus efficace dans les matrices où les concentrations de *Campylobacter* sont faibles (Baylis et al., 2000; Diergaardt et al., 2004; Sails et al., 2003). Le milieu Preston est davantage reconnu pour ses capacités à réduire la compétition microbienne comparativement au milieu Bolton (Ugarte-Ruiz et al., 2015). Cependant, l'isolement de *Campylobacter* à partir d'eaux usées ne requière pas toujours une étape d'enrichissement afin d'augmenter le taux de détection à travers différents échantillons : l'ensemencement direct sur milieu hautement sélectif CASA (Biomérieux, Craponne, France) s'est avéré aussi efficace (Ugarte-Ruiz et al., 2015). L'emploi d'un bouillon Preston dans de telles situations aurait par contre comme effet d'augmenter le taux d'isolement de *C. coli* comparativement aux autres espèces de *Campylobacter* dont *C. jejuni* (Ugarte-Ruiz et al., 2015). *C. jejuni* et *C. lari* sont détectés plus efficacement à des températures d'incubation de 42°C contrairement à *C. coli* et d'autres *C. spp.* où une température d'incubation de 37°C est plus efficace, d'où la suggestion d'utiliser les deux températures d'incubation en parallèle lors de l'isolement de *Campylobacter* à partir d'eau environnementale (Khan et al., 2013). Les temps d'incubation semblent aussi influencer l'efficacité d'isolement de *Campylobacter* : un temps d'incubation de 24 heures au lieu de 48 heures dans un milieu d'enrichissement Bolton générerait de plus grandes concentrations de *Campylobacter* (Diergaardt et al., 2004; Madden et al., 2000). Ces observations portent à croire que l'emploi de différents bouillons et géloses ainsi que différentes conditions d'incubation pour l'isolement de *Campylobacter* peuvent influencer l'efficacité d'isolement et la représentativité des populations de *Campylobacter* au niveau de l'espèce dans différents types d'eau environnementale (Diergaardt et al., 2004; Jokinen et al., 2012; Khan et al., 2013; Ugarte-Ruiz et al., 2015).

L'isolement de *Campylobacter* dans les environnements aquatiques représente un certain défi : l'exposition à différents stress confère un état particulier à *Campylobacter* où il adopte une forme viable non-cultivable (Murphy et al., 2006), cette dernière décrite dans une section précédente portant sur la survie de *Campylobacter* dans l'eau environnementale. L'approche habituelle pour isoler *Campylobacter* à partir d'échantillons d'eau implique la concentration de ces derniers par méthodes de filtration

sur filtres (telles que décrites plus tôt), d'une incubation de ces filtres dans un bouillon d'enrichissement sélectif à 37°C suivi de 42°C et de stries de ces cultures en bouillon sur des géloses sélectives (Percival et al., 2004). L'ensemencement direct sur gélose sélective s'est avéré inefficace pour des échantillons d'eau (Hill et Grimes, 1984) d'où l'importance d'utiliser un milieu d'enrichissement sélectif afin de ressusciter les cellules de *Campylobacter* (Abulreesh et al., 2014; Bolton et Robertson, 1982; Rosef et al., 2001; Stanley et al., 1998). La méthode standard de détection des *Campylobacter* thermotolérants à partir de matrices d'eau est une filtration sur membrane suivie d'un enrichissement et de la détection par passage sur milieu mCCDA (Standardization ISO, 2014).

Nombre le plus probable (NPP)

La méthode du nombre le plus probable (MPN, de l'anglais « most probable number ») est l'utilisation de cette technique standard modifiée afin de faire une estimation de la densité microbienne basée sur la loi de Poisson. Afin d'appliquer la technique du MPN pour des échantillons d'eau, il faut filtrer une série de différents volumes d'eau ayant préalablement été dilués suivant un certain facteur de dilution, enrichir les filtres et faire un passage sur un milieu sélectif comme mCCDA. Alternativement, un échantillon d'eau peut être centrifugé pour ensuite suspendre le culot et faire une dilution en série qui sera inoculée dans un milieu d'enrichissement (Khan et Edge, 2007). On évalue ensuite le nombre et la répartition des tubes positifs afin d'attribuer le nombre le plus probable de bactéries. La technique du MPN a été utilisée fréquemment pour quantifier *Campylobacter* dans différentes sources d'eau (Eyles et al., 2003; Henry et al., 2015; Khan et al., 2014; Savill et al., 2001; Schmidt et al., 2013; Signor et al., 2005; Williams et Ebel, 2012). Le désavantage de cette technique est qu'elle est laborieuse, entraînant davantage de temps et de coûts aux techniques moléculaires. De plus, étant donné le caractère fastidieux de *Campylobacter* et sa possibilité d'adopter la forme VBNC en milieu aquatique, la sensibilité ainsi que la limite de détection de la technique du MPN peuvent être affectées négativement: les résultats issus de techniques de MPN appliquées

pour la quantification de *Campylobacter* pourraient être une sous-estimation de la réalité (Duarte et al., 2015).

Méthodes de détection et quantification moléculaires

Les méthodes de détection moléculaires sont reconnues pour être faciles à utiliser et moins coûteuses que les méthodes de culture. Il existe une grande variété de méthodes moléculaires permettant la détection et la quantification de microorganismes; les méthodes présentées dans cette revue sont celles impliquant la réaction en chaîne par polymérase (PCR, de l'anglais « polymerase chain reaction ») et représentent les plus couramment employées dans les investigations portant sur *Campylobacter*.

Réaction en chaîne par polymérase (PCR)

La PCR est basée sur une répétition de 2 ou 3 cycles de différentes durées et températures donnant lieu à une réaction enzymatique où une polymérase va dédoubler l'ADN présent en solution. La réaction débute par un cycle de dénaturation où une haute température permet de séparer les brins d'ADN, suivi par un cycle d'appariement de paires de bases où les amorces spécifiques, par complémentarité de leur séquence d'ADN, s'hybrident sur les brins d'ADN séparés. Enfin, un cycle de polymérisation a lieu, où la polymérase vient reconnaître les complexes hybrides entre les amorces et la matrice d'ADN et synthétise le brin complémentaire de l'ADN de la matrice formant ainsi un amplicon. Les solutions post-PCR contiennent des amplicons, qui peuvent être détectés lorsqu'on ajoute des colorants intercalant aux doubles brins d'ADN ou lorsqu'ils sont soumis aux ultraviolets en émettant de la fluorescence; les produits de la réaction peuvent être placés sur gel d'agarose afin de migrer vers un pôle ayant une charge positive de manière à permettre une distinction des fragments d'ADN par leur longueur. La PCR représente donc une application biotechnologique importante en permettant une détection sensible et spécifique tout en réduisant grandement le temps de main d'œuvre comparativement aux méthodes de culture (Tallon et al., 2005; Theron et Cloete, 2002). La PCR est de plus en plus utilisée en clinique pour un criblage rapide de *Campylobacter* présentant une

meilleure sensibilité de détection que les techniques de culture classiques (Buchan et al., 2013; Onori et al., 2014; Perry et al., 2014). La PCR ciblant l'ADN génomique détecte la totalité de l'ADN, incluant celui provenant des cellules mortes. Il est important de cibler des séquences d'ADN spécifiques à un microorganisme d'intérêt afin de rendre sa détection efficace; des outils d'analyses génomiques sont disponibles pour un tel exercice et relèvent du domaine de la bio-informatique.

La PCR est un outil intéressant pour la détection *Campylobacter* dans l'environnement étant donné la capacité de cette bactérie à entrer dans un stade VBNC en milieu aquatique et sa difficulté d'isolement par méthode de culture (Abulreesh et al., 2006; Tholozan et al., 1999). Pour détecter le genre *Campylobacter*, des essais PCR ciblant des régions spécifiques du gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal ont été utilisés puisque cette région est génétiquement conservée de manière à présenter des variations spécifiques au genre; d'autres séquences dans la sous-unité 16S présentent des variations spécifiques à l'espèce (Bang et al., 2002; Hellein et al., 2011; Josefsen et al., 2004; Moreno et al., 2003). Beaucoup plus rarement, d'autres groupes de recherche ont utilisé la PCR ciblant des régions d'ADN codant pour la sous-unité 23S de l'ARN ribosomique (Engvall et al., 2002), la région non-codante (ITS: « internal transcribed spacer ») entre les gènes codant pour les sous-unités 16S et 23S de l'ARN ribosomal (Khan et Edge, 2007) et des gènes codant pour des protéines constitutives du flagelle *flaA* et *flaB* (Moore et al., 2001; Waage et al., 1999). Plusieurs études ont mis au point des essais PCR ciblant différentes séquences d'ADN de gènes spécifiques à certaines espèces de *Campylobacter* comme *glyA* (Jensen et al., 2005), *gafF* et *ceuE* (Hellein et al., 2011; Nayak et al., 2005) et *cpn60* (Banihashemi et al., 2012; Chaban et al., 2009; Hill et al., 2006). Il est possible d'utiliser la PCR pour faire des détections simultanées de différentes espèces de *Campylobacter* au cours d'une même réaction PCR : la PCR multiplexe contient plusieurs paires d'amorces ciblant différents gènes spécifiques à différentes espèces de *Campylobacter* (Denis et al., 1999; Klena et al., 2004; Wang et al., 2002; Yamazaki-Matsune et al., 2007). La PCR multiplexe permet une détection rapide en une seule réaction et peut aussi être appliquée pour vérifier la présence de multiples pathogènes entériques s'avérant un outil prometteur en clinique (Coupland et al., 2013; Liu et al.,

2012; Liu et al., 2014). La PCR peut être utilisée en combinaison avec les techniques d'isolement par culture afin de faire une différenciation plus précise des espèces (Abu-Halaweh et al., 2005; Abulreesh et al., 2006). L'usage de la PCR pour la détection de *Campylobacter* suite à un enrichissement aurait pour effet de réduire les résultats faussement négatifs dus à la croissance de bactéries non spécifiques sur milieux solides qui masquent la présence de *Campylobacter* (Hernandez et al., 1995; Jacobs-Reitsma et al., 2008; Moore et al., 2001; Nam et al., 2005; Sails et al., 2003; Tambalo et al., 2012; Waage et al., 1999).

PCR en temps réel

La PCR en temps réel (qPCR, de l'anglais « quantitative polymerase chain reaction ») est une réaction PCR avec l'ajout de molécules fluorescentes permettant d'émettre une quantité de fluorescence proportionnelle à la quantité d'ADN formée au cours de la réaction. Une lecture de cette fluorescence s'effectue en temps réel : cette dernière adopte une courbe exponentielle au cours de la réaction à partir de laquelle il est possible de déterminer les quantités d'ADN présentes au départ à l'aide d'une courbe standard. Lorsqu'on observe la fluorescence émise lors d'une réaction de la polymérase, le tout débute par une phase de latence où les cibles d'ADN sont limitées et les faibles signaux de fluorescence peuvent interférer avec le bruit de fond. Ensuite, débute une phase exponentielle où chaque cycle de quantification résulte en un dédoublement de l'ADN. Enfin, la réaction se termine avec un cycle latent où une accumulation du produit d'ADN résulte en une saturation au niveau de la fluorescence émise. Afin de pouvoir quantifier un microorganisme d'intérêt, l'utilisation d'une courbe standard est nécessaire et doit être employée en parallèle avec les échantillons à quantifier au cours d'une même réaction PCR afin de leur attribuer des valeurs quantitatives. La calibration de cette courbe standard doit être juste afin de produire des résultats fiables. L'efficacité d'amplification de l'ADN contrôle pour la courbe standard n'est pas nécessairement la même que l'ADN contenu dans la matrice d'un échantillon donné et peut donc causer une certaine faille dans la précision de la quantification, qui peut être corrigée selon différentes stratégies de traitement des données (Brankatschk et al., 2012; Karlen et al., 2007).

Différentes molécules fluorescentes sont disponibles pour des applications qPCR, présentant chacune des avantages et des inconvénients tels que décrits dans une revue par Navarro et al. (2015). Les molécules les plus souvent utilisées sont les colorants intercalant aux doubles brins d'ADN (par exemple, le SYBR Green) et les sondes à hydrolyse Taqman; ces dernières sont plus sensibles et plus spécifiques qu'un colorant intercalant comme le SYBR Green, mais coûtent plus cher. D'autres types de fluorophores, comme les sondes MGB (de l'anglais « minor binding groove »), ont été développés afin d'augmenter la sensibilité et la spécificité, et aussi de limiter les interactions avec les inhibiteurs d'une réaction PCR en temps réel (Navarro et al., 2015). Différents outils d'analyse de données quantitatives issues de la qPCR sont disponibles, présentant des différences dans l'efficacité, la précision et la reproductibilité de la quantification (Cikos et al., 2007; Ruijter et al., 2013). Par exemple, les différentes molécules fluorescentes ont des profils d'émission interagissant avec leur propre bruit de fond et une correction est nécessaire pour augmenter la précision de la quantification (Ruijter et al., 2014; Rutledge et Cote, 2003; Tuomi et al., 2010). De plus, des variations peuvent intervenir entre différentes expérimentations de qPCR, pouvant affecter la répétabilité des données quantitatives; des méthodes d'analyse afin de normaliser les données provenant de différentes sessions ont été proposées (Ruijter et al., 2009; Ruijter et al., 2006). Le MIQE (de l'anglais « minimum information for publication of quantitative results real-time PCR experiments ») propose des lignes directrices pour la publication d'études utilisant la qPCR comme méthode de quantification dans le but de faciliter la communication scientifique (Bustin et al., 2009).

Lorsqu'on regarde les essais qPCR publiés, on remarque que la plupart sont très spécifiques, mais peu sensibles *in silico* d'après des comparaisons avec des séquences spécifiques disponibles dans la banque de données NCBI (« National Center for Biotechnology Information ») (Lemmon et Gardner, 2008). Le premier essai qPCR publié pour la quantification de *Campylobacter* ciblant une région d'ADN codant pour la sous-unité ribosomal 16S spécifique au genre avait pour but d'améliorer les capacités à quantifier *C. spp.* dans les fèces de poulets comparativement aux méthodes classiques

(Lund et al., 2004). L'emploi d'essais qPCR multiplex (mqPCR) permet de quantifier simultanément différentes espèces de *Campylobacter* grâce à différents fluorophores couplés aux sondes d'ADN spécifiques et à la capacité du thermocycleur à lire à différentes longueurs d'onde. Par exemple, la mqPCR a été utilisée pour quantifier *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis* et *C. lari* dans des échantillons alimentaires (viandes, poissons, fruits, légumes et lait) (Bonjoch et al., 2010), *C. jejuni* et *C. coli* dans des échantillons d'eau (Toplak et al., 2012) ou encore *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari* dans des produits alimentaires de volailles (Vondrakova et al., 2014).

La qPCR peut être appliquée directement aux échantillons d'eau afin de quantifier *Campylobacter*, sans pré-enrichissement (Clark et al., 2011; Nam et al., 2005; Nogva et al., 2000; Park et al., 2011; Van Dyke et al., 2010; Yang et al., 2003). Aucune étude n'a à ce jour comparé la sensibilité et la spécificité des différents essais qPCR disponibles pour la quantification de *Campylobacter* dans l'eau.

Inhibiteurs de détection et quantification moléculaire

La biomasse concentrée provenant d'échantillons d'eau contient des substances inhibitrices affectant la sensibilité de la réaction PCR. Des dilutions en série des extraits d'ADN et/ou l'utilisation d'un contrôle interne d'amplification sont nécessaires afin de vérifier les niveaux d'inhibition lorsqu'on applique la qPCR à des échantillons d'eau environnementale (Deer et Lampel, 2010). Les acides humiques, acides fulmiques, ions métalliques et les polyphénols qu'on retrouve dans l'eau environnementale sont reconnus pour être des inhibiteurs importants de la PCR (Schrader et al., 2012). Ces substances interagissent au niveau de l'enzyme polymérase directement et au niveau des liaisons entre les amorces et la matrice d'ADN ayant ainsi des effets sur l'efficacité de la réaction (Opel et al., 2010). Différentes méthodes d'extraction d'ADN présentent différents niveaux de purification permettant d'éliminer les inhibiteurs, mais ceci au détriment d'un plus faible taux de récupération d'ADN; l'utilisation d'albumine de sérum bovin (BSA, de l'anglais « bovin serum albumin ») dans la réaction PCR permet aussi de réduire l'effet des inhibiteurs (Gadkar et Filion, 2012). Des compagnies ont développé des trousse et

élaboré des protocoles spécialisés pour l'extraction d'ADN à partir d'échantillons de l'environnement (par exemple, l'eau) en ajoutant des étapes supplémentaires dans le but d'éliminer les inhibiteurs spécifiquement rencontrés dans le type de matrice : par exemple, la trousse Power Water (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, Californie, États-Unis) ou la trousse SurePrep Water RNA/DNA Purification (Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis).

Limites de détection et quantification moléculaire

La limite de détection (LOD) du qPCR est la concentration minimale détectable et varie entre 1 et 1 000 copies de gènes pour *Campylobacter* (Leblanc-Maridor et al., 2011; Lund et al., 2004; Sails et al., 2003; Yang et al., 2003; Zhang et al., 2013). Si le génome de *Campylobacter* contient 1 copie d'un gène donné, la détection de 1 copie par qPCR serait équivalente à 1 cellule ou 1 UFC. Les différences majeures observées dans la LOD sont attribuables aux différentes matrices où *Campylobacter* fut quantifié, présentant différents niveaux d'inhibition (Schrader et al., 2012). De plus, différentes amorces et conditions d'amplification influencent aussi la LOD (Binnicker et Espy, 2013). Une étude rapporte qu'en milieu aquatique, les LOD de *Campylobacter* dans des eaux de faible turbidité sont de 2.3 UFC pour *C. coli* et 8.3 UFC pour *C. jejuni* (Tissier et al., 2012). D'autres études rapportent des LOD de 316 UFC de *C. coli* par gramme de selles (de Boer et al., 2013), 10 UFC de *C. jejuni* par gramme de viande de volaille (Melero et al., 2011) et 250 UFC de *C. lanienae* par gramme de fèces de bétail (Inglis et Kalischuk, 2004).

La préparation des échantillons d'eau pourrait permettre d'augmenter la limite de détection de *Campylobacter* en jouant sur les quantités d'eau filtrées, les types de membranes de filtration utilisées et les méthodes d'extraction et purification d'ADN employées pour un meilleur taux de récupération (Hellein et al., 2011; Tissier et al., 2012; Van Dyke et al., 2010). De nouveaux développements utilisant des technologies de microfluidique pourraient mener à des méthodes de détection et quantification plus sensibles dans les échantillons alimentaires (Morant-Minana et Elizalde, 2015) et d'eau

environnementale (Ahmad et al., 2011; Tourlousse et al., 2012). Étant donné la faible dose infectieuse de *Campylobacter*, il est primordial de s'assurer que la technique de qPCR utilisée pour sa quantification démontre une limite de détection relativement faible lorsqu'elle est employée dans une matrice particulière comme les eaux environnementales.

La qPCR, originellement développée et utilisée principalement dans les laboratoires de recherche, est employée de plus en plus pour le diagnostic et la surveillance. Des exemples d'application de la qPCR pour la surveillance en milieux aquatiques, comme la validation de l'utilisation du qPCR pour la quantification d'*Enterococcus* comme indicateur de la qualité des eaux récréatives par l'agence USEPA (de l'anglais, « United States Environmental Protection Agency ») (Gonzalez et Noble, 2014) ou encore la surveillance de *Legionella* dans les tours de refroidissements des eaux en France (Baume et al., 2013), montre une certaine tendance des agences de santé publique à intégrer la qPCR dans leurs activités de surveillance.

PCR digitale

La PCR digitale (dPCR) est une technologie émergente qui diffère de la qPCR par le fait que l'échantillon d'ADN à quantifier est réparti en plusieurs centaines, voire plusieurs millions de partitions (dépendamment de l'instrument utilisé) où les réactions PCR vont avoir lieu. Il est alors possible de compter le nombre de partitions ayant eu une détection positive et d'attribuer des valeurs absolues aux échantillons analysés. Différentes applications de la dPCR dans le domaine de la recherche médicale ont été rapportées comme des analyses de biomarqueurs (Day et al., 2013), la détection virale (Shen et al., 2011) et le dépistage génétique du fœtus (Lo et al., 2007). La dPCR a été utilisée pour la détection de Norovirus dans des échantillons de laitue et d'eau embouteillée démontrant une meilleure précision de quantification que la RT-qPCR (de l'anglais, RT : « reverse transcriptase ») (Coudray-Meunier et al., 2015). L'emploi de la dPCR dans les eaux environnementales a été décrit pour déterminer les concentrations des indicateurs *Bacteroides* et *Enterococcus* afin d'évaluer la qualité des eaux récréatives (Cao et al., 2015). Aucune étude ne rapporte à ce jour l'usage de la dPCR pour la détection de

Campylobacter. Son usage pourrait s'avérer intéressant dans la calibration de courbes standards pour la quantification de ce dernier par qPCR.

Viabilité (qPCR)

Pour contrer le fait que les techniques de PCR amplifient l'ADN total incluant l'ADN des cellules compromises ou de l'ADN résiduel, l'emploi de la molécule chimique propidium monoazide (PMA) permet d'amplifier l'ADN provenant uniquement des cellules viables. La molécule se lie par photoactivation à l'ADN libre. Par conséquent, le PMA est capable d'entrer dans les cellules ayant une membrane compromise et de se lier à leur ADN: cette liaison empêche l'ADN d'être amplifié pendant la réaction PCR (Nocker et al., 2006). Une autre molécule se liant à l'ADN par photoactivation a été utilisée pour quantifier les cellules viables de *Campylobacter* : le EMA (ethidium monoazide), qui s'est avéré moins efficace que le PMA en raison de sa toxicité plus élevée envers des cellules viables (Nocker et al., 2006). Le EMA a notamment été utilisé pour étudier la survie de *Campylobacter* dans le compost bovin (Inglis et al., 2010), dans différents échantillons alimentaires (Rudi et al., 2005), et suite à la désinfection et au traitement par antibiotiques (Rudi et al., 2005). Les différentes concentrations de PMA et EMA employées, les temps d'incubation à la lumière pour la photoactivation et la source de lumière utilisée influencent l'efficacité de la méthode appliquée pour un organisme donné (Cenciarini-Borde et al., 2009; Fittipaldi et al., 2012). Pour *Campylobacter*, l'utilisation du PMA en combinaison avec la qPCR (PMAqPCR) a permis de quantifier le nombre de cellules viables et de cellules VBNC dans des échantillons provenant de carcasses de volaille (Josefsen et al., 2010).

Toutefois, le PMAqPCR n'est pas toujours efficace à 100 % : la technique est connue pour surestimer la quantité de cellules viables (Banihashemi et al., 2012; Pacholewicz et al., 2013). La longueur de l'amplicon aurait un effet sur la performance du PMAqPCR: un amplicon plus court aurait pour effet de réduire la spécificité sur les cellules vivantes (Banihashemi et al., 2012; Contreras et al., 2011). Des études récentes ont montré que les résultats issus de l'utilisation du PMAqPCR et de l'utilisation du EMA en combinaison

avec le qPCR (EMAqPCR) pour quantifier *Campylobacter* sur des carcasses de volailles et dans l'eau environnementale corrélaient davantage avec les résultats utilisant des méthodes MPN que l'emploi du qPCR sans PMA ou EMA (Duarte et al., 2015; Seinige et al., 2014). La méthode de référence ISO 17995 repose sur des principes impliquant des techniques de culture plus lourdes et coûteuses que l'emploi du qPCR. L'utilisation du PMAqPCR a permis de démontrer que les méthodes de culture sous-estimaient le nombre de *Campylobacter* vivants sur les carcasses de volaille à différentes étapes en abattoir imposant différentes conditions de stress au microorganisme (Duarte et al., 2015). L'usage du PMAqPCR a permis récemment d'étudier la survie de *Campylobacter* dans des microcosmes d'eaux récréatives (Bae et Wuertz, 2012) et dans des eaux de surface (Banihashemi et al., 2012).

Techniques de génotypage

Le génotypage des souches de *Campylobacter* nous permet de les caractériser génétiquement et d'étudier la similarité génétique entre différentes souches. Le génotypage est utilisé pour identifier les cas reliés à des éclosions de campylobactériose et investiguer les possibles sources de ces éclosions et pour faire de l'attribution de sources dans les cas endémiques. Au cours des dernières années, plusieurs méthodes de génotypage de *Campylobacter* ont été décrites et utilisées pour caractériser des souches. Plusieurs études et revues de littérature rapportent que l'instabilité génomique de *Campylobacter* pose un défi pour le génotypage, et comparent les différentes techniques de génotypage en termes de pouvoir discriminant et congruence entre elles (Clark et al., 2012; Eberle et Kiess, 2012; Taboada et al., 2013). Les méthodes présentées ci-dessous sont celles les plus utilisées pour le génotypage de *Campylobacter* lors d'investigations épidémiologiques; une des méthodes présentées, le CGF, est une nouvelle méthode s'avérant prometteuse étant donné son haut pouvoir discriminant et son faible coût d'utilisation comparativement aux autres méthodes. Enfin, ces méthodes de génotypage seront remises en perspective par rapport aux nouvelles technologies de séquençage de génomes entiers qui sont de plus en plus accessibles.

Typage du gène *flaA*

Le typage du flagelle A (*flaA*) consiste en une amplification du gène par PCR et de l'analyse de l'amplicon sur gel suite à une RFLP (de l'anglais, « restriction fragment length polymorphism ») ou son séquençage afin de produire une empreinte génétique. Cette méthode fut développée à partir de celle présentée par Nachamkin et al. (1993) où l'ADN du gène *flaA* était soumis à un RFLP (*flaA*-RFLP). Le gène *flaA* fut choisi pour son homogénéité génétique à travers plusieurs souches de *C. jejuni* et *C. coli*, tout en présentant quelques régions variables (Fischer et Nachamkin, 1991; Thornton et al., 1990). C'est à partir d'une de ces régions variables de 321 paires de base que la technique de *flaA*-SVRs (de l'anglais, « short variable region sequencing ») a été développée (Meinersmann et al., 1997). Cette technique de génotypage est assez discriminante pour distinguer des souches de *Campylobacter*, même lorsqu'employée seule (Corcoran et al., 2006). Par exemple, cette technique a permis de différencier des isolats provenant d'une même éclosion par 5 paires de bases et pourrait s'avérer trop discriminante (ou moins appropriée que d'autres techniques) pour les investigations épidémiologiques pour retracer les sources ou comparer avec une bande de données (Sails et al., 2003). Ces différences entre les isolats étaient supportées par des explications basées sur la recombinaison homologue. Même si la technique de *flaA*-SVRs s'est avérée plus discriminante et plus facile à utiliser et à standardiser en laboratoire pour des applications en surveillance comparativement à la technique de *flaA*-RFLP, il a été prouvé que le *flaA*-RFLP est plus efficace pour identifier des lignées clonales d'isolats de *Campylobacter* (Djordjevic et al., 2007). Il est possible d'utiliser des techniques de HRM (de l'anglais « high resolution melting ») à la place du séquençage pour discriminer des isolats de *Campylobacter* par la région SVR du gène *flaA* (Merchant-Patel et al., 2010). Bien que les coûts liés à l'utilisation de cette technique restent assez faibles, on remet en question l'usage du *flaA*-SVRs pour le sous-typage étant donné qu'il est basé sur un seul locus et la capacité élevée de *Campylobacter* de capter et intégrer à son génome de l'ADN exogène (Wang et Taylor, 1990). À cause notamment de la recombinaison et du transfert intra-espèce, l'allèle comprenant le gène *flaA* n'est pas très stable génétiquement et n'est pas spécifique à l'espèce puisqu'on retrouve les mêmes patrons d'allèles chez *C. jejuni* et *C. coli* (Dingle et al., 2005). Ces propriétés font que cette méthode est inadaptée pour le

suivi à long terme de populations de *Campylobacter*, mais elle reste efficace pour comparer des souches étroitement similaires surtout lorsque combinée avec une autre méthode de génotypage analysant des gènes conservés comme le MLST (de l'anglais, « multi locus sequence typing ») (Clark et al., 2005).

Électrophorèse en champ pulsé

L'électrophorèse en champ pulsé, ou PFGE (de l'anglais « pulse-field gel electrophoresis »,) fut une des premières méthodes développées basées sur l'ADN pour génotyper *Campylobacter* (Ribot et al., 2001). Elle est d'ailleurs la méthode utilisée par le programme PulseNet aux États-Unis dans la surveillance de pathogènes d'origine alimentaire. La technique du PFGE permet à de larges fragments d'ADN (jusqu'à 2Mb) de migrer sur un gel d'agarose en trois directions. En premier lieu, l'ADN génomique est soumis à une digestion par un ou plusieurs enzymes de restriction afin de générer des fragments. Ensuite, la migration se fait sur un axe central à voltage constant. Le voltage et la direction sont ensuite changés sur deux axes de 60 degrés par rapport à l'axe central de manière à obtenir un patron de migration bien défini des fragments d'ADN résultant en l'apparition de bandes. Une limite de cette technique serait l'instabilité génétique de *Campylobacter* qui est connue pour nuire au génotypage par PFGE (Hanninen et al., 1999; Steinbrueckner et al., 2001; Wassenaar et al., 1998). De plus, il a été montré que des insertions par éléments génétiques mobiles comme des bactériophages pouvaient altérer des profils PFGE chez des souches étroitement apparentées (Barton et al., 2007).

En recherche, le PFGE a été utilisé pour faire le suivi de *Campylobacter* dans la chaîne de production de l'industrie de la volaille, de la ferme à l'assiette (Melero et al., 2012). Oyarzabal et al. (2013) utilisèrent le PFGE pour montrer que différentes méthodes d'isolement par culture affectent la diversité des génotypes de *Campylobacter* isolés. Le PFGE avec l'utilisation de *SmaI* comme enzyme de restriction est généralement plus discriminant qu'une technique de *flaA*-RFLP (Han et al., 2007; Newell et al., 2000). Il a été rapporté que le PFGE est plus discriminant que le MLST dans l'analyse de *C. coli* (Miller et al., 2010), et que le PFGE permet la différenciation de souches de *C. jejuni* que

le MLST ne peut différencier (Sails et al., 2003). Le PFGE serait donc, grâce à son haut pouvoir discriminant, une excellente méthode pour différencier des souches étroitement similaires génétiquement (Ahmed et al., 2012), mais présenterait des lacunes pour identifier des liens de parenté (Champion et al., 2002). Cette dernière étude montre que des souches provenant d'une éclosion de *Campylobacter* bien définie présentaient des profils PFGE identiques à des souches ne provenant pas de cette éclosion, faisant du PFGE une technique limitée pour distinguer des souches provenant d'éclosions ou identifier des cas sporadiques provenant d'une même source. La proximité géographique et temporelle des isolats provenant d'une étude donnée influenceront le besoin discriminant d'une technique de géotypage selon les objectifs de l'étude.

En Nouvelle-Zélande, l'emploi du PFGE a permis de regrouper une majorité (75 %) de 183 isolats cliniques en groupes de profils PFGE identiques comprenant entre 2 et 26 isolats (Gilpin et al., 2006). D'autres études montrent des cas contraires où les liens épidémiologiques sont plus difficiles à établir en raison du faible nombre d'isolats cliniques qui se regroupent, même dans un contexte de surveillance intensive (Hedberg et al., 2001; Michaud et al., 2005; Nadeau et al., 2002). Ces derniers suggèrent que la mise en place d'un système de surveillance pour des cas sporadiques de campylobactériose basée sur la technique de géotypage par PFGE représenterait une charge de travail très élevée tout en ayant peu de chances de trouver des regroupements d'isolats. L'utilisation du PFGE a permis de démontrer avec succès qu'il n'y avait pas de lien génétique entre des souches de *C. coli* provenant du porc et des souches humaines cliniques au Québec (Guevremont et al., 2004) et en France (Denis et al., 2009). Cette dernière étude a par contre montré des liens génétiques entre des isolats cliniques et des isolats de *C. jejuni* provenant des produits de la volaille. Le typage par PFGE de souches provenant d'eaux environnementales en France a permis de suggérer les humains, les porcs et la volaille comme sources de contamination (Denis et al., 2011).

Typage génomique multilocus

Le MLST (de l'anglais « multilocus sequence typing ») est la technique la plus couramment utilisée pour le typage moléculaire de *Campylobacter* (Levesque et al., 2008; Miller et al., 2012; Muellner et al., 2013; Sopwith et al., 2010). Le premier MLST de *Campylobacter* fut développé pour *C. jejuni* et *C. coli* (Dingle et al., 2001). Cette technique repose sur le séquençage de courtes régions du génome bactérien comprises dans 7 gènes de ménage (de l'anglais « housekeeping genes »). Les régions séquencées de ces 7 locus se voient attribuer un numéro d'affectation correspondant à un profil allélique dans la banque de données PubMLST (<http://pubmlst.org/campylobacter/>). La combinaison de ces 7 numéros forme une séquence type (ST). Les isolats qui partagent 4 profils alléliques identiques ou plus vont former un CC (complexe clonal). La banque de données PubMLST pour *Campylobacter* contenait, au moment de l'écriture de ce mémoire, plus de 32 000 entrées réparties sur plus de 6 500 STs. Les STs les plus dominants de la banque de données sont les ST-21, ST-45, ST-257, ST-50 et ST-48 associés majoritairement à des isolats cliniques.

Le ST-45 est intéressant, car il est 2^e ST le plus fréquemment identifié en plus d'être associé aux isolats provenant de cas cliniques (35 %), de la volaille (26 %) et de l'eau environnementale (8 %). Récemment, le MLST fut utilisé dans une étude sur les oiseaux sauvages dans la région mi-atlantique des États-Unis où il a été mis en évidence que certains oiseaux pouvaient être porteurs de *C. jejuni* associés à des complexes clonaux (ST-658) qui avaient été retrouvés seulement dans des souches cliniques (Keller et Shriver, 2014), ou encore en Suisse où le MLST a mis en évidence le fait que des chiens étaient porteurs de *Campylobacter* ayant des STs identiques à certains déjà retrouvés chez des humains (Amar et al., 2014). Un bel exemple de l'utilisation du MLST est en Nouvelle-Zélande, où la technique a été utilisée pour démontrer que les produits de consommation de la volaille étaient la cause principale des cas de campylobactériose (Mullner et al., 2009). Ces résultats ont influencé la politique nationale de manière à mettre en place des interventions ciblant l'industrie de la volaille résultant en une diminution significative du nombre de cas de campylobactériose l'année suivante (Mullner et al., 2009).

Le MLST a été utilisé sur des souches de *Campylobacter* provenant de différentes sources au Québec : des liens ont été trouvés entre les isolats cliniques humains et les isolats provenant de la volaille, de l'eau environnementale et du lait cru (Levesque et al., 2008). Le MLST reste une technique à haut pouvoir discriminant associé à une importante base de données accessible à tous. C'est une méthode qui est utilisée pour sa reproductibilité des résultats entre différents laboratoires. Le MLST peut être utilisé en combinaison avec le typage d'un marqueur polymorphique comme le gène *flaA* afin de discriminer des STs identiques (Levesque et al., 2008). Cependant, le MLST demeure une méthode de génotypage qui requiert un temps considérable de main d'œuvre avec tous les coûts qui y sont reliés.

Comparaisons génomiques utilisant les biopuces à ADN

Les puces à ADN permettent l'hybridation de milliers de gènes répartis dans le génome de *Campylobacter* en une seule expérimentation en nous informant sur la présence, l'altération par degré de fluorescence ou l'absence de ces gènes. Les gènes d'une souche sont hybridés de manière à émettre un signal (fluorescence). Ce signal peut être comparé à celui émis par une souche de référence. La comparaison du signal permet de déterminer si la souche testée possède un gène différent ou similaire à celui de la souche de référence. Le principe repose sur le fait qu'un simple brin d'ADN fixé sur un support solide va s'hybrider avec un simple brin d'ADN complémentaire afin d'émettre un signal via un fluorochrome. En général, les ARN totaux sont extraits des souches à tester afin de générer les ADNc par rétrotranscription et de les marquer avec un colorant. Les puces à ADN peuvent donc être utilisées pour mesurer le changement d'expression de gènes, pour détecter du polymorphisme nucléotidique ou encore pour faire du génotypage. L'efficacité et la faisabilité du génotypage des souches de *Campylobacter* avec des puces à ADN sont bien documentées (Leonard et al., 2003; Marotta et al., 2013; Rodin et al., 2008). Il est possible de faire de la comparaison génomique intra espèce de *Campylobacter* avec les puces à ADN (Taboada et al., 2007) et d'identifier des gènes spécifiques (Poly et al., 2004).

Le génotypage par puce à ADN a été comparé avec d'autres méthodes de génotypage de *Campylobacter*. Des différences ont été remarquées avec la puce à ADN pour des mêmes STs de MLST (Taboada et al., 2008). La puce à ADN pouvait différencier des profils PFGE identiques tout en identifiant une forte similarité génétique entre ces isolats (Pittenger et al., 2009). L'utilisation de puces à ADN a permis de mettre en évidence la grande diversité génétique à travers différentes populations de *Campylobacter* (Dorrell et al., 2001; Parker et al., 2006; Pearson et al., 2003). La puce à ADN a déjà été utilisée pour une investigation épidémiologique, mettant en évidence une possible transmission entre le bétail et les humains (Hannon et al., 2009). L'emploi de puces à ADN pour le génotypage de *Campylobacter* reste une technique laborieuse, mais est très efficace pour comparer des génomes de manière très discriminante.

CGF

Le CGF (Comparative Genomic Fingerprinting) est une technique de génotypage résultant d'une évaluation allélique de multiples locus largement distribués dans le génome de *C. jejuni*, ciblant 40 régions variantes des gènes accessoires. Étant donné la similarité des génomes de *C. jejuni* et *C. coli*, le CGF peut être appliqué aussi pour le génotypage de *C. coli*. La sélection des 40 gènes fut basée sur 5 critères. Premièrement, des gènes candidats furent sélectionnés basé sur le fait qu'ils étaient présents ou absents lors d'expérimentations sur 198 isolats de *C. jejuni* à partir de puces à ADN (Taboada et al., 2004; Taboada et al., 2008; Taboada et al., 2007). Les gènes présentant des divergences dans les séquences ont été rejetés (Taboada et al., 2005). Deuxièmement, la fréquence de ces gènes présents ou absents au travers la population des 198 isolats devait être adéquate. Les gènes fortement présents ou d'absents à travers la population furent délaissés. Troisièmement, la distribution de ces gènes devait être représentative du génome entier de *C. jejuni*, incluant les 16 régions majeures hypervariables (Taboada et al., 2004). Quatrièmement, ces gènes ne devaient pas être affectés par la recombinaison lors de possibles coexistences de souches ayant des profils génétiques différents; ce sont donc des régions du génome qui sont conservées à travers la population (Taboada et al.,

2008). Cinquièmement, les régions des 40 gènes devaient être présentes dans 2 ou plus des génomes entièrement ou partiellement séquencés au moment de l'étude afin de faire la conception d'amorces pour éviter les régions présentant du polymorphisme nucléique (Taboada et al., 2012).

La présence ou l'absence des 40 gènes est déterminée par 8 PCR multiplexes, puis des profils génotypiques sont dressés. Ces profils peuvent être comparés entre eux et avec d'autres profils contenus dans une banque de données. Le CGF se distingue des autres techniques de génotypage notamment en étant une méthode à déploiement rapide et à faible coût en réactifs et main d'œuvre. La technique peut donc être instaurée facilement dans un laboratoire pour faire de la surveillance routinière et peut s'avérer particulièrement efficace pour les épidémiologistes lors d'éclosions de cas de campylobactériose étant donné la rapidité d'obtention des résultats.

Le CGF est une technique de génotypage à haute résolution comparable au MLST. Par exemple, sur le génotypage de 412 isolats provenant de FoodNet Canada, la diversité génétique était plus élevée en utilisant le CGF comparativement au MLST; par contre, il y a un haut niveau de concordance entre ces deux méthodes (Taboada et al., 2012). Récemment, les travaux de Thomas et al. (2014) décrivent l'utilisation du CGF pour identifier une souche de *Campylobacter* qui a infecté un travailleur en laboratoire. Dekert et al. (2014) ont utilisé le CGF pour comparer génétiquement des isolats de *Campylobacter* humains à des isolats provenant de poulets afin de mettre en évidence des liens épidémiologiques spatio-temporels. Une banque de données CGF canadienne comprenant plus de 18 000 isolats (en date du 5 mars 2015) provenant de différentes sources animales, environnementales et cliniques à travers le Canada peut être utilisée pour des fins comparatives.

Séquençage du génome entier

Avec les technologies de séquençage devenues de plus en plus abordables, plusieurs groupes de recherche se lancent dans la comparaison génomique de *Campylobacter* en

rendant publics de plus en plus de génomes séquencés. En date du 5 mai 2015, 286 projets de séquençage de *Campylobacter* était en cours et la majorité étaient au stade d'assemblage des séquences selon la banque de données NCBI ; 62 génomes séquencés étaient complétés et disponibles. Le premier génome entièrement séquencé de *Campylobacter* fut celui de *C. jejuni* NCTC 11168; 16 régions hypervariables ont alors été identifiées (Parkhill et al., 2000). Une analyse rapporte que le génome de la souche NCTC 11168 contient 1 641 481 paires de bases (30.6 % de contenu en G+C) codant pour 1 643 protéines (Gundogdu et al., 2007). Il contient 4 répétitions de séquences dont 3 copies de l'opéron de l'ARN ribosomal ainsi que 3 copies d'une région codante. Le génome de *Campylobacter* semble contenir peu de gènes impliqués dans les processus de réparation d'ADN étudiés chez *E. coli*. Certaines souches présentent des hautes fréquences de mutations spontanées dans des gènes en particulier, comme le gène *motA* impliqué dans la motilité (Mohawk et al., 2014). Il a toutefois été démontré que *Campylobacter* possède un mécanisme de réparation des mutations dans le flagelle lui permettant de conserver sa virulence (Hendrixson, 2008). La découverte étonnante de plusieurs régions hypervariables codant entre autres pour des protéines de structure renforça les hypothèses concernant la plasticité du génome de *Campylobacter* (Parkhill et al., 2000) et du haut taux d'évènements de recombinaison (Taboada et al., 2004).

Entre les différentes espèces de *Campylobacter*, il existe des différences structurelles majeures dans leur génome associées à des insertions d'îlots de gènes qui pourraient être attribuables à des insertions phagiques ou plasmidiques (Fouts et al., 2005). La comparaison génomique de différentes souches de *C. jejuni* permet d'identifier des endroits précis où l'on suspecte l'intégration horizontale de matériel génétique (Hofreuter et al., 2006) qui serait important pour la virulence et l'adaptation aux hôtes d'un point de vue évolutif (Kienesberger et al., 2014; Ochman et al., 2000). Ces séquences spécifiques de nucléotides sont importantes dans le développement d'une technique de génotypage et des variations pourraient informer sur la virulence d'une souche en intégrant le séquençage comme moyen de génotypage. Le transfert horizontal ainsi que l'altération intragénomique de gènes de résistance aux antibiotiques est possible lors d'infection *in vivo* à *C. jejuni* (de Boer et al., 2002). Un cas de syndrome de Guillain-Barré aurait été

attribuable à un transfert horizontal de 14.26kb d'un gène codant pour des LOS (Gilbert et al., 2004). Des plasmides ont été trouvés dans 19 % à 53 % des souches de *Campylobacter* (Tenover et al., 1985).

Le développement de techniques et d'appareils pour séquencer des génomes entiers est en pleine émergence : 454 Pyrosequencer (Life Sciences, Branford, Connecticut, États-Unis), Ion Torrent Sequencing (DNA Electronics, Londres, Royaume-Uni), ABI SOLiD (Life Technologies, Carlsbad, Californie, États-Unis), Illumina-SOLEXA (Illumina, San Diego, Californie, États-Unis) pour en nommer quelques-unes. Il devient de plus en plus accessible et abordable de séquencer des génomes bactériens. Le séquençage du génome complet de *Campylobacter* reste la technique de génotypage par excellence, car en théorie elle permet de différencier des souches par aussi peu qu'un seul nucléotide (SNP, de l'anglais « single nucleotide polymorphism ») et permet de dresser des arbres phylogénétiques exacts. L'approche WGS (de l'anglais, « Whole Genome Sequencing ») est ainsi une technique plus discriminante que le typage du *flaA* et le PFGE, mais reste une méthode très laborieuse en terme de temps et d'argent (Pendleton et al., 2013). Cette méthode requiert davantage de développement au niveau de la bio-informatique pour traiter les séquences. Il est possible de formater les données de séquences nucléotidiques des autres méthodes de génotypage en données WGS fragmentaires, ou vice versa, pour inférer les résultats des autres méthodes de typage (Kruczkiewicz et al., 2013; Revez et al., 2014).

Récemment, des données WGS fragmentaires ont été utilisées pour évaluer l'efficacité des techniques de génotypage et proposer un cadre de travail pour des études à venir; les techniques qui requièrent l'analyse de plusieurs allèles comme le MLST et le CGF se sont avérées particulièrement efficaces (Carrillo et al., 2012). Le séquençage de deux souches d'un même ST isolées chez un humain et chez une poule dans la même région et au même moment révèle des différences d'un ou plusieurs nucléotides dans les séquences de 83 gènes différents, explicables par la recombinaison (Biggs et al., 2011). Est-ce que ces deux souches ont la même origine ? La recombinaison serait dans ce cas spécifique d'hôte; plus de données WGS sur *Campylobacter* nous donneraient plus d'informations

sur ce genre de phénomène ainsi que sur la variation génétique de certaines séquences d'ADN de ce microorganisme. Avec une approche de WGS, il a aussi été montré que *C. coli* acquérait de l'ADN typique à *C. jejuni* lors de co-colonisation (Sheppard et al., 2013).

Avec plus de données WGS, il sera possible d'élucider la structure génétique populationnelle de *C. jejuni* et *C. coli*. L'utilisation du génotypage par WGS à plus grande échelle semble être de plus en plus imminente, car les autorités en santé publique investissent dans des partenaires aux niveaux académiques, gouvernementaux et industriels afin d'intégrer cet outil dans la surveillance des pathogènes d'origine alimentaire et l'identification d'éclosions : par exemple, PulseNet évalue l'efficacité d'éventuelles intégrations de telles technologies dans le cadre du projet « 100K Foodborne Pathogens Project » (<http://100kgenome.vetmed.ucdavis.edu/>).

Sommaire de techniques génotypage présentées

L'utilisation de données issues du WGS sur de larges populations de *Campylobacter* nous permettra de vérifier et confirmer les caractéristiques, points forts et faibles des différentes techniques de génotypage. Le typage du gène *flaA* a prouvé son efficacité pour des éclosions très limitées temporellement et géographiquement, mais les hauts taux de recombinaisons et la persistance de certains génotypes par rapport à d'autres rendent cette méthode limitée dans ses applications et interprétations (Hiett et al., 2007). Le PFGE s'avère efficace pour l'identification des éclosions et est encore utilisé de nos jours par plusieurs agences nationales de santé publique. Par contre, le PFGE ne serait pas aussi efficace lors d'études longitudinales étant donné la répétition de génotypes non reliés temporellement et géographiquement (Clark et al., 2012; Fitzgerald et al., 2005). Le MLST est un prédicteur fiable de la clonalité lorsqu'appliqué à une population de différents isolats et est la méthode de typage de *Campylobacter* la plus utilisée (Karenlampi et al., 2007). Par contre, les complexes clonaux analysés seuls (sans les STs) ne sont pas assez discriminants pour l'investigation d'éclosions. Les STs majeurs, tel le ST-45, peuvent être divisés en différents génotypes par d'autres méthodes de génotypage

comme le CGF ou le typage du gène *flaA* (Clark et al., 2012). Le CGF est la méthode de typage de *Campylobacter* la plus discriminante et celle représentant le plus faible coût et temps d'utilisation (Clark et al., 2012; Taboada et al., 2013). Ces différentes méthodes de typages diffèrent au niveau de leur pouvoir discriminant, leurs coûts, leurs qualités et leur pertinence biologique lors d'attribution des sources d'infection ou détermination de la clonalité (Clark et al., 2012). Le véritable défi repose sur le fait de choisir une méthode de typage appropriée pour des fins spécifiques. Avec les avancées dans le développement des technologies de WGS, on peut se questionner sur l'éventuelle possibilité d'intégration de telles technologies aux systèmes de surveillance et d'investigation d'éclosions de manière à ce qu'elles remplacent les techniques de sous-typage génomiques. L'utilisation de ces dernières reste d'intérêt car elles nous informent sur le comportement génomique de *Campylobacter* à travers des systèmes de surveillance dans une interface humains-animaux-environnement.

Exposé et analyse des résultats

Le manque de connaissances sur la présence et le potentiel de transmission de *Campylobacter* aux humains dans les environnements aquatiques représente la problématique ayant menée à l'élaboration de ce projet de recherche. L'hypothèse émise était que l'eau environnementale serait impliquée dans la transmission de la campylobactériose aux humains et pourrait expliquer en partie l'incidence plus élevée de cas rapportés en été. L'objectif était donc d'évaluer le potentiel de transmission de *Campylobacter* chez l'humain par des environnements aquatiques en déterminant les concentrations de *Campylobacter* par qPCR dans différentes sources d'eau environnementales et en caractérisant par génotypage CGF des isolats de *Campylobacter* provenant de différentes sources d'eau environnementales et des isolats cliniques de la même région afin de décrire les similarités génétiques.

La section suivante contient les deux articles scientifiques rédigés dans le cadre de ce mémoire de maîtrise. Les données utilisées pour la rédaction de ces articles sont issues d'échantillons d'eaux environnementales et de cas cliniques provenant de la région sud-est du Québec analysés dans le Laboratoire de lutte contre les zoonoses d'origine alimentaire de l'Agence de la santé publique du Canada (Saint-Hyacinthe) et de données relatives aux cas de campylobactériose étudiés provenant des archives de l'Hôpital Honoré-Mercier (Saint-Hyacinthe). Les certificats d'éthique de la recherche obtenus préalablement à l'acquisition de ces dernières données. Une carte des cas cliniques et des sites de collecte des eaux environnementales est présentée en Annexe 1.

Comparative evaluation of different real-time PCR assays and standard curve optimisation for enhanced accuracy in quantification of *Campylobacter* in environmental waters

Author Names and Affiliations: Maxime Gosselin-Théberge^{1,2}, Eduardo Taboada³, Rebecca A. Guy^{1,2},

¹Public Health Agency of Canada, Saint-Hyacinthe, QC, Canada; ²Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal; ³Public Health Agency of Canada, Lethbridge, AB, Canada

ABSTRACT

Among zoonotic pathogens, *Campylobacter* may be the one representing the biggest public health and economic burden in developed countries. This study evaluated published real-time PCR assays for the quantification of *Campylobacter* to enable selection of the best assay for quantification of *C. spp.* and *C. jejuni* in environmental water. A total of 9 assays were compared: three for thermotolerant *C. spp.* targeting the 16S rRNA (Josefsen et al., 2004; Lund et al., 2004; de Boer et al., 2013), and six for *C. jejuni* (Best et al., 2003 targeting *mapA*; Toplak et al., 2012 targeting *ccoN*; Yang et al., 2003 targeting a variable sequence; He and Chen, 2010 targeting *luxS*; Wilson et al., 2000 targeting AMP *gyrA* and Villarreal et al., 2010 targeting a variable sequence). These assays were tested against a collection of 61 environmental *Campylobacter* isolates to determine their specificity and sensitivity. Real-time PCR assays targeting *C. spp.* were all positive when tested against the 61 water isolates, whereas assays targeting *C. jejuni* differed among each other in terms of specificity and sensitivity. Three *C. jejuni*-specific assays demonstrated good specificity and sensitivity when tested against environmental isolates in the laboratory and these results were concordant with *in silico*-predicted results obtained against a set of 211 *C. jejuni* and *C. coli* genome sequences. Two assays were selected, the Josefsen assay (targeting *C. spp.*) and the Best assay (targeting *C. jejuni*), to compare DNA concentration estimation using spectrophotometry and digital PCR (dPCR), to calibrate standard curves (SC) for greater accuracy of qPCR-based quantification. Average differences of 0.56 ± 0.12 and 0.51 ± 0.11 log fold copies were observed between the spectrophotometry-based SC preparation and the dPCR preparation for *C. spp.* and *C. jejuni*, respectively, demonstrating an over-estimation of *Campylobacter* concentration when spectrophotometry was used to calibrate the DNA SCs. Our work showed differences in quantification of aquatic environmental isolates of *Campylobacter* between qPCR assays and method specific bias in SC preparation. This study provided an objective analysis of real time PCR assays targeting *Campylobacter* in the literature and provides a framework for evaluating novel assays.

Keywords: *Campylobacter*; Real-time PCR; Environment waters; Digital PCR, Microbial *in silico* typing

1. Introduction

Campylobacter is a bacterial zoonotic pathogen that causes gastro-enteritis and that represents the most significant bacterial pathogen-associated burden in developed countries (Murray et al., 2012; World Health Organization, 2011). *Campylobacter* transmission through consumption of poultry-derived products is well documented and is considered the main source of human infections (Food Standards Agency, 2014). Increasing evidence suggests that transmission of *Campylobacter* in humans can be attributable to exposure to environmental and treated water (Levesque et al., 2008; Mullner et al., 2009). While most studies that investigated the concentration of *Campylobacter* in environmental waters used culture-based methods, only a few used qPCR to quantify *Campylobacter* in different types of waters like surface waters (Hellein et al., 2011; Seinige et al., 2014), recreational waters (Oster et al., 2014), ground waters (Tissier et al., 2012; Won et al., 2013), waste water (Brooks et al., 2014; Wery et al., 2008), treated wastewaters (Pitkanen et al., 2013) and even irrigation waters for agricultural purposes (Gu et al., 2013). QPCR not only provides reproducible results (Halford et al., 1999; Reischl and Kochanowski, 1995) but is less time-consuming than culture-based methods. Given the fastidious nature of *Campylobacter* (Kelly et al., 2001; On, 1996) and its capacity to adopt a viable but non-cultivable (VBNC) state, especially in water (Baffone et al., 2006; Patrone et al., 2013; Tholozan et al., 1999; Thomas et al., 2002), qPCR is our method of choice for quantification of pathogens in aquatic environments. Such quantification would be beneficial to public health authorities to evaluate the risk of exposure to this pathogen in a given water environment. For example, the United States Environmental Protection Agency (USEPA) recently approved the use of qPCR for quantification of the bacterial indicator, *Enterococcus* (Gonzalez and Noble, 2014).

A current challenge regarding standardisation in the application of qPCR towards quantification of *Campylobacter* in environmental waters is the number of competing methods that are currently described in the literature and which to choose. The first objective of this study was to review all of the published *Campylobacter* qPCR assays to evaluate their specificity and sensitivity using *in silico* tools and comparing selected

assays in-lab against environmental water isolates. The second objective was to evaluate the accuracy of quantification based on quantification cycles (Cqs) using dPCR technology. In order to ensure the reliability and reproducibility of the qPCR and dPCR assay results described in this paper, the “Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) Guidelines” (Bustin et al., 2009) and “Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiment (dMIQE) Guidelines” (Huggett et al., 2013) were followed.

2. Materials and Methods

2.1 QPCR Assay selection

A review of publicly available described assays targeting *Campylobacter* spp. and *Campylobacter jejuni* in PubMed was performed. The original number of assays was narrowed down according to the following criteria: hydrolysis probes; thorough description of the original assay; sensitivity and specificity according to BLAST analyses. QPCR assays with primer or probe homologues to species other than *Campylobacter* were considered nonspecific for *C. spp.* detection, and lack of detection of *C. jejuni* species for *C. jejuni* detection were also considered nonspecific. When mismatches occurred between a GenBank isolate sequence and primers/probe, for either *C. spp.* or *C. jejuni*, then the assay was considered as a lower sensitivity assay.

2.2 In silico assay simulation

In silico simulation of PCR results was performed using the “Microbial *In Silico* Typing” (MIST) engine, an analytical platform previously developed by our group that allows users to simulate a range of molecular assays on completed and draft genome sequence data (Kruczkiewicz et al., 2013). QPCR assays identified in the literature were developed into standard MIST-based assays using the original primer and probe sequences described for each method. A dataset comprised of *C. jejuni* and *C. coli* genome sequences was assembled for this study. Because of the possibility for false negative *in silico* qPCR results in draft genome sequence data, all genome sequences were subjected to *in silico*

rMLST analysis (Jolley et al., 2012) using MIST for quality control purposes. Genomes with incomplete allelic information at any of the 53 rMLST loci were screened out from further analysis. The final dataset was comprised of 183 *C. jejuni* and 28 *C. coli* genome sequences both from public sources (n=102) and sequenced in our laboratory (n=109). Public genome sequences included 71 from the Bacterial Isolate Genome Sequence Database (Jolley and Maiden, 2010), 4 from GenBank, and 27 from the National Center for Biotechnology Information's Short Read Archive.

2.3 *Campylobacter* environmental water isolates and DNA preparation

The *Campylobacter* isolates used in this study originated from recreational beach water and drinking water source water samples from Southern Quebec in Canada (Gosselin-Théberge et al., 2015; manuscript in preparation - Investigating *Campylobacter* potential transmission risk in environmental waters in Southern Quebec, Canada, using real-time PCR and genotyping). They were enriched, from cellulose 0.47µm S-Pak filters (Millipore, Billerica, MA, USA) containing 1L water concentrates, in 100 mL of Bolton broth (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom) incubated at 35°C +/- 1°C for 4 hr followed by 42 °C +/- 1°C for 44-45 hr. All incubations were done in microaerobic conditions 10% CO₂ 5% O₂ 85% N₂. Isolation was performed on modified Charcoal-Cefoperazone-Deoxycholate Agar (mCCDA) (Oxoid) following 24-72 hr incubation at 42 °C +/- 1 °C. Typical colonies were isolated and identified using gram coloration, catalase and oxidase tests. Multiplex PCR was used to determine the presence of thermotolerant *C. spp.* and *C. jejuni/C. coli* (Denis et al., 1999). Isolates that were *C. spp.* positive, but showing no bands for *C. jejuni* or *C. coli*, were sequenced using Sanger sequencing technology at the cpn60 coding region (Hill et al., 2006). If cpn60 sequencing was negative then the 16S rRNA coding region (Jiang et al., 2006) was sequenced. These PCR multiplex and sequencing steps were considered as the gold standard in this study for identifying *Campylobacter* genus and species. Strains were stored at -80°C in Brucella Broth (Oxoid) with 15% glycerol. In order to prepare DNA for qPCR testing, *Campylobacter* isolates from frozen stocks were streaked onto Mueller-Hinton agar (Oxoid) plates containing defibrinated sheep blood (Oxoid) and incubated for 48 hr at

42°C. The bacteria were subcultured for another 48 hr under the same conditions in order to obtain well defined and intact round colonies on the plates. Bacteria from the second round of growth were isolated and suspended in 1ml of sterile di-ionized water and the bacterial concentration estimated by spectrophotometry (Genesys 20, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) at an OD of 600nm. Dilutions were made to obtain a final bacterial quantity of 1×10^5 bacteria in 10ml of sterile di-ionized water, based on an OD of $1 = 1 \times 10^8$ bacteria/ml for each isolate. DNA was extracted using the same method to be applied to environmental water isolates. Each isolate preparation was filtered through a Supor 450, 0.45µm polyethersulphone filter (Pall, Port Washington, NY, USA). DNA was extracted directly from filters using the Power Water Kit (Mo Bio, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer instructions. In the final step, DNA was eluted in 100µl elution buffer and stored in screw-capped vials with o-rings, at -20°C, until use.

2.4 Real-Time PCR

DNA for use as qPCR standards was extracted from 48 hr cultures of the *C. jejuni* reference strain ATCC 29428 (described in 2.3), using the QiaAmp DNA extraction kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) following the manufacturer's instructions for gram negative bacteria. DNA was eluted from the columns using two rounds of 200 µl of PCR grade water (HyClone Laboratories, South Logan, UT, USA). The concentration and purity of the extracted DNA was measured using a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The DNA concentration was converted to copy number based on a genome size of 1.65Mb (according to the average of available sequenced *Campylobacter* genomes on GenBank) and using the formula: copy number = $[\text{DNA}] \times 6.0221367 \times 10^{23} \times \text{gene copies/mol} \div (\text{genome size} \times 2\text{b/bp} \times 330 \text{ g/mol/mole})$. The purified DNA was aliquoted at concentrations of 1×10^6 copies/µl and stored at -20°C until use. Aliquots were not thawed and refrozen more than 3 times. Conditions used for the 9 qPCR assays are described in Table V. Five microliters of template were added to each reaction. The Brilliant III qPCR Master Mix (Stratagene, LaJolla, CA, USA) was used for qPCR reactions following each assay specific amount of primers, probes and templates. The probes were purchased from IDT Technologies (Coralville, ID, USA) as ZEN probes

with FAM reporters and BHQ₂ quenchers, except for 1 probe (Toplak et al., 2012) which is an MGB probe and was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) with a FAM reporter and BHQ₂ quencher. PCR conditions were specific for each assay according to the original paper. The PCR reactions were run in an HRM 6500 Rotor-gene instrument (Qiagen, Venlo, Limburg, Netherlands) and visualized in Rotor-Gene Q Series Software version 2.3.1. Fluorescence data were collected at the end of each cycle and each sample was run in triplicate wells.

2.5 Digital PCR-based standard curve

DPCR was conducted in order to obtain a greater accuracy of SC-based quantification in qPCR. DPCR targets were the 16S rRNA for quantification of thermotolerant *C. spp.* (Josefsen et al., 2004) and the *mapA* gene for quantification of *C. jejuni* (Best et al., 2003) using the same qPCR conditions as described in Table V. The RainDrop Digital PCR System (Raindance Technologies, Bellerica, MA, USA) was used. Each 30 µl reaction was run in duplicate and included 5 µl of DNA template, 1x Brilliant III mastermix (Stratagene), primers and probe, 1x dPCR Droplet Stabilizer (Raindance Technologies) and bovine serum albumin (300 ng/µl) (Oxoid). Droplets were formed in the RainDrop source instrument. The DNA was amplified using a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Droplets were analysed in the RainDrop Sense instrument and data were analysed using the RainDrop Analyst software provided with the dPCR instrument. Real-time PCR reactions with the same conditions (minus the droplet stabilizer) were run in parallel in an HRM 6500 Rotor-gene instrument in order to attribute a C_q to an absolute quantity. Fluorescence data were collected at the end of each cycle and each sample was run in triplicate wells with a final volume of 25µl instead of 30µl.

2.6 Data analysis

2.6.1 The standardized ratio C_{qi}/C_{qref} determination

The standardized ratio Cq_i/Cq_{ref} (SR Cq_i/Cq_{ref}) was calculated to determine whether the signal distribution among environmental isolates was similar for each qPCR assay, adjusted for run variations. A comparison of the amplification curves from the different assays with the same set of isolates, demonstrated that there were assay dependent variations in Cqs (data not shown). Based on standardizing OD readings (section 2.3), the Cq/Cq_{ref} was determined for each specific isolate of each specific run (Formula 1), and then standardized by the average Cq/Cq_{ref} ratio of all positive isolates of the run (Formula 2):

Formula 1: $Cq_{i,r}ratio = Cq_{i,r}/Cq_{ref}$

Formula 2: $Average\ Cq\ ratio_r = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (Cq_{i,r}/Cq_{ref})$

Formula 3: $Standardized\ ratio = Cq_{i,r}ratio/Average\ Cq\ ratio_r$

where n is the number of isolates i with a positive signal in a specific run r ; Cq_{ref} is the Cq value of a reference DNA sample (in our case, 10^5 copies of DNA) associated with the same specific run, and $Cq_{i,r}$ is the Cq value of a given positive sample i within a run r . The SR Cq_i/Cq_{ref} ratio shows the distribution of positive signals detected by qPCR; signals that should be all the same based on the DNA preparation. A SR Cq_i/Cq_{ref} of one represents a sample that has a qPCR signal equal to the average of all the qPCR signals from all positive isolates, from the same assay and adjusted for run variations.

2.6.2 Real time PCR data analysis

The 61 isolates were analysed in 4 different runs. Each run contained a SC based on spectrophotometry calibration (described in 2.4) with the following DNA concentrations: 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 and 10^1 copies. For each individual run the qPCR data was exported from the Rotor-Gene software (version 2.3.1) into Real-time PCR Data Markup Language (RDML) format then imported into the LinRegPCR quantitative PCR analysis program in order to perform a baseline correction and give a common threshold Cq for

DNA quantification using algorithms implemented in the software (Ruijter et al., 2009) (version 11.0, download: <http://LinRegPCR.HFRC.nl>). Version 11.0 of the software contains a specific pattern of calculations for Cqs from hydrolysis probes kinetics (Tuomi et al., 2010). Baseline estimation was determined using the continuous Log-linear phase using the LinRegPCR parameters. The formula used for quantification was $y=10^{mx+b}$ where y =numbers of genomes detected, x =isolate-associated Cqs, m =slope and b =intercept from the DNA data on a logarithmic scale plotted against their respective Cqs from the SC. Cqs used for each isolate were the mean of the triplicate excluding zeroes. Coefficients of determination, slopes and intercepts were determined using simple linear regression and square of Pearson functions from Microsoft Excel 2010 (X data being the Cqs; Y data being the DNA absolute quantities on a logarithmic scale). Efficiencies were calculated according to the following: $-1 + 10^{(-slope)}$.

2.6.3 Digital PCR standard curve application to real time PCR data and comparison to spectrophotometry-based standard curve

Digital PCR absolute quantification data were adjusted based on a 30 μ l reaction generating 6 000 000 droplets from the RainDrop source instrument. Background noise, corresponding to the NTC positive droplets counts, was subtracted from the sample counts. DNA samples were run in both dPCR and qPCR instruments to obtain absolute quantification numbers associated with qPCR Cqs. The SC contained 4 DNA concentrations (based on spectrophotometry as explained in 2.4: 10^5 copies, 10^4 copies, 10^3 copies and 10^2 copies). SCs and qPCR data for the isolates were exported in a RDML format and imported into LinRegPCR for calculations of SC parameters (PCR efficiency and coefficient of determination) and DNA absolute quantity calculations as described in 2.6.2. The difference between the spectrophotometry and dPCR-based SCs was determined using the average ratio between isolates concentration values (negatives amplification values excluded) from both methods.

3. Results

3.1 Selection of *Campylobacter* qPCR assays

Thirty six real-time PCR assays for *Campylobacter* detection were reported in the literature in late January 2013. Twelve of these assays were hydrolysis probe assays (3 targeting *C. spp.* and 9 targeting *C. jejuni*) and these were selected for further analyses using BLAST (Table II). Of the 3 *C. spp.* qPCR assays, the Josefsen assay detected the least number of non-*Campylobacter* sequences (4) compared to the de Boer and Lund assays that had 162 and 321 non-specific detections, respectively. In the Lund assay all the non-*Campylobacter* detected sequences contained at least 2 mismatches, except for 4 sequences that had no mismatch. The nonspecific organisms (n=27) with sequence similarity to the primers and/or probes of the *C. spp.* assays, fell into 2 genera, the *Arcobacter* (matching 115 sequences) and the *Brachyspira* (matching 7 sequences).

The number of sequences with mismatches (1 or more) between primers or probe and the *Campylobacter*-specific sequences rate did not vary greatly between 16S assays, with Lund showing a slightly higher rate (Table II). Fewer *Campylobacter*-specific sequences were available in GenBank for the gene target region of the Josefsen and de Boer assays than Lund assay (Table II).

Fewer GenBank sequences were available against the *C. jejuni* specific targets than the 16S rRNA gene targets. The Wilson assay demonstrated the greatest number of its target gene associated GenBank sequences with 281 compared to the other *C. jejuni* assays that had a distribution between 24 and 34. The He assay was the only *C. jejuni* assay to have sequence matches with *C. coli* (n=5) and revealed 27/29 specific *C. jejuni* sequences with at least 1 mismatch. Wilson also had a high mismatching ratio with 230/281 specific *C. jejuni* sequences with at least 1 mismatch; all other *C. jejuni* assays showed only a few specific mismatches (Table II). Three assays targeting *C. spp.* and 6 assays targeting *C. jejuni* were selected for further analysis, including microbial *in silico* typing and laboratory confirmation with environmental isolates (Table V). The assays differed in amplicon sizes, original application and target genes (in the case of *C. jejuni* detection).

3.2 MIST results

Microbial *in silico* simulation against 211 genomes of *Campylobacter* (183 *C. jejuni* and 28 *C. coli*) was performed as a cost effective means of extending the number of *Campylobacter* isolate sequences tested against the 9 selected qPCR assays. The 3 assays targeting *C. spp.* all showed identical and high sensitivity (99.5%) for both *C. jejuni* and *C. coli* detection (Figure 1A). For the 6 assays targeting *C. jejuni*, The Toplak, Villarreal and He assays detected over 60% of the *C. coli* genomes in addition to *C. jejuni* in the simulation, thus drastically reducing their specificity for *C. jejuni* (Figure 1B). The Wilson and Yang assays demonstrated the least detections of *C. coli*, however at the cost of lower sensitivity as not all *C. jejuni* isolates were detected (Figure 1B). The Best assay was a good compromise demonstrating both high specificity and sensitivity.

3.3 Laboratory confirmation using environmental water isolates

The 9 assays were tested against 61 environmental *Campylobacter* isolates (48 *C. jejuni*, 1 *C. coli*, 11 *C. lari* and 1 *C. subantarcticus*) to provide direct experimental evidence, based on MIQE guidelines, of their sensitivity and specificity. Each isolate was treated identically and was assumed to have the same concentration; hence, a difference among the Cq ratios between different isolates suggested differences in accuracy of detection. The three *C. spp.* assays showed similar distributions of the SR $C_{q_i}/C_{q_{ref}}$ (1.000 ± 0.026) (Figure 2A). All 6 *C. jejuni* assays demonstrated isolates with performance indices below the threshold and no detection in some replicates with low Cqs compared to other isolates (Figure 2A). The number of *Campylobacter* isolates with low detection (isolates below the SR $C_{q_i}/C_{q_{ref}}$ threshold) ranged from 1 isolate for Yang, 3 isolates for He and Villarreal, 4 isolates for Wilson, 8 isolates for Best and 8 isolates for Toplak. The SRs $C_{q_i}/C_{q_{ref}}$ were recalculated without values below the detection threshold in order to attribute SRs $C_{q_i}/C_{q_{ref}}$ based on positive isolates, thus giving more power to differences between isolates. Before adjustment, a comparison of the six assays revealed the assays with the least variation were the Best and Yang assays, whereas, the Toplak and Wilson

assays demonstrated the greatest variation (Figure 2A). After adjustment, Toplak assay's distribution tended to be the most scattered followed by He (Figure 2B). The four remaining *C. jejuni* assays demonstrated similar variation in the SR $C_{q_i}/C_{q_{ref}}$. The total number of *Campylobacter* isolates that were not detected, or were detected below the SR $C_{q_i}/C_{q_{ref}}$ threshold, ranged from 23% for Yang, 25% for Villarreal, 31% for Best and Toplak, 39% for He and 41% for Wilson.

The performance of each assay based on binary classification tests whose values are the presence or absence of detection signals in real-time PCR assays, for each of the 61 tested isolates, are presented in Table III. Sensitivity and specificity with 95% exact confidence intervals were estimated for each assay; the specificity was not calculated for *C. spp.* assays in this study because it was already tested in their original descriptions of the assays against a panel of other human bacterial pathogens (de Boer et al., 2013; Josefsen et al., 2004; Lund et al., 2004). The results of the BLAST analyses suggested that the *C. spp.* assays, especially Lund and Josefsen, recognized non-*Campylobacter* sequences but amplification of these organisms is unlikely due to the numerous mismatches in the sequences. All three real-time PCR assays targeting the 16S gene had the same sensitivity: only one isolate wasn't detected.

All assays except He showed perfect sensitivity for *C. jejuni* detection when isolates below the detection threshold were considered as a positive detection, whereas the Yang assay demonstrated the highest specificity. After adjustment removing the low detection positives under the threshold, the Best, Toplak, Villarreal and Yang assays had the best sensitivity for *C. jejuni* detection whereas Best, Villarreal, Wilson and Yang had the best specificity (Table III).

An evaluation of the *C. jejuni* isolates that were not detected by at least one assay revealed that the lack of detection was due to the genetic variation within the primers or probe targeted regions of the isolate, thus affecting the sensitivity of a given assay (Table IV). The He assay revealed the least number of detections, with 10/48 *C. jejuni* isolates not detected. The majority of isolates missed by He were also missed by Wilson (7/10).

The assays were also tested against 11 *C. lari* isolates, 1 *C. coli* and 1 *C. subantarcticus*. Only the Toplak assay detected 1/11 *C. lari* with a low SR $C_{q_i}/C_{q_{ref}}$ of 0.779 (data not shown). The He and Toplak assays both detected the one *C. coli* isolate with relatively low SR $C_{q_i}/C_{q_{ref}}$ values of 0.859 and 0.793. The *C. subantarcticus* isolate wasn't detected by any of the assays (including the 16S assays).

3.4 Digital PCR standard curve calibration

Based on the *in silico* and wet-lab data, two assays were selected for future application to quantification of *C. spp.* (Josefsen et al., 2004) and *C. jejuni* (Best et al., 2003) in the aquatic environment. These two assays provided a good compromise between sensitivity and specificity of detection and accuracy of quantification. DPCR SCs were generated using 4 DNA concentrations that were analysed in 2 different runs. Gate clustering was done manually, using the same parameters for each well and each run, by using the same template on the RainDrop Analyst software. The Probe's fluorescence readings were measured on the FAM channel. Since a single fluorophore was tested the VIC channel served no other purpose than 2d scaling representation. The number of intact droplets generated in the dPCR was variable between each reaction, ranging from 4 210 000 to 5 500 000 for the Josefsen's assay (Figure 4). The background noise (NTC samples) had an average of 10 ± 5 positive droplets (n=4). Each concentration point was performed in duplicate in the same run. The 10^4 and 10^3 copies SC points were analysed twice in 2 runs (N=4).

The spectrophotometry and dPCR-based calibrated SCs were compared in order to show the difference in Cqs associated with gene copy numbers, when using either one of these methods. Genomic DNA was used to generate the SC because it represents all the *Campylobacter* DNA templates found in environmental waters. For the Josefsen's assay, a difference of 0.56 ± 0.12 log fold copies was determined using the mean of the differences of each point from one curve to another (Figure 3A). The coefficients of determination were similar for both SCs with a difference of 0.0029, but the reaction

efficiency was better when using a dPCR-based SC (E=0.92) compared to the spectrophotometry-based SC (E=0.81).

Similar results were obtained for *C. jejuni* quantification comparing the two SCs based on either spectrophotometry or dPCR (Figure 3B). The difference in coefficient of determination between the two methods was 0.0051. A difference of 0.51 ± 0.11 log fold copies was observed between the two methods. The reaction efficiency was slightly better using the dPCR-based SC (E=0.89) compared to spectrophotometry-based SC (E=0.83). The number of intact droplets generated using the Best assay in dPCR ranged from 1 280 000 to 5 460 000, which was lower than the Josefsen assay (Figure 5). The background noise (NTC samples) had an average of 131 ± 13 positive droplets (n=4). A concentration of 10^4 copies was analysed 3 times in duplicate in 3 runs (n=6) and 10^3 copies in 2 runs (n=4). Both the Josefsen and Best assays overestimated the DNA copy numbers using spectrophotometry SCs. DPCR demonstrated less variation between each run compared with qPCR.

4. Discussion

The ability to quantify pathogens in the environment is important because it provides quantitative information on levels of contamination and helps authorities to make decisions based on safety and to reduce the risk of exposure of the population to pathogens. *Campylobacter* is frequently found at low concentrations in environmental waters (Diergaardt et al., 2004; Hellein et al., 2011; Savill et al., 2001). The infective dose of *Campylobacter* is strain and host dependant (Park, 2002). Only several hundred organisms can cause campylobacteriosis (Black et al., 1988; Teunis et al., 2005) and even one organism has a 1/150 chance of causing disease (Medema et al., 1996). QPCR provides a fast method, whereby sensitive detection and quantification of a specific pathogen like *Campylobacter* is possible. Current challenges in quantifying *Campylobacter* in environmental waters are the accuracy of quantification, sensitivity of detection of low concentrations and the high genetic diversity of *Campylobacter*.

While numerous qPCR assays targeting *Campylobacter* have been reported, this is the first report, to our knowledge, of a comparative testing of different assays. The selection of fluorophore-labeled oligonucleotide assays over DNA binding dyes was preferred for their higher DNA-binding specificity as there is a third oligonucleotide required. Furthermore, the nonspecific binding of DNA binding dyes to double stranded DNA could lead to false positive detections. PCR inhibition by environmental inhibitors is an important consideration when choosing PCR chemistry for the detection and quantification of nucleic acids in environmental matrices.

Working toward standardization of specific qPCR assays is important for the valid comparison of results across different studies. It is difficult nowadays, especially for *Campylobacter* qPCR, to compare studies that used different assays in different matrices using different SCs templates and calibration methods. Even DNA extraction methods have been shown to affect dPCR quantification (Devonshire et al., 2015). Standardized procedures for *Campylobacter* quantification in environmental waters would help to fill the knowledge gaps about the potential risk of exposure to *Campylobacter* in aquatic environments.

The primers BLAST analysis in GenBank showed that most assays had a small number of mismatches in some of the specific DNA sequence targets. Considering the actual number of mismatches (less than 6) and that they were not located at the 5' or 3' ends of the DNA sequences, the amplification would still occur but the accuracy of quantification may be affected. Assays targeting the 16S rRNA showed some nonspecific matching with non-*Campylobacter* organisms like *Sagittula*, *Arcobacter*, *Erythrobacter*, *Sulfurospirillum*, *Ehrlichia* and *Sphingomonas*. Some of these organisms could be found in environmental waters (Lee et al., 2013; Pusterla et al., 2000; Zhou et al., 2012). For assays targeting *C. jejuni*, the number of sequence BLAST hits in GenBank was quite low. The MIST analysis proved to be a useful and cost effective tool to increase the number of isolates evaluated. This is especially important when applying qPCR to organisms such as *C. jejuni* that display high genetic diversity, where a large number of genetically diverse isolates would need to be tested to ensure accuracy of quantification.

The assay of Best et al. (2003) showed a good compromise between specificity and sensitivity according to both the BLAST and MIST analyses. The specificity was 100% for all *C. jejuni* assays except for Best, He and Toplak which detected 1 nonspecific isolate of *C. coli* or *C. lari*. These two species of *Campylobacter* are less frequently found in clinical samples, but can be pathogenic to humans (Moore et al., 2005).

When tested against environmental isolates, only one of the 61 environmental isolates was not recognized by all 3 *C. spp.* assays. Sanger sequencing of the 16S rRNA region of this particular isolate revealed that the microorganism might not be a *Campylobacter* but a close relative, since its 16S rRNA sequence shared 88% similarity with *C. subantarcticus* described by Debruyne et al. (2010). This isolate was considered a *C. spp.* based on the triplex result.

MIST analyses were primarily based on draft genome sequences, which may be of varying quality. It is possible for false negative detections to occur due to incomplete sequence or errors in the genome sequence. The genomes that were included in the MIST analysis passed a quality check based on 53 ribosomal genes in the rMLST scheme of Jolley et al. (2012). The possibility remains, however unlikely, that the qPCR targeted regions could fall within gaps in the genome sequences or in regions of poor sequence quality, thus influencing specificity and sensitivity based on MIST analysis. Although the in-lab and MIST revealed similar results, there were some differences, especially in detection of *C. coli*. Only 1 *C. coli* isolate was tested in the wet-lab as compared with 28 in the *in silico* testing. Phylogenetic analyses of *C. jejuni* and *C. coli* have revealed subpopulations of *C. coli* that are highly similar to *C. jejuni* and this may account for the high detection of *C. coli* using MIST with certain assays. Patterns of gene flow suggest introgression of *C. jejuni* into *C. coli* and the long term despeciation between *C. jejuni* and one of three *C. coli* lineages, due to a shared ecological niche (Sheppard et al., 2008). *In silico* analysis is an excellent predictor of the qPCR but ultimately must be confirmed on actual isolates and reported following specific guidelines to ensure reliability and reproducibility of the results (Bustin et al., 2009).

We selected the Josefsen et al. (2004) assay because it demonstrated good specificity and sensitivity and in addition, it was designed for exclusive detection of thermotolerant *Campylobacter*, including *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari*. Amongst the 22 species of *Campylobacter* that have been described, these 3 species are the major cause of human disease. However, BLAST analysis revealed that some species of *Campylobacter* were not detected by Josefsen's assay like emerging *C. ureolyticus*, *C. concisus* and *C. upsaliensis* (Man et al., 2011). These 3 species are detected by Lund's assay and only *C. ureolyticus* is detected by de Boer's assay. It is important to report here as these species might be found to be responsible for important burdens like it is suggested for *C. ureolyticus* (Bullman et al., 2012). Research or application objectives regarding sensitivity needed towards these species may dictate the decision of choosing between these different *C. spp.* assays. Further assays development targeting pathogenic *Campylobacter* should take these emerging species in consideration.

The Best assay showed a good compromise in sensitivity and specificity between the MIST and in-lab results. In the original description of this assay the authors tested the primers/probe on a panel of 6,015 human isolates including 569 nonspecific *Campylobacter* demonstrating high sensitivity and specificity (Best et al., 2003). This combination of *in silico* and in-lab testing demonstrated the accuracy of the Best assay for application to evaluate the concentration of *C. jejuni* of potential risk to humans in the aquatic environment; hence this assay was selected for application to the environment in our studies.

DPCR is a PCR-based technology that provides sensitive and absolute quantification without the use of a SC for quantitation (Huggett et al., 2015; Sedlak and Jerome, 2013). DPCR differs from qPCR in that it partitions a given PCR sample into many individual reactions. Detection can thus be measured in each of these partitions and absolute quantitative data can be obtained. The limit of detection (LOD) was found attributable to background noise of a specific assay; in other words, LOD determination was when the background noise positive signals variation between replicates was equal to the lowest DNA concentration analysed. Interestingly, differences were observed in the level of

background noise between the two assays tested. Negative control samples revealed false-positive signals that were ten-fold higher in the Best assay (average 131 ± 13) compared to Josefsen (average 10 ± 5). Variations associated with these background noise values affect the LOD because it is impossible to tell if a given value is fully attributable to DNA concentration or background noise. Further optimisation of the Best dPCR assay parameters such as increasing the ramping temperature time, decreasing primers/probes concentrations and increasing the annealing PCR cycle time, may reduce the background noise but may also affect specificity and sensitivity parameters used to select this assay. When comparing digital PCR-based SCs with spectrophotometry-based SCs, coefficients of determination shouldn't be different between each method since the DNA preparation is exactly the same. The small differences observed in the present study may be attributable to technical error. Reaction efficiencies were always higher in dPCR-based SC for both assays especially in the Josefsen assay where a major difference was noticeable. This difference reinforces the notion that dPCR quantification provides more absolute quantification compared with spectrophotometry-based quantification values. Interestingly, this difference in efficiency between the two methods of quantifying DNA was smaller in the Best assay compared to the Josefsen. This may be due to the difference in amplicon sizes generated by these two assays: 287bp for Josefsen and 95bp for Best. These results suggest that a SC based on spectrophotometry and applied to a longer amplicon qPCR assay, would in fact significantly reduce the reaction efficiency: it has been previously reported that qPCR assay sizes were initially designed to be less than 150bp (Rodriguez-Lazaro and Hernandez, 2013). Spectrophotometry readings are based on intact and very large genomic DNA material and might lead to under-estimating the true reaction efficiency.

We have observed in our lab that DNA preparation and long-term storage of *Campylobacter* microorganisms represents a significant challenge. For example, it was hard to obtain reproducible results of CFU based on spectrophotometry measures, or DNA purity based on absorbance measurement ratios 260/280nm. We believe this behavior associated with *Campylobacter* ultimately affected Cq values associated with our spectrophotometry-based SC points. DPCR is a great tool to counter these observed

effects of *Campylobacter* DNA because it provides absolute quantification of the number of genome copies at a specific time and qPCR Cqs can be associated with these quantities when tested in parallel in qPCR. It is also possible to import this dPCR-adjusted SC to previous results using a spectrophotometry-based SC. If the PCR reagents and conditions are similar, the kinetics of the PCR reaction should be similar as well. LinRegPCR (Ruijter et al., 2009) is a useful tool for normalising data from different qPCR runs since the software corrects each sample for its background fluorescence noise and attributes a common Cq threshold for all the samples including the imported dPCR-based SC. DPCR demonstrated that SCs based on spectrophotometry absorbance measures could be overestimating up to 5 times more DNA than what is actually present; hence there is a risk of overestimating *Campylobacter* concentration. Emergence and availability of digital PCR technologies will consolidate the true accuracy of quantification in qPCR and results may show that these new quantification numbers are much closer to MPN or other culture quantification methods.

The limitations in this study are mainly associated with the representativeness of the environmental isolates due to budget limitations, *in silico* sequences and genomes selected for testing. The 61 water isolates came from the same beaches and rivers in a specific area sampled in a limited period of time (three years); however they represent a genetically diverse group of *C. jejuni* isolates (Gosselin-Théberge et al., 2015; manuscript in preparation - Investigating *Campylobacter* potential transmission risk in environmental waters in Southern Quebec, Canada, using real-time PCR and genotyping). Laboratory testing of more *C. coli* isolates would be advantageous since MIST analysis showed that up to 18 *C. coli* genomes were likely to be detected by some of the *C. jejuni* specific assays. Specificity and sensitivity results shown in this study could be inferred to field application of *C. jejuni* specific detection assays described because the isolate population is representative of a summer project. However, such inference would require consideration of possible error due to the limitations enumerated and adjustment in consequence.

5. Conclusions

The findings of this study show the variability of different assays in their ability to accurately quantify *Campylobacter* isolates found in different environmental water sources. This study emphasizes the importance of selecting an appropriate assay for a given application. It also addresses issues of specificity and sensitivity of qPCR detection and quantification of *Campylobacter* in environmental waters. The emergence of dPCR technologies will improve qPCR applications through calibrating SCs to obtain a greater accuracy of quantification. Moreover, this study provides a framework for the future development of *Campylobacter* detection assays that can be designed and tested *in silico* by taking advantage of the increasing availability of genome sequence data in public databases prior to subsequent validation in a laboratory setting.

Acknowledgements

Financial support was obtained from the Public Health Agency of Canada. Conflicts of interest: none.

References

- Baffone, W., Casaroli, A., Citterio, B., Pierfelici, L., Campana, R., Vittoria, E., . . . Donelli, G. (2006). *Campylobacter jejuni* loss of culturability in aqueous microcosms and ability to resuscitate in a mouse model. *Int J Food Microbiol*, *107*(1), 83-91. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.015
- Best, E. L., Powell, E. J., Swift, C., Grant, K. A., & Frost, J. A. (2003). Applicability of a rapid duplex real-time PCR assay for speciation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* directly from culture plates. *FEMS Microbiol Lett*, *229*(2), 237-241.
- Black, R. E., Levine, M. M., Clements, M. L., Hughes, T. P., & Blaser, M. J. (1988). Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J Infect Dis*, *157*(3), 472-479.

- Brooks, J. P., Adeli, A., & McLaughlin, M. R. (2014). Microbial ecology, bacterial pathogens, and antibiotic resistant genes in swine manure wastewater as influenced by three swine management systems. *Water Res*, *57*, 96-103. doi: 10.1016/j.watres.2014.03.017
- Bullman, S., O'Leary, J., Corcoran, D., Sleator, R. D., & Lucey, B. (2012). Molecular-based detection of non-culturable and emerging campylobacteria in patients presenting with gastroenteritis. *Epidemiol Infect*, *140*(4), 684-688. doi: 10.1017/S0950268811000859
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., . . . Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, *55*(4), 611-622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
- de Boer, R. F., Ott, A., Guren, P., van Zanten, E., van Belkum, A., & Kooistra-Smid, A. M. (2013). Detection of *Campylobacter* species and *Arcobacter butzleri* in stool samples by use of real-time multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, *51*(1), 253-259. doi: 10.1128/jcm.01716-12
- Debruyne, L., Broman, T., Bergstrom, S., Olsen, B., On, S. L., & Vandamme, P. (2010). *Campylobacter subantarcticus* sp. nov., isolated from birds in the sub-Antarctic region. *Int J Syst Evol Microbiol*, *60*(Pt 4), 815-819. doi: 10.1099/ijs.0.011056-0
- Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G., & Colin, P. (1999). Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Lett Appl Microbiol*, *29*(6), 406-410.
- Devonshire, A. S., Honeyborne, I., Gutteridge, A., Whale, A. S., Nixon, G., Wilson, P., . . . Huggett, J. F. (2015). Highly Reproducible Absolute Quantification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex by Digital PCR. *Anal Chem*, *87*(7), 3706-3713. doi: 10.1021/ac5041617
- Diergaardt, S. M., Venter, S. N., Spreeth, A., Theron, J., & Brozel, V. S. (2004). The occurrence of campylobacters in water sources in South Africa. *Water Res*, *38*(10), 2589-2595. doi: 10.1016/j.watres.2004.03.004
- Food Standards Agency. (2014). FSA releases first results from *Campylobacter* survey. *Vet Rec*, *175*(7), 158. doi: 10.1136/vr.g5104

- Gonzalez, R. A., & Noble, R. T. (2014). Comparisons of statistical models to predict fecal indicator bacteria concentrations enumerated by qPCR- and culture-based methods. *Water Res*, *48*, 296-305. doi: 10.1016/j.watres.2013.09.038
- Gu, G., Luo, Z., Cevallos-Cevallos, J. M., Adams, P., Vellidis, G., Wright, A., & van Bruggen, A. H. (2013). Occurrence and population density of *Campylobacter jejuni* in irrigation ponds on produce farms in the Suwannee River Watershed. *Can J Microbiol*, *59*(5), 339-346. doi: 10.1139/cjm-2013-0027
- Halford, W. P., Falco, V. C., Gebhardt, B. M., & Carr, D. J. (1999). The inherent quantitative capacity of the reverse transcription-polymerase chain reaction. *Anal Biochem*, *266*(2), 181-191. doi: 10.1006/abio.1998.2913
- He, Y., & Chen, C. Y. (2010). Quantitative analysis of viable, stressed and dead cells of *Campylobacter jejuni* strain 81-176. *Food Microbiol*, *27*(4), 439-446. doi: 10.1016/j.fm.2009.11.017
- Hellein, K. N., Battie, C., Tauchman, E., Lund, D., Oyarzabal, O. A., & Lepo, J. E. (2011). Culture-based indicators of fecal contamination and molecular microbial indicators rarely correlate with *Campylobacter* spp. in recreational waters. *J Water Health*, *9*(4), 695-707. doi: 10.2166/wh.2011.154
- Hill, J. E., Paccagnella, A., Law, K., Melito, P. L., Woodward, D. L., Price, L., . . . Goh, S. H. (2006). Identification of *Campylobacter* spp. and discrimination from *Helicobacter* and *Arcobacter* spp. by direct sequencing of PCR-amplified cpn60 sequences and comparison to cpnDB, a chaperonin reference sequence database. *J Med Microbiol*, *55*(Pt 4), 393-399. doi: 10.1099/jmm.0.46282-0
- Huggett, J. F., Cowen, S., & Foy, C. A. (2015). Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clin Chem*, *61*(1), 79-88. doi: 10.1373/clinchem.2014.221366
- Huggett, J. F., Foy, C. A., Benes, V., Emslie, K., Garson, J. A., Haynes, R., . . . Bustin, S. A. (2013). The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clin Chem*, *59*(6), 892-902. doi: 10.1373/clinchem.2013.206375
- Jensen, A. N., Andersen, M. T., Dalsgaard, A., Baggesen, D. L., & Nielsen, E. M. (2005). Development of real-time PCR and hybridization methods for detection and

- identification of thermophilic *Campylobacter* spp. in pig faecal samples. *J Appl Microbiol*, 99(2), 292-300. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02616.x
- Jiang, H., Dong, H., Zhang, G., Yu, B., Chapman, L. R., & Fields, M. W. (2006). Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. *Appl Environ Microbiol*, 72(6), 3832-3845. doi: 10.1128/aem.02869-05
- Jolley, K. A., & Maiden, M. C. (2010). BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics*, 11, 595. doi: 10.1186/1471-2105-11-595
- Jolley, K. A., Bliss, C. M., Bennett, J. S., Bratcher, H. B., Brehony, C., Colles, F.M., Wilmalarathna, H., Harrison, O. B., Sheppard, S. K., Cody, A. J., & Maiden, M. C. (2012). Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology*, 158(4), 1005-1015. doi: 10.1099/mic.0.055459-0
- Josefsen, M. H., Cook, N., D'Agostino, M., Hansen, F., Wagner, M., Demnerova, K., . . . Hoorfar, J. (2004). Validation of a PCR-based method for detection of food-borne thermotolerant campylobacters in a multicenter collaborative trial. *Appl Environ Microbiol*, 70(7), 4379-4383. doi: 10.1128/aem.70.7.4379-4383.2004
- Kelly, D. J., Hughes, N. J., & Poole, R. K. (2001). Microaerobic physiology: aerobic respiration, anaerobic respiration, and carbon dioxide metabolism. Dans H. L. T. Mobley, G. L. Mendz & S. L. Hazell (dir.), *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC): ASM Press.
- Kruczkiewicz, P., Mutschall, S., Barker, D., Thomas, J., Carrillo, C. D., Van Domselaar, G., . . . Taboada, E. N. (2013). *MIST: a tool for rapid in silico generation of molecular typing data from bacterial genome sequences*. Communication presented at Bioinformatics 2013, Barcelona, Spain.
- LaGier, M. J., Joseph, L. A., Passaretti, T. V., Musser, K. A., & Cirino, N. M. (2004). A real-time multiplexed PCR assay for rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Mol Cell Probes*, 18(4), 275-282. doi: 10.1016/j.mcp.2004.04.002

- Lee, D. H., Cho, S. J., Kim, S. M., & Lee, S. B. (2013). *Sagittula marina* sp. nov., isolated from seawater and emended description of the genus *Sagittula*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 63(Pt 6), 2101-2107. doi: 10.1099/ijs.0.040766-0
- Levesque, S., Frost, E., Arbeit, R. D., & Michaud, S. (2008). Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* isolates from humans, chickens, raw milk, and environmental water in Quebec, Canada. *J Clin Microbiol*, 46(10), 3404-3411. doi: 10.1128/jcm.00042-08
- Lund, M., Nordentoft, S., Pedersen, K., & Madsen, M. (2004). Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 42(11), 5125-5132. doi: 10.1128/jcm.42.11.5125-5132.2004
- Man, S. M. (2011). The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 8(12), 669-685. doi: 10.1038/nrgastro.2011.191
- Medema, G. J., Teunis, P. F., Havelaar, A. H., & Haas, C. N. (1996). Assessment of the dose-response relationship of *Campylobacter jejuni*. *Int J Food Microbiol*, 30(1-2), 101-111.
- Moore, J. E., Corcoran, D., Dooley, J. S., Fanning, S., Lucey, B., Matsuda, M., . . . Whyte, P. (2005). *Campylobacter*. *Vet Res*, 36(3), 351-382. doi: 10.1051/vetres:2005012
- Mullner, P., Spencer, S. E., Wilson, D. J., Jones, G., Noble, A. D., Midwinter, A. C., . . . French, N. P. (2009). Assigning the source of human campylobacteriosis in New Zealand: a comparative genetic and epidemiological approach. *Infect Genet Evol*, 9(6), 1311-1319. doi: 10.1016/j.meegid.2009.09.003
- Murray, C. J., Vos, T., Lozano, R., Naghavi, M., Flaxman, A. D., Michaud, C., . . . Memish, Z. A. (2012). Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380(9859), 2197-2223. doi: 10.1016/s0140-6736(12)61689-4
- Nogva, H. K., Bergh, A., Holck, A., & Rudi, K. (2000). Application of the 5'-nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol*, 66(9), 4029-4036.

- On, S. L. (1996). Identification methods for *Campylobacter*, *Helicobacter*, and related organisms. *Clin Microbiol Rev*, 9(3), 405-422.
- Oster, R. J., Wijesinghe, R. U., Haack, S. K., Fogarty, L. R., Tucker, T. R., & Riley, S. C. (2014). Bacterial pathogen gene abundance and relation to recreational water quality at seven Great Lakes beaches. *Environ Sci Technol*, 48(24), 14148-14157. doi: 10.1021/es5038657
- Park, S. F. (2002). The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol*, 74(3), 177-188.
- Patrone, V., Campana, R., Vallorani, L., Dominici, S., Federici, S., Casadei, L., . . . Baffone, W. (2013). *CadF* expression in *Campylobacter jejuni* strains incubated under low-temperature water microcosm conditions which induce the viable but non-culturable (VBNC) state. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103(5), 979-988. doi: 10.1007/s10482-013-9877-5
- Pitkanen, T., Ryu, H., Elk, M., Hokajarvi, A. M., Siponen, S., Vepsalainen, A., . . . Santo Domingo, J. W. (2013). Detection of fecal bacteria and source tracking identifiers in environmental waters using rRNA-based RT-qPCR and rDNA-based qPCR assays. *Environ Sci Technol*, 47(23), 13611-13620. doi: 10.1021/es403489b
- Pusterla, N., Madigan, J. E., Chae, J. S., DeRock, E., Johnson, E., & Pusterla, J. B. (2000). Helminthic transmission and isolation of *Ehrlichia risticii*, the causative agent of Potomac horse fever, by using trematode stages from freshwater stream snails. *J Clin Microbiol*, 38(3), 1293-1297.
- Reischl, U., & Kochanowski, B. (1995). Quantitative PCR. A survey of the present technology. *Mol Biotechnol*, 3(1), 55-71. doi: 10.1007/bf02821335
- Rodriguez-Lazaro, D., & Hernandez, M. (2013). Real-time PCR in Food Science: Introduction. *Curr Issues Mol Biol*, 15(2), 25-38.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J., & Moorman, A. F. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res*, 37(6), e45. doi: 10.1093/nar/gkp045

- Savill, M. G., Hudson, J. A., Ball, A., Klena, J. D., Scholes, P., Whyte, R. J., . . . Jankovic, D. (2001). Enumeration of *Campylobacter* in New Zealand recreational and drinking waters. *J Appl Microbiol*, *91*(1), 38-46.
- Sedlak, R. H., & Jerome, K. R. (2013). Viral diagnostics in the era of digital polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis*, *75*(1), 1-4. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.10.009
- Seinige, D., von Kockritz-Blickwede, M., Krischek, C., Klein, G., & Kehrenberg, C. (2014). Influencing factors and applicability of the viability EMA-qPCR for a detection and quantification of *Campylobacter* cells from water samples. *PLoS One*, *9*(11), e113812. doi: 10.1371/journal.pone.0113812
- Sheppard, S. K., McCarthy, N. D., Falush, D., & Maiden, M. C. (2008). Convergence of *Campylobacter* species: implications for bacterial evolution. *Science*, *320*(5873), 237-239. doi: 10.1126/science.1155532
- Teunis, P., Van den Brandhof, W., Nauta, M., Wagenaar, J., Van den Kerkhof, H., & Van Pelt, W. (2005). A reconsideration of the *Campylobacter* dose-response relation. *Epidemiol Infect*, *133*(4), 583-592.
- Tholozan, J. L., Cappelier, J. M., Tissier, J. P., Delattre, G., & Federighi, M. (1999). Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. *Appl Environ Microbiol*, *65*(3), 1110-1116.
- Thomas, C., Hill, D., & Mabey, M. (2002). Culturability, injury and morphological dynamics of thermophilic *Campylobacter* spp. within a laboratory-based aquatic model system. *J Appl Microbiol*, *92*(3), 433-442.
- Tissier, A., Denis, M., Hartemann, P., & Gassilloud, B. (2012). Development of a rapid and sensitive method combining a cellulose ester microfilter and a real-time quantitative PCR assay to detect *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in 20 liters of drinking water or low-turbidity waters. *Appl Environ Microbiol*, *78*(3), 839-845. doi: 10.1128/aem.06754-11
- Toplak, N., Kovac, M., Piskernik, S., Mozina, S. S., & Jersek, B. (2012). Detection and quantification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* using real-time multiplex PCR. *J Appl Microbiol*, *112*(4), 752-764. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05235.x

- Tuomi, J. M., Voorbraak, F., Jones, D. L., & Ruijter, J. M. (2010). Bias in the Cq value observed with hydrolysis probe based quantitative PCR can be corrected with the estimated PCR efficiency value. *Methods*, 50(4), 313-322. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.02.003
- Villarreal, J. V., Schwartz, T., & Obst, U. (2010). Culture-independent techniques applied to food industry water surveillance - a case study. *Int J Food Microbiol*, 141 Suppl 1, S147-155. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.001
- Wery, N., Lhoutellier, C., Ducray, F., Delgenes, J. P., & Godon, J. J. (2008). Behaviour of pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. *Water Res*, 42(1-2), 53-62. doi: 10.1016/j.watres.2007.06.048
- World Health Organization. (2011). *Campylobacter*. Fact sheet N°255. Available at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>
- Wilson, D. L., Abner, S. R., Newman, T. C., Mansfield, L. S., & Linz, J. E. (2000). Identification of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* by use of a fluorogenic PCR assay. *J Clin Microbiol*, 38(11), 3971-3978.
- Won, G., Gill, A., & Lejeune, J. T. (2013). Microbial quality and bacteria pathogens in private wells used for drinking water in northeastern Ohio. *J Water Health*, 11(3), 555-562. doi: 10.2166/wh.2013.247
- Yang, C., Jiang, Y., Huang, K., Zhu, C., & Yin, Y. (2003). Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 38(3), 265-271.
- Zhou, L., Li, H., Zhang, Y., Wang, Y., Han, S., & Xu, H. (2012). Abundance and diversity of *Sphingomonas* in Shenfu petroleum-wastewater irrigation zone, China. *Environ Sci Pollut Res Int*, 19(1), 282-294. doi: 10.1007/s11356-011-0552-

Tables

Table II. BLAST analysis of hydrolysis probe-based qPCR assays targeting *Campylobacter*.

Assays	Primers BLAST ¹	Number of mismatch				n ³	% Sp ⁴
		0	1	2	3+ ²		
<i>Campylobacter</i> spp.							
de Boer et al., 2013	F / P ⁵	141 (1) ⁶	130 (2)	0	0	274	99
	P / R	156 (33)	1 (1)	127 (125)	1	444	64
Josefsen et al., 2004	F / P	223	20 (1)	5 (1)	178 (5)	433	98
	P / R	254	11	91	2	358	100
Lund et al., 2004	F / P	305 (2)	22	107 (104)	1 (1)	542	80
	P / R	296 (2)	13	204 (202)	11 (10)	738	71
<i>Campylobacter jejuni</i>							
Best et al., 2003	F / P	11	1	0	0	12	100
	P / R	12	0	0	0	12	100
He and Chen, 2010	F / P	1	6	5	1 (1)	14	93
	P / R	1	7	4	4 (4)	20	80
Jensen et al., 2005	F / P	12	1	0	0	13	100
	P / R	12	1	0	0	13	100
LaGier et al., 2004	F / P	13	1	3	0	17	100
	P / R	13	3	1	0	17	100
Nogva et al., 2000	F / P	10	2	2	0	14	100
	P / R	8	3	3	0	14	100
Toplak et al., 2012	F / P	9	2	0	0	11	100
	P / R	9	2	0	0	11	100
Villarreal et al., 2010	F / P	3	8	2	0	13	100
	P / R	13	0	0	0	13	100
Wilson et al., 2000	F / P	48	118	3	0	169	100
	P / R	3	21	86	2	112	100
Yang et al., 2003	F / P	13	0	0	0	13	100
	P / R	1	12	0	0	13	100

¹Primers BLAST were performed using the publicly available tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>.) described by Ye et al. (2012). Target templates were found in the Nucleotide collection database from GenBank.

²For a maximum of 6 mismatches. Sequences that had mismatches beyond that number were not considered in this table.

³Number of sequences analysed.

⁴Number of *Campylobacter* specific sequences divided by the number of total sequences including nonspecific organisms or species sequences detected by the *Campylobacter* specific assays.

⁵F = Forward primer, R = Reverse primer and P = Probe. Sequences of these oligonucleotides were analysed using the Primer BLAST tool described above.

⁶The number in parentheses represents the number of sequences analysed that were not specific to the assay's target. Other organisms than *Campylobacter* were found to have a certain level of homology considering a maximum of 6 mismatches for *C. spp.* assays.

Table III. Comparison of the sensitivity and specificity of *Campylobacter* detection using different qPCR assays on 61 environmental water isolates.

Assays	Specificity ¹		Sensitivity ²	
		95% CI ³		95% CI
<i>Campylobacter</i> spp.				
de Boer	na ⁴	na	0.98	0.91-1.00
Josefsen	na	na	0.98	0.91-1.00
Lund	na	na	0.98	0.91-1.00
<i>Campylobacter jejuni</i>				
Best	1.00	0.75-1.00	1.00	0.93-1.00
He	0.92	0.64-1.00	0.79	0.65-0.90
Toplak	0.85	0.55-0.98	1.00	0.93-1.00
Villarreal	1.00	0.75-1.00	1.00	0.93-1.00
Wilson	1.00	0.75-1.00	0.85	0.72-0.94
Yang	1.00	0.75-1.00	1.00	0.93-1.00

¹Specificity is the number of real-time PCR true negatives signals divided by the total of true negatives samples (true negatives + false positives).

²Sensitivity is the number of real-time PCR true positive signals divided by the total of true positives samples (true positives + false negatives).

³95% confidence interval (determined using FREQ procedure, SAS version 9.4).

⁴Not analysed in the current study.

Table IV. Comparison of the accuracy of quantification based on the standardized ratio $C_{q_i}/C_{q_{ref}}$ values for *C. jejuni* isolates that were not detected by one or more *C. jejuni* specific qPCR assays.

Isolate ID*	Best	He	Toplak	Villarreal	Wilson	Yang
Cjej01	0.981	0.000	1.011	0.975	0.000	0.978
Cjej07	1.064	0.000	0.974	1.072	1.088	1.065
Cjej19	0.893	0.000	0.923	0.880	0.872	0.894
Cjej32	0.998	0.000	1.011	0.992	0.000	0.987
Cjej36	0.981	0.000	1.014	0.978	0.000	0.977
Cjej41	0.981	0.000	1.013	0.984	0.000	0.981
Cjej42	1.004	0.000	1.019	0.998	0.000	1.002
Cjej43	0.969	0.000	0.999	0.976	0.000	0.989
Cjej48	0.959	0.000	0.997	0.973	0.000	0.955
Cjej49	0.956	0.000	0.943	0.956	0.976	0.962

*Identification based on the species and different isolates.

Figures

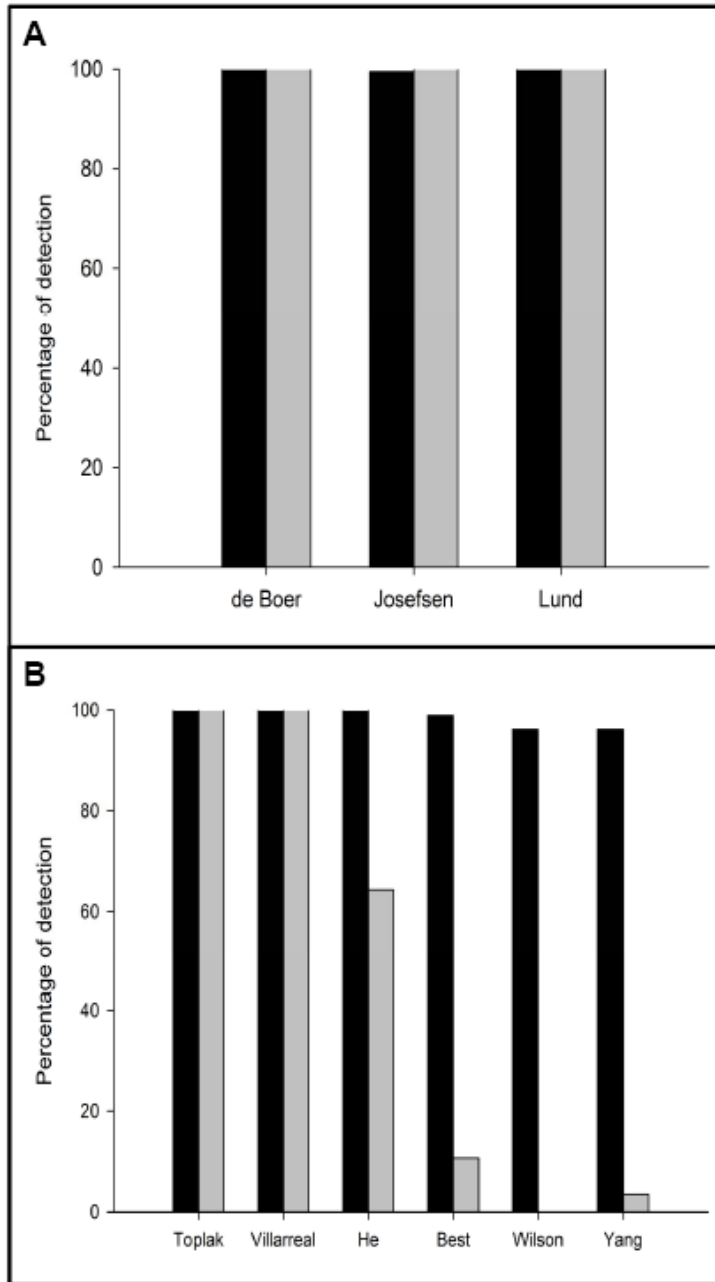


Figure 1. Microbial *in silico* typing (MIST) performance simulation of 9 *Campylobacter* specific qPCR assays against 211 genomes of *C. jejuni* (black bars, n=183) and *C. coli* (gray bars, n=28). *C. spp.* assays are presented in **A** while *C. jejuni* assays are presented in **B**.

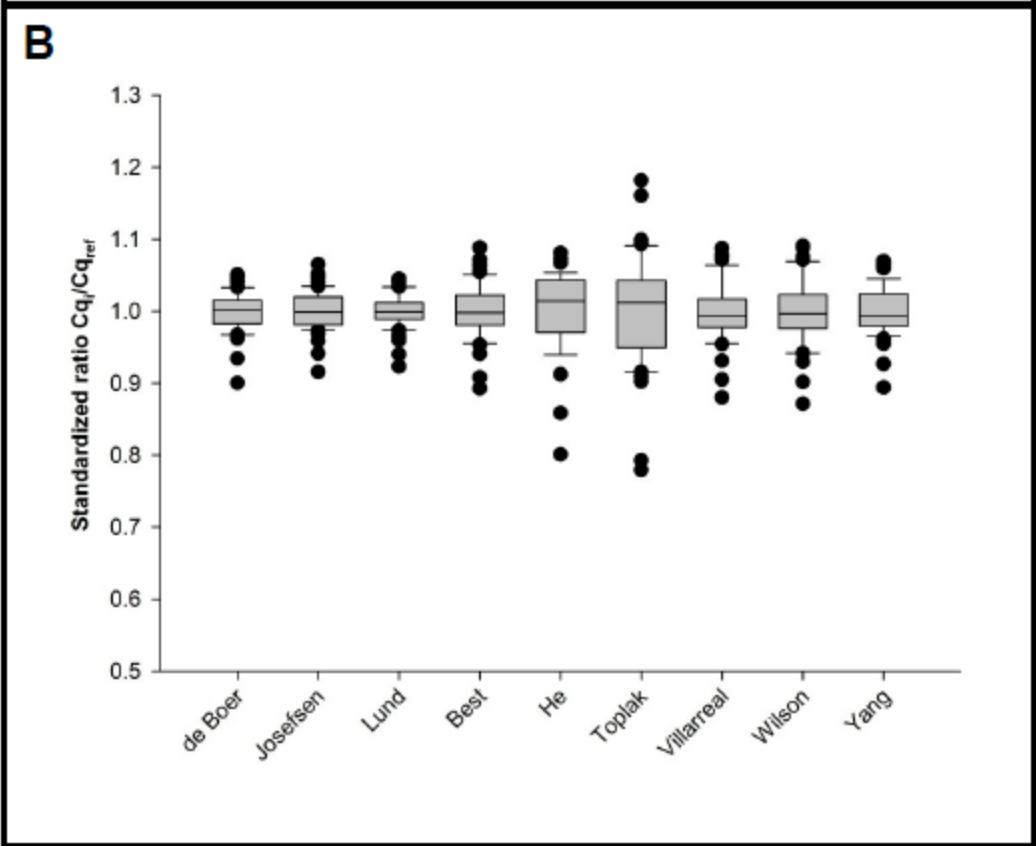
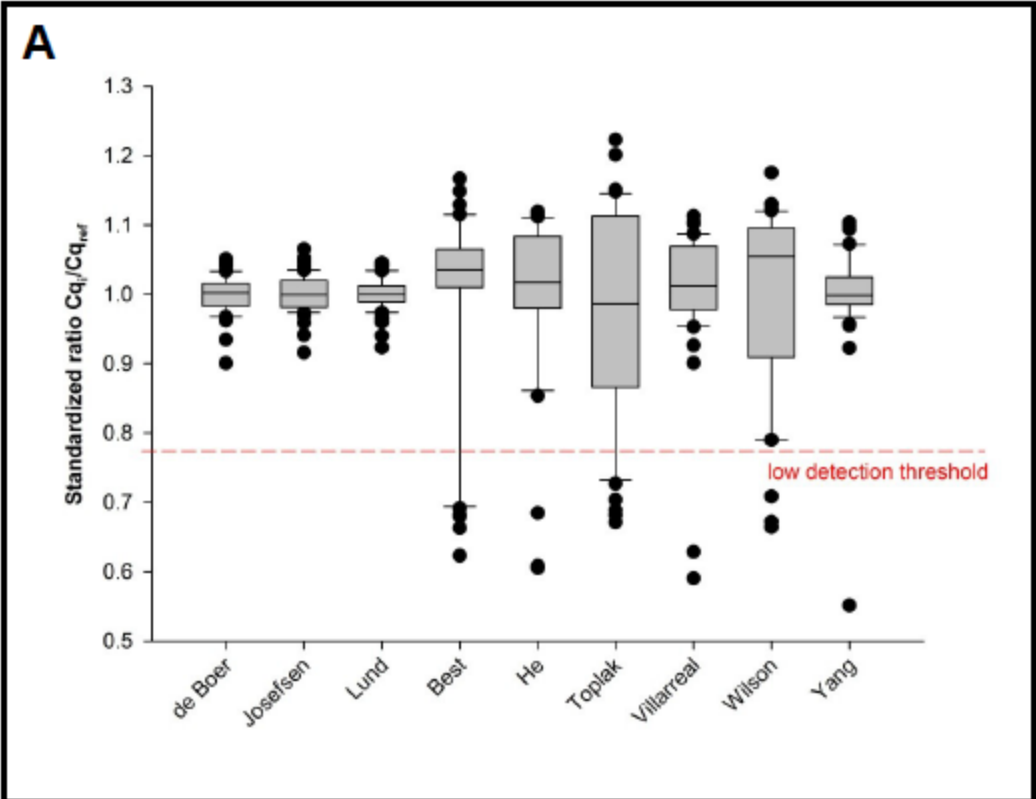


Figure 2. The standardized ratio C_{qi}/C_{qref} (SR C_{qi}/C_{qref}) distribution of 61 environmental water isolates of *Campylobacter* was determined for each of the 3 *C. spp.* and 6 *C. jejuni* qPCR assays as a measure of the accuracy of quantification (A). The lower hinge of the boxes represents the 25th percentile, the middle bar is the median, and the upper hinge is the 75th percentile. The lower bar represents the 5th percentile and upper bar is the 90th percentile. Outliers are represented by back dots. The low detection threshold represents the cutoff where the SR C_{qi}/C_{qref} (0.779) is associated with a low sensitivity of detection in the given qPCR assay (A). This was the case when one (or two) of the triplicate qPCR wells was negative, then the average of the remaining Cq values was used for the calculation of the SR C_{qi}/C_{qref} giving a relatively low index compared to samples showing positive Cq values in all three replicates. For example, the Cq value from a triplicate with the given values 39, 0 and 0 would be 39. The SR C_{qi}/C_{qref} threshold value represents the highest SR C_{qi}/C_{qref} value attributed to an isolate having at least 1 negative detection out of 3 in the triplicate among all others weakly detected isolates (all assays included). (A) The SR C_{qi}/C_{qref} distribution when the low detection values were included. (B) The SR C_{qi}/C_{qref} distribution when the low detection values were removed.

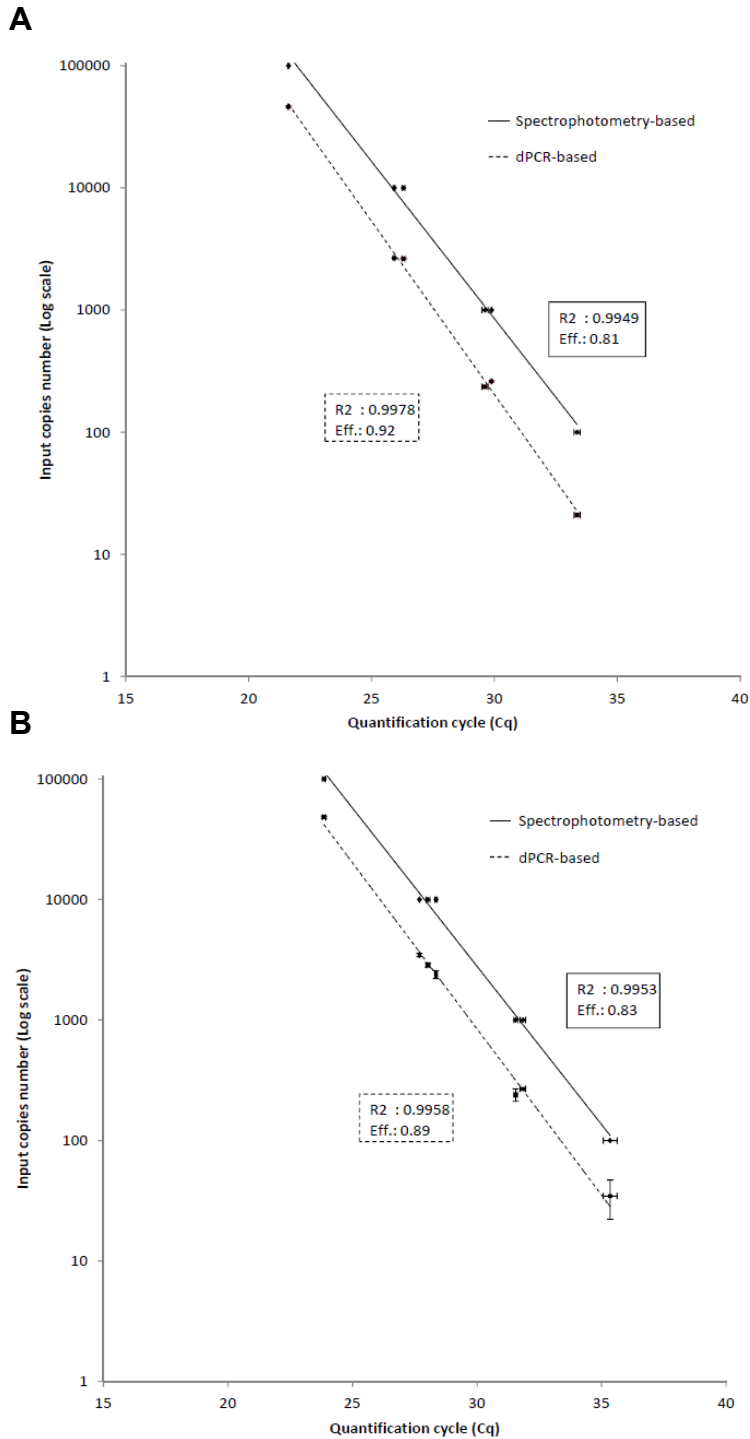


Figure 3. *Campylobacter* standard curves generated using the Josefsen qPCR assay targeting *C. spp.* (A) and Best qPCR assay targeting *C. jejuni* (B) using spectroscopy (solid line) and digital PCR (dotted line)-based DNA calibration. The respective coefficient factor (R^2) and PCR efficiency (Eff.) are shown.

Supplementary material

Table V. Selected qPCR assays for MIST analysis and in-lab experimentation on environmental *Campylobacter* isolates.

Target gene	Oligonucleotide name	Sequence (5' to 3')	Amplicon size (bp)	Application	Reference
16S	Lv116S F	CCTGAMGCAGCAACGCC	107	human feces	de Boer et <i>al.</i> , 2013
	Lv116S R	CGGAGTTAGCCGGTGCTTATT			
	Lv116S P	CTCCGAAAAGTGTCATCCT			
CampySpp	CampySpp F	CTGCTTAACACAAGTTGAGTAGG	287	poultry slaughter (thermotolerant)	Josefsen et <i>al.</i> , 2004
	CampySpp R	TTCCTTAGGTACCGTCAGAA			
	CampySpp P	TGTCATCCTCCACGCGCGTTGCTGC			
camp2	camp2 F	CACGTGCTACAA GGCATAT	108	chicken feces	Lund et <i>al.</i> , 2004
	camp2 R	GGCTTCATGCTCTCGAGTT			
	camp2 P	CAGAGAACAATCCGAACTGGGACA			
<i>mapA</i>	CjmapA F	CTGGTGGTTTTGAAGCAAAGATT	95	human feces	Best et <i>al.</i> , 2003
	CjmapA R	CAATACCAGTGTCTAAAGTGCCTTTAT			
	CjmapA P	TTGAATTCCAACATCGCTAATGTATAAAAGCCCTTT			
<i>LuxS</i>	LuxS F	AGCGATCAAAGCAAATTC	85	EMAqPCR	He and Chen, 2010
	LuxS R	GGCAATTTGTTGGCTTCAT			
	LuxS P	TTAATATCTATCAATGCGGAACTTGCGCAA			
<i>ccoN</i>	CJccoN F	TGGTCTAAGTCTTGAAAAAGTGCCA	81	chicken juice and tap water models	Toplak et <i>al.</i> , 2012
	CJccoN R	ACTCTTATAGCTTTTCAAATGGCATATCC			
	CJccoN P	CTCCTGCTAAATAATTTAA-MGB			
VS*	VS1 F	ATTAGGTCTTAATACTAAAGATCAGCAAGGT	115	water and food industry surveillance	Villarreal et <i>al.</i> , 2010
	VS1 R	CGTCCTTTGTCTTATGGTTTGAATT			
	VS1 P	TGGCGTATTTGATGAATGTTT			
VS*	VS15 F	GAATGAAATTTTAGAATGGGG	358	food, milk, water	Yang et <i>al.</i> , 2003
	VS16 R	GATATGTATGATTTTATCCTGC			
	VS156 P	TTAACTTGGCTAAAGGCTAAGGCT			
AMP <i>gyrA</i>	JL238 F	TGGGTGCTGTATAGGTCGT	192	antibiotics resistance	Wilson et <i>al.</i> , 2000
	JL239 R	GCTCATGAGAAAGTTTACTC			
	TAQ2 P	CCACATGGAGATACAGCAGTTTATGATG			

*Variable sequences different in both assay.

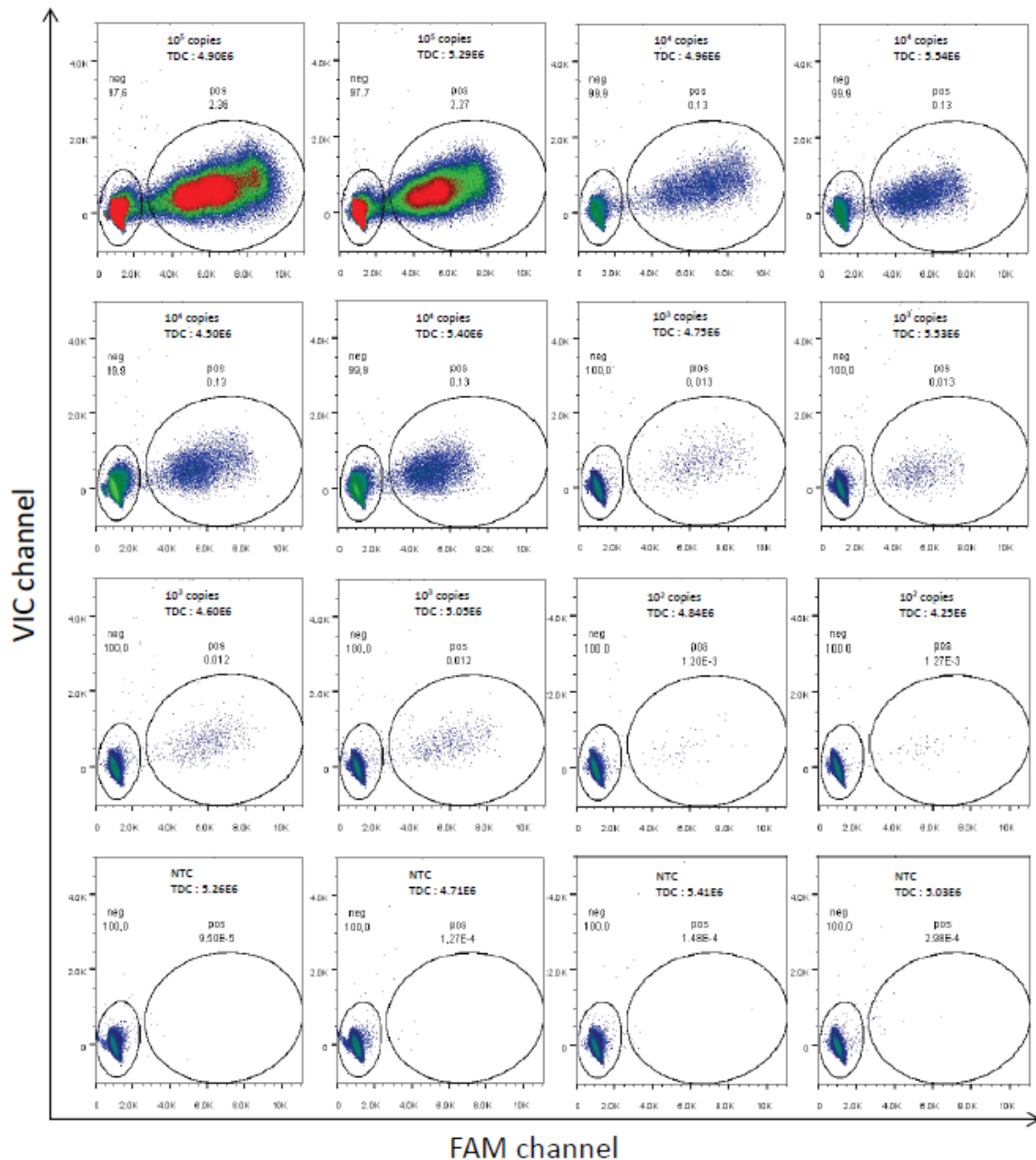


Figure 4. Gate clustering of fluorescence amplification in dPCR using the Josefsen *C. spp.* primers/probe. Ten fold dilutions of DNA from 10^5 to 10^2 copies/reaction were run with original DNA concentration estimates made using spectrophotometry. Each concentration was run in duplicate on the same digital PCR chip. Total droplet count (TDC), percentages of the positive droplets (pos) and negative droplets (neg) for each cluster are shown.

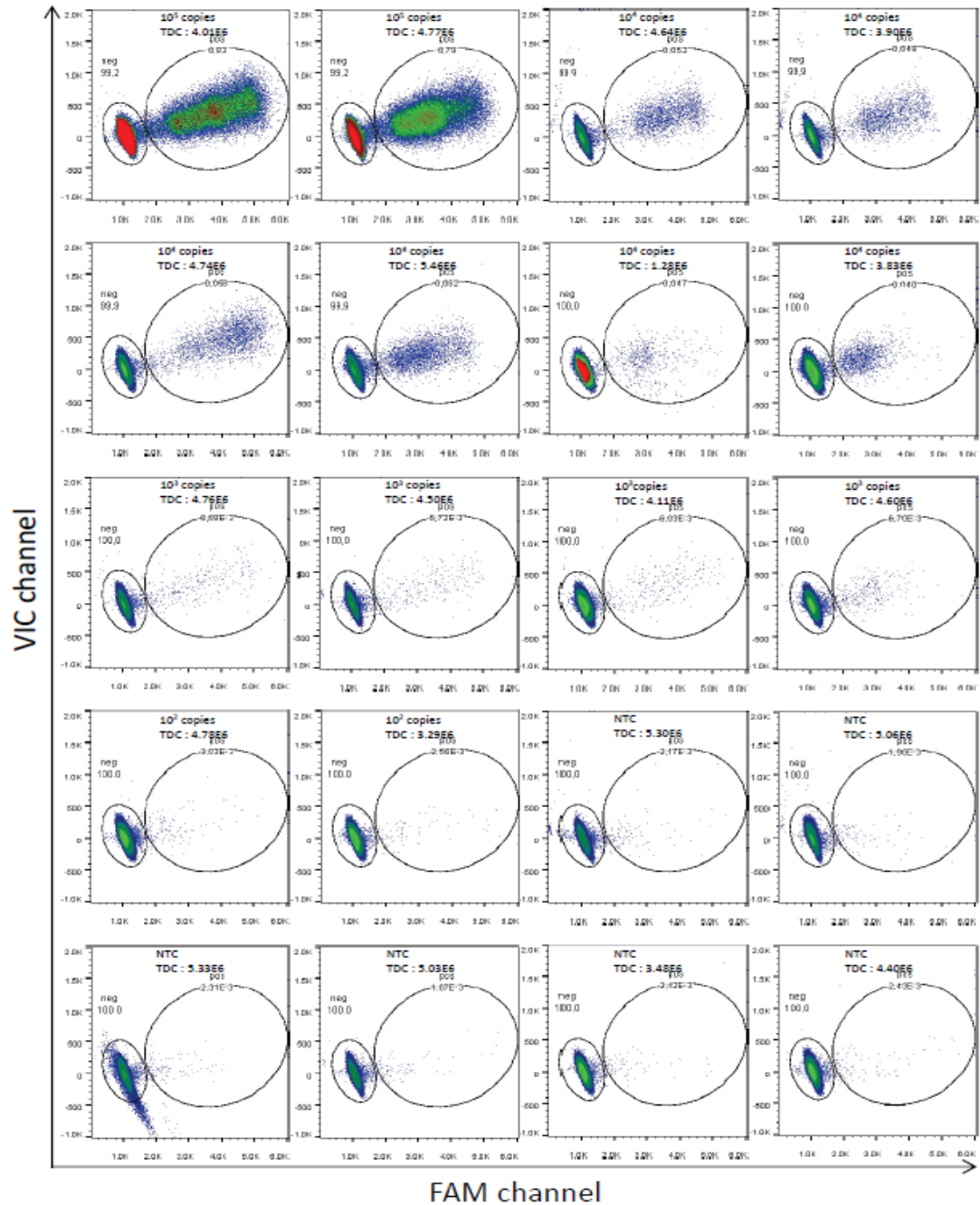


Figure 5. Gate clustering of fluorescence amplification in dPCR using the Best *C. jejuni* primers/probe. Ten fold dilutions of DNA from 10^5 to 10^2 copies/reaction were run with original DNA concentration estimates made using spectrophotometry. Each concentration was run in duplicate on the same digital PCR chip. Total droplet count (TDC), percentages of the positive droplets (pos) and negative droplets (neg) for each cluster are shown.

Investigating *Campylobacter* in environmental waters as a potential source of human infection in Southern Quebec, Canada, using real-time PCR and genotyping

Author Names and Affiliations: Maxime Gosselin-Théberge^{1,2}, Julie Arsenault², Rebecca A. Guy^{1,2}

¹Public Health Agency of Canada, Saint-Hyacinthe, QC, Canada; ²Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

ABSTRACT

Campylobacter, an important zoonotic pathogen responsible for most bacterial-related gastro-enteritis, is a food and waterborne pathogen. Little is known about environmental water as a source of transmission to humans. Different environmental water sources were investigated (recreational waters, drinking water source waters and sewage waters) in the southern region of Quebec (Canada) in order to evaluate their potential risk of campylobacteriosis transmission by: 1) investigating *Campylobacter* presence and concentrations in different water sources, 2) investigating genetic similarities between environmental water and clinical isolates from the same region. Drinking water source water was more frequently contaminated (84%) than recreational waters (33%) ($p < 0.001$) based on qPCR. *Campylobacter* viability was lower in drinking water source waters compared to recreational and sewage waters based on a PMAqPCR viability assay. QPCR quantification showed that sewage waters had the highest concentrations of *C. spp.* and *C. jejuni* (counts of 600 to 14 000 cells/L) while recreational waters showed the lowest (counts of 0 to 880 cells/L). Based on comparative genomic fingerprinting (CGF), sewage water isolates were the most genetically similar to clinical isolates, while recreational water isolates were the least similar. Genetic diversities were high, but no difference was found between the different water sources. Of the water isolates from this study, 36% had genotypes that were previously reported from clinical samples in the Canadian CGF database, 35% were newly described genotypes, and 24% were identical to genotypes that were isolated from agricultural animals. In this study, men clinical cases were found to be more at risk of being infected by genotypes with high genetic similarity to water genotypes compared to women ($p = 0.04$). Clinical isolates from summer were more genetically similar to drinking water source water isolates ($p < 0.01$). Given the generally low concentrations but omnipresence of *Campylobacter* in environmental waters and genetic similarities with clinical isolates from the same region, water transmission of campylobacteriosis represents a potential risk warranting further investigation.

Keywords: *Campylobacter*; Environment waters; Real-time PCR; comparative genomic fingerprinting, molecular epidemiology; viability

1. Introduction

In industrialized countries, *Campylobacter* is the leading cause of bacterial enteritis. In Canada, the annual incidence of *Campylobacter* infections is 37 reported cases per 100 000 inhabitants (FoodNet Canada, 2013). However, this estimation might be under-evaluating the true number of campylobacteriosis cases since not all cases are reported: up to 2% of the Canadian population might contract a campylobacteriosis each year (Thomas et al., 2006). In addition to the gastrointestinal symptoms, rare cases of campylobacteriosis are associated with severe sequelae including Guillain Barre's syndrome (Keithlin et al., 2014).

Poultry is recognized as the principal reservoir of *Campylobacter*. Consumption of raw or uncooked poultry or food cross-contaminated with poultry products is well documented as the major source of human cases (Nichols et al., 2012; Havelaar et al., 2007). However, many other hosts can be associated with *Campylobacter* and represent sources of human infections. Contact with pets (Procter et al., 2014), cattle (Sanad et al., 2011), wildlife (Greig et al., 2015), flies (Bahrndorff et al., 2014) have also been described as potential sources of contamination, as has been the consumption of raw milk (Revez et al., 2014).

Water might be implicated in the striking summer unexplained peak of reported cases that cannot be attributed to a change in poultry contamination as observed in Quebec (Arsenault et al., 2012; Michaud et al., 2004). Environmental waters can be exposed to fecal contamination from these different animal sources, and are reported as another potential source of human infection by *Campylobacter* (Clark et al., 2003). *Campylobacter* are omnipresent in water and their presence has been reported in different types of environmental water, including: rivers (Jokinen et al., 2010; Hellein et al., 2011), recreational waters (Oster et al., 2014), sewage waters (Wery et al., 2008), treated sewage waters (Rechenburg and Kristenmann, 2009), private well waters (Won et al., 2013), agricultural irrigation waters (Gu et al., 2013) and flood waters (de Man et al., 2014). Moreover, in Canada, *Campylobacter* is the second most frequently associated zoonotic pathogen with drinking water outbreaks (Schuster et al., 2005).

Genetic characterisation of microorganisms provides information regarding genetic similarities and sometimes clonality of different isolates from the same species and helps determine potential sources of contamination. Comparative genomic fingerprinting (CGF) is a new and cost effective subtyping method for typing *C. jejuni* and *C. coli*. While CGF has a high level of concordance with MLST with higher discriminatory power, it represents a subtyping method of interest for *Campylobacter* (Taboada et al., 2012; Deckert et al., 2014). CGF has been used to investigate the association between retail chicken and human genotypes of *Campylobacter* (Deckert et al., 2014) and to analyse the genetic diversity of *Campylobacter* in a turkey flock during the production cycle (El-Adawy et al., 2013).

There is a lack of knowledge regarding the presence of *Campylobacter* in aquatic environments and its potential for transmitting the disease to humans. The aim of this study was to evaluate the potential risk of *Campylobacter* transmission from environmental waters by: 1) comparing the presence and concentrations of *Campylobacter* in different water sources using qPCR; 2) genetically characterizing isolates from different water sources in order to investigate if both water and clinical isolates from the same region share genetic similarities; 3) comparing genetic diversities of the isolates from different water sources and 4) portraying potential sources of contamination using a national database.

2. Materials and methods

2.1 Water samples

2.1.1 Collection

This study was conducted in the Montégérie and Estrie administrative regions of the province of Québec, Canada, between June 2011 and September 2014 inclusively. Drinking water source water was collected upstream from different drinking water treatment plants (WTP) of the St-Lawrence River tributaries, Saint-Hyacinthe and Cowansville WTPs source water. Raw sewage intake samples were collected as

composite samples (24 hour representative automated hourly sampling) at Saint-Hyacinthe's sewage treatment plant (STP). Recreational waters used in this study were obtained from beaches previously described (Guy et al., manuscript in preparation). All water samples had a different number of sampling locations and were collected at different frequencies in a different time frame (Table VI). For each site, multiple 1 L water samples were collected in sterile 1L bottles at the water surface. Each water sample was transported in coolers containing ice packs and was kept at 4°C until processed which occurred within 24 to 48 hr. One liter each was processed for qPCR quantification, PMAqPCR viability estimation and *Campylobacter* isolation. However, not all water samples were processed for all 3 purposes (Table VI).

2.1.2 Filtration

One liter of each water sample was filtered through 0.45µm mixed cellulose esters filters (S-Pak, Millipore, Molsheim, France) for isolation of *Campylobacter* and 0.45µm polyethersulphone filters (Supor-450, Pall, Port Washington, NY, USA) for use in qPCR and PMAqPCR. More turbid waters required more than one filter for processing one liter, especially sewage water samples where only a total of 100 ml of water were filtered per sample. In 2011, the filters were placed on individual Nalgene reusable filter holders with receivers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) that were washed and autoclaved between use. However, in 2012 and 2013, a 3 sample vacuum manifold (Millipore, Molsheim, France) attached to an EZ Stream vacuum pump (Millipore, Molsheim, France) was used to enable faster throughput and processing of the larger number of samples.

2.1.3 DNA extraction

DNA was extracted directly from the filters using the Power Water Kit (Mo Bio, Carlsbad, CA, USA). Using sterile forceps, the filters were removed from the vacuum manifold, carefully curled into a tube shape with the bacterial side facing inwards and placed in the 5 ml tube containing beads. One ml of tissue lysis buffer, PW1 preheated to

55°C, was added to each tube and tubes were placed in a vortex, set at maximum speed, and vortexed for 10 min to disrupt the bacterial cell walls. Following bead-beating, the PW1 solution was carefully removed from the tube and placed in a 1.5 ml microtube to continue with the DNA extraction according to the manufacturer's instructions. When multiple filters were used to filter a sample, a maximum of two filters were processed through the same bead tube. In this case the filter was carefully removed from the bead-beating tube so as to remove as little of the PW1 solution as possible, and a second filter, rolled into a tube shape, was added to the tubes and subjected to bead-beating. When more than one tube was required (more than 2 filters due to water sample turbidity), all the DNA preparation from one water sample was passed through one silicon column for elution of 100 µl with PW6 elution buffer. DNA was stored in screw-capped tubes at -20°C until use. DNA extraction for the qPCR standard curve and its preparation is described in Gosselin-Théberge et al. (manuscript in preparation).

2.1.4 Campylobacter culture isolation from water

Filters containing water concentrates were placed in 100 ml of Bolton *Campylobacter* enrichment Broth containing Bolton Selective Supplement (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom) for 4 hr at 35°C followed by an incubation of 44 hr at 42°C under microaerobic conditions. In 2012, no isolates were obtained using Bolton Broth for sewage water isolation. Therefore, Preston Selective Supplement (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom) was used based on preliminary lab tests that showed increased *Campylobacter* yield from sewage samples using Preston Broth, whereas Bolton and Park-Sanders Broth had a very poor yield (data not shown). Isolation was performed on modified Charcoal-Cefoperazone-Deoxycholate Agar (mCCDA) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom) following 24-72 h incubation at 42°C in microaerobic conditions 5% O₂ 10% CO₂ 85% N₂. Typical colonies were purified on Mueller-Hinton (MH) Agar (Oxoid) containing 5% Lysed Horse Blood (Oxoid) and incubated another 48 hr at 42°C in microaerobic conditions. Five typical colonies per sample were selected and identified at the genus level using Gram coloration, catalase and oxidase tests. Molecular identification was done to confirm the genus and determine

the species using multiplex PCR targeting thermotolerant *C. spp.*, *C. jejuni* and *C. coli* (Denis et al., 1999). Isolates that were *C. spp.* positive but showing no bands for *C. jejuni* or *C. coli* were PCR amplified and sequenced using Sanger sequencing technology for a *cpn60* coding region (Hill et al., 2006). If the *cpn60* sequence results were negative for *Campylobacter* then the 16s rRNA coding region (Jiang et al., 2006) was sequenced. Isolates were stored at -80°C in Brucella Broth (Oxoid) with 15% glycerol.

2.2 Clinical isolates

2.2.1 Collection

Clinical isolates were collected from Saint-Hyacinthe's Hôpital Honoré-Mercier from 2013-05-31 to 2014-09-31. Following approval of the research protocol (by the research ethics boards of Health Canada/ Public Health Agency of Canada, the Faculty of Medicine at the Université de Montréal and by the research ethics committee of the CSSS for Richelieu-Yamaska), the patients' gender, age and 6-digit postal code of residency were obtained for epidemiological investigation. Each patient was geolocated at the centroid of the 6-digit postal code, and this location was then classified as "rural" or "urban" based on the geographic reference map from Statistics Canada. An urban area was defined as a population center with a demographic concentration of at least 1 000 inhabitants and a population density of 400 per km². Summer period cases were defined as cases which occurred between the second week of June (2013-06-09; 2014-06-08) and second week of September (2013-09-14; 2014-09-13).

2.2.2 *Campylobacter* culture isolation from stool

Stool specimens were streaked on *Campylobacter* blood-free selective media (Oxoid). Agar plates were incubated for 48 hr at 42°C in microaerobic conditions, and another 72 hr if no colonies were visible after 48 hr. Oxidase tests were performed on suspicious colonies and if the test was positive, colonies were streaked on *Campylobacter* blood-free agar with nalidixic acid and cephalotin discs (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom). Gram, mobility and hippurate tests were performed to confirm *Campylobacter*

and identify the species. Isolates were conserved at -20°C in brain heart infusion/glycerol media and collected from the hospital within 4 months. Following storage at -20°C the *Campylobacter* isolates were grown on MH agar for 48 hr as described above for use in DNA extraction and PCR species identification as described in section 2.1.4.

2.3 QPCR and PMAqPCR

Two different qPCR targets were used in this study: 16S rRNA for quantification of thermotolerant *C. spp.* (Josefsen et al., 2004) and the *mapA* virulence factor for quantification of *C. jejuni* (Best et al., 2003). The probes were purchased from IDT Technologies (Coralville, IA, USA) as ZEN probes with FAM reporters and BHQ₂ quenchers. The qPCR assays were performed using either the Stratagene Brilliant core kit (in 2011-2012) or the Brilliant III Mastermix (in 2013-2014) (Stratagene, LaJolla, CA, USA). Each 25 µl reaction included 5 µl of DNA template, 5 mM MgCl₂, 0.8 mM dNTPs, glycerol (Molecular Biology Grade, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at a final concentration of 8% and 1.25U SureStart Taq DNA polymerase when using Stratagene Brilliant core kit. Bovine serum albumin (Fraction V, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to the mastermixes at a final concentration of 300 ng/µl BSA, to reduce the impact of qPCR inhibition. The concentration of primers and probes were 400 nM primers/ 100 nM probe for thermotolerant *C. spp.* quantification, and 300 nM primers/100 nM probe for *C. jejuni* quantification. The cycling conditions for the *C. spp.* 16S assay consisted of an incubation at 95°C followed by 40 cycles of alternating temperatures of 95°C for 15 sec and 58 °C for 60 sec. The cycling conditions for *C. jejuni mapA* consisted of an incubation at 95°C followed by 40 cycles of alternating temperatures of 95°C for 15 sec and 60°C for 60 sec. The PCR reactions were run in an HRM 6500 Rotor-gene instrument (Qiagen, Venlo, Limburg, Netherlands) and visualized in Rotor-Gene Q Series Software version 2.3.1. Fluorescence data were collected at the end of each cycle and each sample was run in triplicate wells. QPCR standard curves were based on genomic DNA from the ATCC 29428 *Campylobacter* reference strain and were calibrated using digital PCR technology (RainDrop Digital PCR System, Raindance Technologies, Bellerica, MA, USA) as described by Gosselin-

Théberge et al. (manuscript in preparation - Comparative evaluation of different real-time PCR assays and standard curve optimisation for enhanced accuracy in quantification of *Campylobacter* in environmental waters).

For recreational waters PMAqPCR analysis, a subset of beach samples (n=131) was selected based on previous results showing high frequencies of qPCR detection. PMA treatment was conducted on the filters following filtration of the water sample. The filter was removed from the unit, placed in a petri dish and 300 μ L of PMA (Biotium, Hayward, CA, USA), at a final concentration of 25 μ M (in 2012 and 2014) or 12.5 μ M (in 2013), was applied directly onto filters. The filters were placed in the dark for an incubation period of 10 min to allow the PMA to enter damaged cells, then the filters were exposed for 5 min to 500 watt light source at a distance of 20 cm on ice to counter high temperature effects. Viability estimation was calculated by dividing the frequency of detection of PMAqPCR by the frequency of detection of qPCR. Viability estimation represents the frequency of viable cells detected compared to total DNA detection.

The Real-time PCR Data Markup Language (RDML) for each qPCR run was imported into the LinRegPCR (version 11.0) quantitative PCR analysis program along with the data from the standard curve to perform a baseline correction and give a common threshold C_q for DNA quantification using algorithms implemented in the software (Ruijter et al., 2009).

2.4 Comparative genomic fingerprinting

Comparative genomic fingerprinting (CGF), based on detection of 40 accessory genes situated on different loci across the genome (Taboada et al., 2012), was used for genotyping the *C. jejuni* and *C. coli* environmental water isolates. The 8 fiveplex PCR reactions were analysed using the QIAxcel capillary electrophoresis platform (Qiagen, Venlo, Netherlands) and the PCR results were converted to binary values. A distance matrix was built including genotyped isolates from this study using the publicly available online tool ShinyMatrix (https://lfz.corefacility.ca/shiny/shiny_matrix/), which is based

on the heatmap.2 function of the gplots package in R (Taboada et al., 2012). Pairwise distances were calculated using a simple matching coefficient factor for binary data. Computation through an unweighted pair group method with arithmetic mean UPGMA algorithm was used to generate distances matrices with given different similarity thresholds. Genotypes obtained were analysed at different genetic similarity levels based on 3 levels of gene presence homology grouping (100%, 95%, 90%).

A maximum of 5 colonies were typed per each environmental sample collected. When the same genotype was found on all 5 colonies, we considered that only 1 isolate was obtained from that specific water sample. If 2 different genotypes were attributed to the 5 colonies from a given environmental water sample, we considered that 2 isolates were obtained from that water sample.

Isolates collected in this study were compared to the Canadian CGF database, which, at the time of this study, contained over 18 000 isolates from animal, clinical, food and environmental sources from multiple surveillance and research initiatives. For each isolate gathered in our study, 100% homologous genotypes were retrieved from the CFG database and the proportion represented by each host source was calculated. These proportions were then averaged over all isolates collected in our study, by source (clinical, recreational water, drinking water source water, sewage water).

2.5 Statistical analyses

Logistic regressions were used to model the presence of *Campylobacter* according to the water sources, with one model performed for each technique (i.e. culture and qPCR). QPCR detection frequencies were tested separately for *C. spp* and *C. jejuni*. The site of sampling was included as a random effect in the model to account for potential clustering between samples collected from the same site. The analysis was performed in SAS 9.4 using Glimmix procedure with Laplace estimation. When water type was statistically significant overall ($P < 0.05$), post-hoc tests were conducted to investigate the significance between each category, with a Bonferonni adjustment for multiple comparisons. For

clinical isolates, Pearson chi-square test with exact computation was used to investigate if characteristics of the patient's (gender, age, urbanicity of residency area, season at time of diagnosis) were associated with infection with a genotype that shared at least 90% CGF homology with any isolates from environmental water obtained in this study. This was performed separately for each water source. A 90% CGF homology based on gene presence/absence was used for statistical analysis because a level of 100% homology was too discriminative. The 90% CGF homology represented no more than 4 genes difference between two isolates. This approach was also used by Deckert et al. (2014) for comparing clinical and poultry isolates. Rarefaction curves with 95% confidence bands were used to compare the genetic diversity of *Campylobacter* isolates at 90% CGF homology according to the various water sources and according to patient characteristics (gender, age, urbanicity of residency, season at time of diagnosis) for clinical isolates as previously described (Chao et al, 2014). These were performed in the iNEXT package of R software (Hsieh et al., 2014).

3. Results

3.1 Frequency of detection and concentrations of *C. spp.* and *C. jejuni* in water

The frequency of *C. spp.* and *C. jejuni* positive samples was significantly lower ($P < 0.05$) in recreational waters compared to drinking water source waters, both for the culture and qPCR methods (Table VII). QPCR detection frequencies of *C. spp.* and *C. jejuni* were on average 2.8 times higher than culture detection frequencies for all water sources. The comparison of qPCR with the PMAqPCR assay for viability estimation suggested that the majority of the *C. spp.* and *C. jejuni* that were detected were viable (Table VIII). Lower viability was observed for *C. spp.* from drinking water source water samples compared to recreational and sewage waters (Table VIII). Sewage water samples had the highest concentrations of *Campylobacter* with a maximum of 14 400 cells/L and 13 600 cells/L for *C. spp.* and *C. jejuni*, respectively (Figure 6). The concentrations of *C. spp.* and *C. jejuni* in drinking water source water were fairly evenly distributed among the 5

concentration categories, whereas the majority of recreational water samples, when positive, had concentrations of ≤ 20 cells/L (Figure 6).

3.2 Species distribution among different sources

A total of 79, 34, 42 and 6 culture positive water samples were further investigated to identify *Campylobacter* to the species level from clinical, recreational, drinking water source and sewage water samples, respectively (Table IX). *C. jejuni* predominated in clinical and water sources, with the exception of sewage water, where *C. coli* was predominantly isolated (Table IX). A single species of *Campylobacter* was identified from all 5 colonies tested per individual water sample, with the exception of the drinking water surface water, where both *C. jejuni* and *C. lari* were isolated from 3 samples, and both *C. coli* and *C. lari* were isolated from 1 sample.

3.3 Genetic characterization

3.3.1 CGF cluster diversity

A total of 184 *Campylobacter* genotypes were identified using CGF: 165 *C. jejuni* and 19 *C. coli* isolates. The maximum number of genotypes per sample obtained in our study were 5, corresponding to 5 isolates for that sample. However, most of the water samples collected showed only 1 isolate where the 5 colonies revealed the same genotype. Depending on the level of homology examined (100%, 95% and 90%), a different number of clusters was observed. There were 30 clusters containing at least 2 isolates and 98 isolates were non-clustered when examining genotypes at 100% CGF homology; 34 clusters with 49 isolates non-clustered for 95% CGF homology; 26 clusters with 37 isolates non-clustered for 90% CGF homology (Figure 7). There were no shared genetic similarities between genotypes of *C. jejuni* and *C. coli* at a CGF level of homology of 90% or above.

Rarefaction curves, based on a 90% CGF homology threshold to define genotypes, were used to compare the genetic diversities of *C. jejuni* and *C. coli* isolates according to their

sources. No significant difference was observed between isolates from the different water sources. However, isolates from clinical sources were more genetically diverse than isolates from recreational water sources (rarefaction curves, 95% confidence intervals) (Figure 8).

3.3.2 Genetic similarities between clinical and water isolates

To determine whether potentially human infectious *Campylobacter* were present in water, the genotypes of the clinical and water isolates collected in our study were compared. Twelve of the 81 clinical isolates identified shared 100% CGF homology with at least one environmental water isolate (data not shown). This frequency increased to 39 clinical isolates when lowering the level of CGF homology to 90%. Not surprisingly, sewage water samples showed the highest frequency of isolates (5/7) sharing genetic similarities (at 90% CGF homology) with the clinical isolates gathered in this study, followed by drinking water source water isolates and recreational water isolates (Table X).

3.3.3 Comparison of the clinical and water isolates with the Canadian CGF database for clinical association

Of the 184 genotypes of *C. jejuni* and *C. coli* isolates identified in this study (water and clinical sources), 67 were novel CGF genotypes that had not been reported in the CGF database (Table XI). Drinking water source water isolates had the highest frequency of newly described genotypes and sewage water the least novel genotypes.

The water CGF genotypes from this study were compared with known clinical genotypes reported in the CGF database. Eighty one out of all 184 *C. jejuni* and *C. coli* genotypes from this study were identical (100% CGF homology) with genotypes that were previously described as clinical according to the CGF database. The percentage of water isolates sharing identical genotypes with isolates reported from humans in the CGF database was the highest in sewage waters and was the lowest in drinking water source water (Table XI).

3.3.4 Comparison of the clinical and water isolates with the Canadian CGF database for source associations

The CGF genotypes of the clinical and water isolates gathered in this study were compared to the same genotypes in the CGF database to identify the reported animal and host sources (Figure 9). At the time of the analysis (2015-03-25) the CGF database source composition of isolates, presented in Figure 9, was 24% poultry (97% chicken, 3% turkeys), 25% ruminants (mostly cows at 99% with a few buffalos, sheep and goats), 3% pigs, 22% environmental water samples, 18% clinical samples and 8% wildlife samples (86% racoons followed by 10% wild birds such as ducks, geese, pelicans, seagulls and sparrows with the remaining 4% from deer, bears, marmots, skunks and other small mammals). Other animals, such as pets (dogs and cats), donkeys, horses and alpacas were also present in the minority in the database (<0.1%).

Results from Figure 9 depicts agriculture (i.e. poultry, pigs and ruminants) as a possible major source of contamination of the same genotypes from the CGF database as were identified in our clinical and sewage isolates (46% and 75% representation respectively), whereas agricultural sources were only representative of 19% and 16% of the drinking water source and recreational water isolates in this study.

3.4 Characteristics of the campylobacteriosis cases

Of the 109 people that were diagnosed with campylobacteriosis, only 81 isolates were recovered due to the inability to revive the remaining 26% of isolates following prolonged cryopreservation; 4 months of conservation at -20°C resulted in a lower recovery. In addition, 5 isolates were lacking patient-related information and were not included in the analyses. Thus, a total of 76 cases were used for epidemiological analyses of genetic types.

No significant difference was observed between age categories of the patients for the proportion of clinical isolates sharing genetic similarities with those of water isolates

(Table XII). There were no differences in the proportion of water-related isolates and clinical isolates derived from patients in urban versus rural areas (Table XII). The clinical isolates obtained during the summer season had a higher genetic similarity to drinking water source water isolates compared with clinical isolates from all other seasons ($p < 0.01$) (Table XII). *Campylobacter* isolated from men were positively associated with similar genotypes isolated from recreational water (90% CGF homology; $p = 0.04$) (Table XII). These analyses could not be conducted for the sewage water source given the low number of isolates.

4. Discussion

4.1 *Campylobacter* presence in water

The frequency of *Campylobacter* isolation in drinking water source waters varies between 10% and 50% among different studies (Denis et al., 2011; Edge et al., 2013). The drinking water source concentrations ranging from 0 to 720 cells/L of *C. spp.* and 600 cells/L for *C. jejuni* with an average of 51 cells/L (56 cells/L for *C. jejuni*) found in this study are comparable with average concentrations of 70 and 110 cells/L described in some studies (Savill et al., 2001; Van Dyke et al., 2010). Whereas, other studies report higher concentrations in surface waters, ranging between 1 000 and 600 000 cells/L using culture based methods or various qPCR assays (Diergaardt et al., 2004; Hellein et al., 2011; Vereen et al., 2007). Hokajarvi et al. (2013) reported a 58% detection frequency using culture isolation in Finnish bathing waters, which was higher than what was found in this study (8%), but their genotyping analysis suggested that recreational water was contaminated by sewage effluents. The average *Campylobacter* recreational water concentrations reported in this study were 11 cells/L for *C. spp.* and 14 cells/L for *C. jejuni*. Hokajarvi et al. (2013) reported an average *Campylobacter* concentration in recreational waters of 100 cells/L using a semi-quantitative culture-based method and Osters et al. (2014) reported higher concentrations when qPCR was used for quantification with median concentrations from 7 beaches of nearly 100 000 cells/L.

However, these high concentrations may be because they selected highly impacted beaches for their study.

Environmental factors, such as temperature and nutrients in water microcosms may also account for variations in the presence and concentration of *Campylobacter* in environmental waters (Thomas et al., 1999). Land use practices in agricultural watersheds such as manure application, pasture and cropland coverage, are known factors influencing the contamination of *Campylobacter* in environmental waters (Wilkes et al., 2011). High concentrations may also be due to overestimation of the concentration due to inaccurate standard curves, as the standard curve has been shown to play a crucial role in the accuracy of *Campylobacter* quantification (Gosselin-Théberge et al., manuscript in preparation). In this study, frequencies of *Campylobacter* isolation were lowest in recreational waters (8%) compared to drinking water source waters (32%) suggesting that the beach water sites were less impacted by fecal contamination.

Campylobacter was isolated from 46% of the sewage samples from the Saint-Hyacinthe STP serving just over 50 000 persons. Other studies have reported 66% detection in an STP serving 90 000 persons and 73% for an STP serving 700 000 persons (Lauria-Filgueiras and Hofer, 1998). *Campylobacter* detection in sewage waters is challenging where the organically rich environment and microbial competition cause problems with culture-based isolation methods (Ugarte-Ruiz et al., 2015). In the present study qPCR quantification of sewage water was the water source with the highest concentrations of *Campylobacter*, ranging from 600 to 14 000 cells/L. This is higher than previously reported in a study using qPCR to quantify *Campylobacter* in sewage waters, ranging from 10 to 2 500 cells/L (Wery et al., 2008). Sewage overflows from STPs during heavy rain events increase contaminants in environmental waters (Rechenburg and Kistemann, 2009; ten Veldhuis et al., 2010).

The differences in detection percentages, observed in this study between the culture and qPCR detection methods, suggests that complex water matrices used for *Campylobacter* culture isolation negatively influenced the ability to culture these bacteria. Similar studies

have reported difficulties isolating *Campylobacter* from various water sources resulting in a lack of sensitivity (Jokinen et al., 2012; Abulreesh et al., 2006).

A high level of viability was observed in this study when the PMAqPCR assay was applied to a subset of samples for quantification of viable *Campylobacter*. This assay has been shown to be promising for assessing the viability of *Campylobacter*; however, there are reports of toxicity of the PMA to living cells and incomplete inhibition of dead cell signal detection when applied to *Campylobacter* (Duarte et al., 2015; Pacholewicz et al., 2013). We observed a variation in toxicity among different isolates of *Campylobacter* and in different water environments, when exposed to PMA (data not shown). For this reason we chose not to use the PMAqPCR assay as a quantifier of live cells, but used it instead as an indicator of viability.

4.2 Genetic characterization and similarities between environmental water and clinical *Campylobacter* isolates

C. jejuni was the major species identified in the clinical isolates, whereas *C. coli* were present in 5% of the clinical isolates, which is comparable with other studies (Komba et al., 2015; Moore et al., 2005). No *C. coli* were isolated from recreational waters suggesting that the beaches were not exposed to *C. coli* contamination, whereas *C. lari* was found in both recreational and drinking water source waters. Another study showed isolation of *C. coli* and *C. lari* with *C. jejuni* being the predominant species in recreational waters (Hokajärvi et al., 2013). *C. lari* is a known human pathogen with rare incidence in humans (Otasevic et al., 2004; Prasad et al., 2001) and was not found in any of the clinical isolates in this study. *C. lari* has also been isolated in other studies from recreational waters (Savill et al., 2001) and drinking water source water (Eyles et al., 2006). Wild birds are known to be reservoirs of *C. lari* (Waldenstrom et al., 2002) and might contribute to contamination of environmental waters. *C. subantarcticus*, found in one sample in this study, is in fact closely genetically related to *C. lari* (Miller et al., 2014).

Not surprisingly, sewage waters showed isolates having the highest genetic similarities with the clinical samples gathered in this study. The majority of isolates identified from sewage waters in this study were *C. coli*. The Saint-Hyacinthe STP treats both human and food processing industries wastes present in the region (mostly poultry and pig), likely contributing to its high genetic diversity of *Campylobacter* isolates thus showing a greater diversity of possible sources of contamination from our CGF database analysis results. Recreational water isolates had the least genetic similarities with clinical isolates. It has been previously described in studies using MLST that environmental water isolates shared low genetic similarities with clinical isolates (Ramonaitė et al., 2014; Levesque et al., 2013; Muellner et al., 2009). While the use of different culture methods for the clinical and sewage samples in this study was unavoidable, it may have led to an underestimation of the genetic similarities between water and clinical isolates, through selection of specific isolates. Hospital cultivation technique was out of our control and sewage waters isolation media was changed in order to be actually able to collect some isolates as explained earlier. Cultivation media and incubation parameters influence the recovery and genotype of *Campylobacter* isolated from water (Taboada et al., unpublished data). Given these limitations, genetic similarities between water and clinical isolates might have been underestimated in this study.

Recreational water genotypes identified in this study were more similar to clinical-associated genotypes from the Canadian CGF database compared to drinking water source water genotypes. Michaud et al., (2005) investigated possible sources of campylobacteriosis transmission in the Estrie (Eastern township) region of Southern Quebec. They did not find evidence of MLST association between environmental water and human isolates, thus, were unable to confirm environmental water as a major transmission pathway (Levesque et al., 2008). The high level of genetic diversity that was found in our study using CGF was similar to that reported in other studies using MLST, especially the high isolation frequency of novel genotypes in environmental waters (Carter et al., 2009; Levesque et al., 2008). The source and potential for infection of these *Campylobacter* isolates is unknown. The high frequency of novel genotypes occurred mostly because the area studied was not investigated before and has very low

representation in the Canadian CGF database. When describing associated-genotype sources from the Canadian CGF database, one must be aware of bias in the database as it is composed of isolates obtained from different research projects: it lacks space, time and source representativeness. We can use this database to identify potential sources that are known to be a host of a specific genotype or water-related source that are very likely infective for humans (see section 4.3). Sources that were absent or infrequently represented in the CGF database might in fact represent hosts that might have access to water and could act as potential sources of contamination in the environment. Geographical and temporal factors might also influence the presence of specific genotypes among different sources. However, Hannon et al. (2009) reported clusters of genetically similar isolates regardless of temporal or geographical framework similar to what we report in this study. We did not find any clinical isolates matching environmental isolates at 100% CGF homology, when samples were collected less than 3 weeks apart. Given the fact that CGF is based on the detection of 40 accessory genes, we can hypothesize that a specific niche of *Campylobacter* will select for specific patterns among those genes and that may be reflected in the CGF database. Further work regarding the Canadian CGF database should be considered in order to truly ascertain its value regarding hosts specificity to CGF profiles.

Differences in the genetic diversity between different water sources may point out a water source that is more exposed to multiple-sources of contamination compared to others. We compared water sources by combining several water sites. There were no differences in genetic diversities between the different water sources in this study or in the study of Rodriguez-Martinez et al (2013), although our sample size for sewage water was very low, which limits our conclusions. Hence, the risk of exposure to multiple sources of contamination and, therefore, genetically diverse *Campylobacter*, is probably dependent on the site of exposure.

4.3 Epidemiology of *Campylobacter* based on a molecular approach

According to the results from this study and comparisons with others, there might be a risk of contracting campylobacteriosis following environmental water exposure, and that this risk may differ from one water source to another based on the frequency of detection and concentration of *Campylobacter*. Results from this study showed that clinical isolates were more genetically similar to drinking water source isolates than recreational water sources. Drinking water source water is effectively treated at drinking water treatment plants to remove pathogens such as *Campylobacter*, prior to distribution for human consumption. Results from this study highlight the importance of avoiding water treatment failures as they can cause important outbreaks of *Campylobacter* (Clark et al., 2003).

Men were more likely to be infected with the same *Campylobacter* genotypes found in recreational waters, compared to women ($p=0.04$). Clinical isolates from the summer period were more likely to be genetically related to drinking water source water isolates compared to other time periods. This supports the hypothesis that environmental water might be implicated in the rise in campylobacteriosis cases during this period (Arsenault et al., 2011; Michaud et al., 2005). The potential importance of environmental waters in sporadic transmission of campylobacteriosis is not fully elucidated but it is known that swimming in recreational waters represents a risk factor for infection with *Campylobacter* (Denno et al., 2009; Schonberg-Norio et al., 2004).

The genetic links between environmental water and clinical isolates described in this study may also be underestimated because of the geographical and temporal distribution of the campylobacteriosis cases and the water sources studied. Except for the sewage and drinking water treatment plants, the risk of exposure to sampled environmental waters for patients consulting at this hospital was likely low, given that the hospital was located 36 to 82 km away from the drinking water source water and 16 to 87 km away from the recreational water sampling points. It is also important to recognize that the directionality of the potential transmission of genetically similar isolates between human and water source could not be established with our study design. Perhaps there is a common source

of infection that contaminates the waters and the humans at the same time. The time frame between collection of environmental and clinical isolates might lead to an over- or underestimation of the proportion of environmental isolates sharing genetic similarities with clinical isolates because the genotypes might change from year to year and the samples were not all collected in the same time period.

5. Conclusions

This study used molecular and epidemiological approaches to help fill the knowledge gap of the presence and potential transmission to humans of *Campylobacter* in aquatic environments in Southern Quebec.

- *Campylobacter* were present at different frequencies in the environmental water sources and generally, at low concentrations.
- Some of the water isolates were genetically identical to clinical isolates from the same region and from other regions across Canada based on CGF 40 suggesting the potential risk for human infection if water containing these isolates is ingested.
- Clinical *Campylobacter* isolated during the summer period were more genetically similar to drinking water source water isolates than clinical *Campylobacter* isolated during other periods. This was not observed for recreational water isolates.
- Men were found to be infected with more *Campylobacter* with genotypes similar to recreational water than women.
- Water transmission of campylobacteriosis in the region studied is likely possible and requires further investigation.

Acknowledgements

Financial support was obtained from the Public Health Agency of Canada. Conflicts of interest: none. We would like to thank Dre Vibien and hospital staff from Saint-Hyacinthe's hospital, Hôpital Honoré-Mercier, for providing clinical isolates and related

patients information, We also thank Caroline Robert and her team from the Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques and the project on the St Lawrence Action Plan 2011-2016, for providing drinking water source water samples. We thank all the beach owners for providing access to their beaches and the staff of the Saint-Hyacinthe and Cowansville sewage and drinking water treatment plants. We are grateful to Dr. Taboada and Steven Mutschall for providing training in CGF and access to the CGF database. We are also grateful for expert laboratory technical assistance from Julie Légaré (PHAC Saint-Hyacinthe) as well as support from students: Maxime Gervais, Sébastien Marois (Université de Sherbrooke), Mélanie Lambert and Solenne Gilbert (IUT Créteil), Margaux Champon (IUT Lyon), Laurence Bessette-Pellerin and Élise Marcotte (CÉGEP St-Jean-sur-Richelieu).

References

- Abulreesh, H. H., Paget, T. A., & Goulder, R. (2006). *Campylobacter* in waterfowl and aquatic environments: incidence and methods of detection. *Environmental Science & Technology*, *40*(23), 7122-7131.
- Arsenault, J., Berke, O., Michel, P., Ravel, A., & Gosselin, P. (2012). Environmental and demographic risk factors for campylobacteriosis: do various geographical scales tell the same story? *BMC Infectious Diseases*, *12*, 318. doi: 10.1186/1471-2334-12-318
- Arsenault, J., Ravel, A., Michel, P., Berke, O., & Gosselin, P. (2011). Do patients with recurrent episodes of campylobacteriosis differ from those with a single disease event? *BMC Public Health*, *11*, 32. doi: 10.1186/1471-2458-11-32
- Bahrndorff, S., Gill, C., Lowenberger, C., Skovgard, H., & Hald, B. (2014). The effects of temperature and innate immunity on transmission of *Campylobacter jejuni* (*Campylobacteriales: Campylobacteraceae*) between life stages of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, *51*(3), 670-677.
- Best, E. L., Powell, E. J., Swift, C., Grant, K. A., & Frost, J. A. (2003). Applicability of a rapid duplex real-time PCR assay for speciation of *Campylobacter jejuni* and

- Campylobacter coli* directly from culture plates. *FEMS Microbiology Letters*, 229(2), 237-241.
- Carter, P. E., McTavish, S. M., Brooks, H. J., Campbell, D., Collins-Emerson, J. M., Midwinter, A. C., & French, N. P. (2009). Novel clonal complexes with an unknown animal reservoir dominate *Campylobacter jejuni* isolates from river water in New Zealand. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(19), 6038-6046. doi: 10.1128/aem.01039-09
- Chao, A., Gotelli, N. J., Hsieh, T. C., Sander, E. L., Ma, K. H., Colwell, R. K., & Ellison, A. M. (2014). Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecological Monographs*, 84(1), 45-67. doi: 10.1890/13-0133.1
- Clark, C. G., Price, L., Ahmed, R., Woodward, D. L., Melito, P. L., Rodgers, F. G., . . . Ellis, A. (2003). Characterization of waterborne outbreak-associated *Campylobacter jejuni*, Walkerton, Ontario. *Emerging Infectious Diseases*, 9(10), 1232-1241. doi: 10.3201/eid0910.020584
- de Man, H., van den Berg, H. H., Leenen, E. J., Schijven, J. F., Schets, F. M., van der Vliet, J. C., . . . de Roda Husman, A. M. (2014). Quantitative assessment of infection risk from exposure to waterborne pathogens in urban floodwater. *Water Res*, 48, 90-99. doi: 10.1016/j.watres.2013.09.022
- Deckert, A. E., Taboada, E., Mutschall, S., Poljak, Z., Reid-Smith, R. J., Tamblyn, S., . . . McEwen, S. A. (2014). Molecular Epidemiology of *Campylobacter jejuni* Human and Chicken Isolates from Two Health Units. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(2), 150-155. doi: 10.1089/fpd.2013.1610
- Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G., & Colin, P. (1999). Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 29(6), 406-410.
- Denis, M., Tanguy, M., Chidaine, B., Laisney, M. J., Megraud, F., & Fravallo, P. (2011). Description and sources of contamination by *Campylobacter* spp. of river water destined for human consumption in Brittany, France. *Pathologie Biologie*, 59(5), 256-263. doi: 10.1016/j.patbio.2009.10.007

- Denno, D. M., Keene, W. E., Hutter, C. M., Koepsell, J. K., Patnode, M., Flodin-Hursh, D., . . . Tarr, P. I. (2009). Tri-county comprehensive assessment of risk factors for sporadic reportable bacterial enteric infection in children. *J Infect Dis*, *199*(4), 467-476. doi: 10.1086/596555
- Diergaardt, S. M., Venter, S. N., Spreeth, A., Theron, J., & Brozel, V. S. (2004). The occurrence of campylobacters in water sources in South Africa. *Water Res*, *38*(10), 2589-2595. doi: 10.1016/j.watres.2004.03.004
- Duarte, A., Botteldoorn, N., Coucke, W., Denayer, S., Dierick, K., & Uyttendaele, M. (2015). Effect of exposure to stress conditions on propidium monoazide (PMA)-qPCR based *Campylobacter* enumeration in broiler carcass rinses. *Food Microbiol*, *48*, 182-190. doi: 10.1016/j.fm.2014.12.011
- Edge, T. A., Khan, I. U., Bouchard, R., Guo, J., Hill, S., Locas, A., . . . Watson, S. (2013). Occurrence of waterborne pathogens and *Escherichia coli* at offshore drinking water intakes in lake Ontario. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(19), 5799-5813. doi: 10.1128/aem.00870-13
- El-Adawy, H., Hotzel, H., Tomaso, H., Neubauer, H., Taboada, E. N., Ehricht, R., & Hafez, H. M. (2013). Detection of genetic diversity in *Campylobacter jejuni* isolated from a commercial turkey flock using flaA typing, MLST analysis and microarray assay. *PloS One*, *8*(2), e51582. doi: 10.1371/journal.pone.0051582
- Eyles, R., Niyogi, D., Townsend, C., Benwell, G., & Weinstein, P. (2003). Spatial and temporal patterns of *Campylobacter* contamination underlying public health risk in the Taieri River, New Zealand. *Journal of Environmental Quality*, *32*(5), 1820-1828.
- FoodNet Canada. (2013). FoodNet Canada (formerly known as CEnterNet). Available at <http://www.phac-aspc.gc.ca/foodnetcanada/>
- Greig, J., Rajic, A., Young, I., Mascarenhas, M., Waddell, L., & LeJeune, J. (2015). A scoping review of the role of wildlife in the transmission of bacterial pathogens and antimicrobial resistance to the food chain. *Zoonoses Public Health*, *62*(4), 269-284. doi: 10.1111/zph.12147
- Gu, G., Luo, Z., Cevallos-Cevallos, J. M., Adams, P., Vellidis, G., Wright, A., & van Bruggen, A. H. (2013). Occurrence and population density of *Campylobacter*

- jejuni* in irrigation ponds on produce farms in the Suwannee River Watershed. *Canadian Journal of Microbiology*, 59(5), 339-346. doi: 10.1139/cjm-2013-0027
- Hannon, S. J., Taboada, E. N., Russell, M. L., Allan, B., Waldner, C., Wilson, H. L., . . . Townsend, H. G. (2009). Genomics-based molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolates from feedlot cattle and from people in Alberta, Canada. *J Clin Microbiol*, 47(2), 410-420. doi: 10.1128/jcm.01432-08
- Havelaar, A. H., Mangen, M. J., de Koeijer, A. A., Bogaardt, M. J., Evers, E. G., Jacobs-Reitsma, W. F., . . . Nauta, M. J. (2007). Effectiveness and efficiency of controlling *Campylobacter* on broiler chicken meat. *Risk Analysis*, 27(4), 831-844. doi: 10.1111/j.1539-6924.2007.00926.x
- Hellein, K. N., Battie, C., Tauchman, E., Lund, D., Oyarzabal, O. A., & Lepo, J. E. (2011). Culture-based indicators of fecal contamination and molecular microbial indicators rarely correlate with *Campylobacter* spp. in recreational waters. *J Water Health*, 9(4), 695-707. doi: 10.2166/wh.2011.154
- Hill, J. E., Paccagnella, A., Law, K., Melito, P. L., Woodward, D. L., Price, L., . . . Goh, S. H. (2006). Identification of *Campylobacter* spp. and discrimination from *Helicobacter* and *Arcobacter* spp. by direct sequencing of PCR-amplified cpn60 sequences and comparison to cpnDB, a chaperonin reference sequence database. *Journal of Medical Microbiology*, 55(Pt 4), 393-399. doi: 10.1099/jmm.0.46282-0
- Hokajarvi, A. M., Pitkanen, T., Siljanen, H. M., Nakari, U. M., Torvinen, E., Siitonen, A., & Miettinen, I. T. (2013). Occurrence of thermotolerant *Campylobacter* spp. and adenoviruses in Finnish bathing waters and purified sewage effluents. *J Water Health*, 11(1), 120-134. doi: 10.2166/wh.2012.192
- Hsieh, T. C., Ma, K. H., & Chao, A. (2014). iNEXT: iNterpolation and EXTrapolation for species diversity. R package version 2.0. Retrieved from <http://www.chao.stat.nthu.edu.tw/blog/software-download>
- Jokinen, C. C., Koot, J. M., Carrillo, C. D., Gannon, V. P., Jardine, C. M., Mutschall, S. K., . . . Taboada, E. N. (2012). An enhanced technique combining pre-enrichment and passive filtration increases the isolation efficiency of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from water and animal fecal samples. *Journal of Microbiological Methods*, 91(3), 506-513. doi: 10.1016/j.mimet.2012.09.005

- Jokinen, C. C., Schreier, H., Mauro, W., Taboada, E., Isaac-Renton, J. L., Topp, E., . . . Gannon, V. P. (2010). The occurrence and sources of *Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 in the Salmon River, British Columbia, Canada. *J Water Health*, 8(2), 374-386. doi: 10.2166/wh.2009.076
- Josefsen, M. H., Cook, N., D'Agostino, M., Hansen, F., Wagner, M., Demnerova, K., . . . Hoorfar, J. (2004). Validation of a PCR-based method for detection of food-borne thermotolerant *Campylobacter* in a multicenter collaborative trial. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4379-4383. doi: 10.1128/aem.70.7.4379-4383.2004
- Keithlin, J., Sargeant, J., Thomas, M. K., & Fazil, A. (2014). Systematic review and meta-analysis of the proportion of *Campylobacter* cases that develop chronic sequelae. *BMC Public Health*, 14(1), 1203. doi: 10.1186/1471-2458-14-1203
- Komba, E. V., Mdegela, R. H., Msoffe, P. L., Nielsen, L. N., & Ingmer, H. (2015). Prevalence, antimicrobial resistance and risk factors for thermophilic *Campylobacter* infections in symptomatic and asymptomatic humans in Tanzania. *Zoonoses Public Health*. doi: 10.1111/zph.12185
- Lauria-Filgueiras, A. L., & Hofer, E. (1998). Diversity of *Campylobacter* isolates from three activated sludge systems. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(3), 295-298.
- Levesque, S., Fournier, E., Carrier, N., Frost, E., Arbeit, R. D., & Michaud, S. (2013). Campylobacteriosis in urban versus rural areas: a case-case study integrated with molecular typing to validate risk factors and to attribute sources of infection. *PLoS One*, 8(12), e83731. doi: 10.1371/journal.pone.0083731
- Levesque, S., Frost, E., Arbeit, R. D., & Michaud, S. (2008). Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* isolates from humans, chickens, raw milk, and environmental water in Quebec, Canada. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(10), 3404-3411. doi: 10.1128/jcm.00042-08
- Michaud, S., Menard, S., & Arbeit, R. D. (2004). Campylobacteriosis, Eastern Townships, Quebec. *Emerging Infectious Diseases*, 10(10), 1844-1847. doi: 10.3201/eid1010.040228

- Michaud, S., Menard, S., & Arbeit, R. D. (2005). Role of real-time molecular typing in the surveillance of *Campylobacter* enteritis and comparison of pulsed-field gel electrophoresis profiles from chicken and human isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(3), 1105-1111. doi: 10.1128/jcm.43.3.1105-1111.2005
- Miller, W. G., Yee, E., Chapman, M. H., Smith, T. P., Bono, J. L., Huynh, S., . . . Korlach, J. (2014). Comparative genomics of the *Campylobacter lari* group. *Genome Biology and Evolution*, *6*(12), 3252-3266. doi: 10.1093/gbe/evu249
- Moore, J. E., Corcoran, D., Dooley, J. S., Fanning, S., Lucey, B., Matsuda, M., . . . Whyte, P. (2005). *Campylobacter*. *Veterinary Research*, *36*(3), 351-382. doi: 10.1051/vetres:2005012
- Mullner, P., Spencer, S. E., Wilson, D. J., Jones, G., Noble, A. D., Midwinter, A. C., . . . French, N. P. (2009). Assigning the source of human campylobacteriosis in New Zealand: a comparative genetic and epidemiological approach. *Infection, Genetics and Evolution*, *9*(6), 1311-1319. doi: 10.1016/j.meegid.2009.09.003
- Nichols, G. L., Richardson, J. F., Sheppard, S. K., Lane, C., & Sarran, C. (2012). *Campylobacter* epidemiology: a descriptive study reviewing 1 million cases in England and Wales between 1989 and 2011. *BMJ Open*, *2*(4). doi: 10.1136/bmjopen-2012-001179
- Oster, R. J., Wijesinghe, R. U., Haack, S. K., Fogarty, L. R., Tucker, T. R., & Riley, S. C. (2014). Bacterial pathogen gene abundance and relation to recreational water quality at seven Great Lakes beaches. *Environmental Science & Technology*, *48*(24), 14148-14157. doi: 10.1021/es5038657
- Otasevic, M., Lazarevic-Jovanovic, B., Tasic-Dimov, D., Dordevic, N., & Miljkovic-Selimovic, B. (2004). [The role of certain *Campylobacter* types in the etiology of enterocolitis]. *Vojnosanitetski Pregled*, *61*(1), 21-27.
- Pacholewicz, E., Swart, A., Lipman, L. J., Wagenaar, J. A., Havelaar, A. H., & Duim, B. (2013). Propidium monoazide does not fully inhibit the detection of dead *Campylobacter* on broiler chicken carcasses by qPCR. *Journal of Microbiological Methods*, *95*(1), 32-38. doi: 10.1016/j.mimet.2013.06.003

- Prasad, K. N., Dixit, A. K., & Ayyagari, A. (2001). *Campylobacter* species associated with diarrhoea in patients from a tertiary care centre of north India. *Indian Journal of Medical Research*, *114*, 12-17.
- Procter, T. D., Pearl, D. L., Finley, R. L., Leonard, E. K., Janecko, N., Reid-Smith, R. J., . . . Sargeant, J. M. (2014). A cross-sectional study examining *Campylobacter* and other zoonotic enteric pathogens in dogs that frequent dog parks in three cities in south-western Ontario and risk factors for shedding of *Campylobacter* spp. *Zoonoses Public Health*, *61*(3), 208-218. doi: 10.1111/zph.12062
- Ramonaite, S., Kudirkienė, E., Tamulevičienė, E., Levinienė, G., Malakauskas, A., Golz, G., . . . Malakauskas, M. (2014). Prevalence and genotypes of *Campylobacter jejuni* from urban environmental sources in comparison with clinical isolates from children. *Journal of Medical Microbiology*, *63*(Pt9), 1205-1213. doi: 10.1099/jmm.0.072892-0
- Rechenburg, A., & Kistemann, T. (2009). Sewage effluent as a source of *Campylobacter* spp. in a surface water catchment. *International Journal of Environmental Health Research*, *19*(4), 239-249. doi: 10.1080/09603120802460376
- Revez, J., Llarena, A. K., Schott, T., Kuusi, M., Hakkinen, M., Kivisto, R., . . . Rossi, M. (2014). Genome analysis of *Campylobacter jejuni* strains isolated from a waterborne outbreak. *BMC Genomics*, *15*, 768. doi: 10.1186/1471-2164-15-768
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J., & Moorman, A. F. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, *37*(6), e45. doi: 10.1093/nar/gkp045
- Rodríguez-Martínez, S., Cervero-Aragó, S., Gil-Martin, I., & Ayaujo, R. (2013). Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from environmental waters in the Mediterranean area. *Environ Res*, *127*(11), 56-62. doi: 10.1016/j.envres.2013.10.003
- Sanad, Y. M., Kassem, II, Abley, M., Gebreyes, W., LeJeune, J. T., & Rajashekara, G. (2011). Genotypic and phenotypic properties of cattle-associated *Campylobacter* and their implications to public health in the USA. *PloS One*, *6*(10), e25778. doi: 10.1371/journal.pone.0025778

- Savill, M. G., Hudson, J. A., Ball, A., Klena, J. D., Scholes, P., Whyte, R. J., . . . Jankovic, D. (2001). Enumeration of *Campylobacter* in New Zealand recreational and drinking waters. *Journal of Applied Microbiology*, *91*(1), 38-46.
- Schonberg-Norio, D., Takkinen, J., Hanninen, M. L., Katila, M. L., Kaukoranta, S. S., Mattila, L., & Rautelin, H. (2004). Swimming and *Campylobacter* infections. *Emerg Infect Dis*, *10*(8), 1474-1477. doi: 10.3201/eid1008.030924
- Schuster, C. J., Ellis, A. G., Robertson, W. J., Charron, D. F., Aramini, J. J., Marshall, B. J., & Medeiros, D. T. (2005). Infectious disease outbreaks related to drinking water in Canada, 1974-2001. *Canadian Journal of Public Health. Revue Canadienne de Santé Publique*, *96*(4), 254-258.
- Taboada, E. N., Ross, S. L., Mutschall, S. K., Mackinnon, J. M., Roberts, M. J., Buchanan, C. J., . . . Clark, C. G. (2012). Development and validation of a comparative genomic fingerprinting method for high-resolution genotyping of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(3), 788-797. doi: 10.1128/jcm.00669-11
- ten Veldhuis, J. A., Clemens, F. H., Sterk, G., & Berends, B. R. (2010). Microbial risks associated with exposure to pathogens in contaminated urban flood water. *Water Res*, *44*(9), 2910-2918. doi: 10.1016/j.watres.2010.02.009
- Thomas, C., Hill, D. J., & Mabey, M. (1999). Evaluation of the effect of temperature and nutrients on the survival of *Campylobacter* spp. in water microcosms. *Journal of Applied Microbiology*, *86*(6), 1024-1032.
- Thomas, M. K., Majowicz, S. E., Sockett, P. N., Fazil, A., Pollari, F., Dore, K., . . . Edge, V. L. (2006). Estimated numbers of community cases of illness due to *Salmonella*, *Campylobacter* and verotoxigenic *Escherichia coli*: Pathogen-specific Community Rates. *Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*, *17*(4), 229-234.
- Ugarte-Ruiz, M., Florez-Cuadrado, D., Wassenaar, T. M., Porrero, M. C., & Dominguez, L. (2015). Method comparison for enhanced recovery, isolation and qualitative detection of *C. jejuni* and *C. coli* from wastewater effluent samples. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *12*(3), 2749-2764. doi: 10.3390/ijerph120302749

- Van Dyke, M. I., Morton, V. K., McLellan, N. L., & Huck, P. M. (2010). The occurrence of *Campylobacter* in river water and waterfowl within a watershed in southern Ontario, Canada. *Journal of Applied Microbiology*, *109*(3), 1053-1066. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04730.x
- Vereen, E., Jr., Lowrance, R. R., Cole, D. J., & Lipp, E. K. (2007). Distribution and ecology of campylobacters in coastal plain streams (Georgia, United States of America). *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(5), 1395-1403. doi: 10.1128/aem.01621-06
- Waldenstrom, J., Broman, T., Carlsson, I., Hasselquist, D., Achterberg, R. P., Wagenaar, J. A., & Olsen, B. (2002). Prevalence of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter coli* in different ecological guilds and taxa of migrating birds. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(12), 5911-5917.
- Wery, N., Lhoutellier, C., Ducray, F., Delgenes, J. P., & Godon, J. J. (2008). Behaviour of pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. *Water Res*, *42*(1-2), 53-62. doi: 10.1016/j.watres.2007.06.048
- Wilkes, G., Edge, T. A., Gannon, V. P., Jokinen, C., Lyautey, E., Neumann, N. F., . . . Lapen, D. R. (2011). Associations among pathogenic bacteria, parasites, and environmental and land use factors in multiple mixed-use watersheds. *Water Res*, *45*(18), 5807-25. doi : 10.1016/j.watres.2011.06.021
- Won, G., Gill, A., & Lejeune, J. T. (2013). Microbial quality and bacteria pathogens in private wells used for drinking water in northeastern Ohio. *J Water Health*, *11*(3), 555-562. doi: 10.2166/wh.2013.247

Tables

Table VI. Water sample-related information over the 4 years of the study including: sample source, number of sampling sites, frequency of sampling and analyses performed.

Water sources and years	No. of sampling sites	No. weeks sampled¹	Beginning	End	Analyses
Recreational beach waters ²					
2011	10	11	2011-06-06	2011-08-16	culture, qPCR
2012	20	8	2012-06-18	2012-08-07	culture, qPCR, PMAqPCR
2013	20	8	2013-06-17	2013-08-06	culture, qPCR, PMAqPCR
Drinking water source waters ³					
2011	4	4 ⁵	2011-07-19	2011-10-18	culture, qPCR
2012	7	12 ⁵	2012-10-16	2012-12-17	culture, qPCR
2013	9	8	2013-06-17	2013-08-06	culture, qPCR
2014	1	15	2014-05-30	2014-09-03	culture, qPCR, PMAqPCR
Sewage waters ⁴					
2014	1	13	2014-06-11	2014-09-03	culture, qPCR, PMAqPCR

¹Sampled once a week.

² Lake water, located in Montérégie (12 sites) and Estrie (10 sites).

³Including river water from St-Lawrence tributaries (5 sites), St-Lawrence River (2 sites) sampled in 2011-2013, as well as the WTPs drinking water intakes from Saint-Hyacinthe (1 site) sampled in 2013-2014 and Cowansville (1 site) drinking water treatment plant sampled in 2013.

⁴Sewage treatment plant raw sewage from Saint-Hyacinthe.

⁵Sampled once a month.

Table VII. Percentage of *Campylobacter* detection in three different environmental water sources using culture isolation and qPCR targeting *C. spp.* and *C. jejuni*.

Water source	Culture isolation		qPCR		
	n	% positive	n	% <i>C. spp.</i> positive	% <i>C. jejuni</i> positive
Recreational	429	8 ^a	415	33 ^a	31 ^a
Drinking water source	130	32 ^b	96	84 ^b	60 ^b
Sewage	13	46 ^{ab}	13	100 ^{ab}	92 ^b

^{ab} Water source categories with a different superscript from other rows indicates they are statistically different (P<0.05) according to post-hoc tests (with Bonferroni adjustment for multiple comparison) from a logistic regression model.

Table VIII. *Campylobacter* viability estimation based on total (qPCR) and viable (PMAqPCR) DNA percentage of detection targeting *C. spp.* and *C. jejuni* in three different environmental water sources.

Water source	Viability estimation ^a						
	n	<i>C. spp.</i>			<i>C. jejuni</i>		
		% positive qPCR	% positive PMAqPCR	% viability	% positive qPCR	% positive PMAqPCR	% viability
Recreational	131	43	37	86	40	38	95
Drinking water source	14	64	36	56	43	36	84
Sewage	13	100	92	92	92	100	100

^aViability estimation was determined by dividing the viable DNA detection frequency (propidium monoazide (PMA) qPCR (PMAqPCR)) by the total DNA detection frequency (qPCR). A subset of the water samples were selected and run in parallel to generate qPCR without PMA and PMAqPCR data.

Table IX. Percentage of *Campylobacter* species identified from culture-positive clinical samples and water sources.

	Clinical (n=79)	Recreational (n=34)	Drinking water source (n=42)	Sewage (n=6)
<i>C. jejuni</i>	95	82	59	33
<i>C. coli</i>	5	0	11	50
<i>C. lari</i>	0	15	30	17
<i>C. subantarcticus</i>	0	3	0	0

*Percentages represent the number of a given species isolated from a specific source divided by the total number of species identified from that same source.

Table X. Percentage of *C. jejuni* and *C. coli* water isolates with genetic similarity to clinical isolates gathered in this study.

Source	Number of isolates	Percentage of isolates		
		CGF100 ¹	CGF95 ²	CGF90 ³
Recreational	33	3	3	9
Drinking water source	63	6	17	22
Sewage	7	14	71	71

¹CGF100, ²CGF95, ³CGF90: isolates that shared 100%, 95% and 90% genetic homology, respectively, based on CGF genotyping.

Table XI. Percentage of *C. jejuni* and *C. coli* isolates gathered in this study with genotypes that were not reported in the Canadian CGF database or that were reported from clinical isolates in the database.

Source	Number of isolates	Percentage of isolates	
		Novel ¹	Homologous to clinical isolates in the CGF Database ²
Clinical	81	36	53
Recreational	33	27	39
Drinking water source	63	44	32
Sewage	7	14	71

¹Isolates identified in this study that were not described in the CGF database were considered new.

²Genotypes identified in this study that were described in the CGF database as clinical at 100% homology level.

Table XII. Characterisation of clinical cases and percentage of water-related isolates from the same region.

	No. cases ¹	No. isolates ²	Drinking water source water		Recreational water	
			% associated isolates ³	p-value ⁴	% associated isolates ³	p-value ⁴
Total Number	109	76	18		18	
Gender				0.83		0.04
M	61	40	18		28	
F	44	36	19		8	
Age category				0.59		0.17
0-4	7	3	0		0	
14-May	12	8	0		0	
15-34	47	35	20		23	
35-64	28	21	24		29	
≥65	11	9	22		0	
Urbanicity ⁵				0.54		0.19
Rural	42	28	14		25	
Urban	58	44	23		11	
Summer ⁶				<0.01		0.77
Yes	57	35	31		20	
No	52	41	7		17	

¹Four cases were missing gender and age information; 9 cases were missing postal codes information.

²Two cases had 2 *Campylobacter* isolates of different genotypes isolated from the same stool sample; 4 isolates were missing patient postal code only.

³Clinical isolates that shared genetic similarities with water isolates at a 90% CGF homology.

⁴Exact chi-Square test.

⁵Attribution based on the centroid of 6-digit postal codes according to the geographic reference map from Statistics Canada: urban area was defined as a population center of at least 1 000 inhabitants and a density of at least 400 per km².

⁶The summer period was considered as starting in the second week of June and ending in the second week of September.

Figures

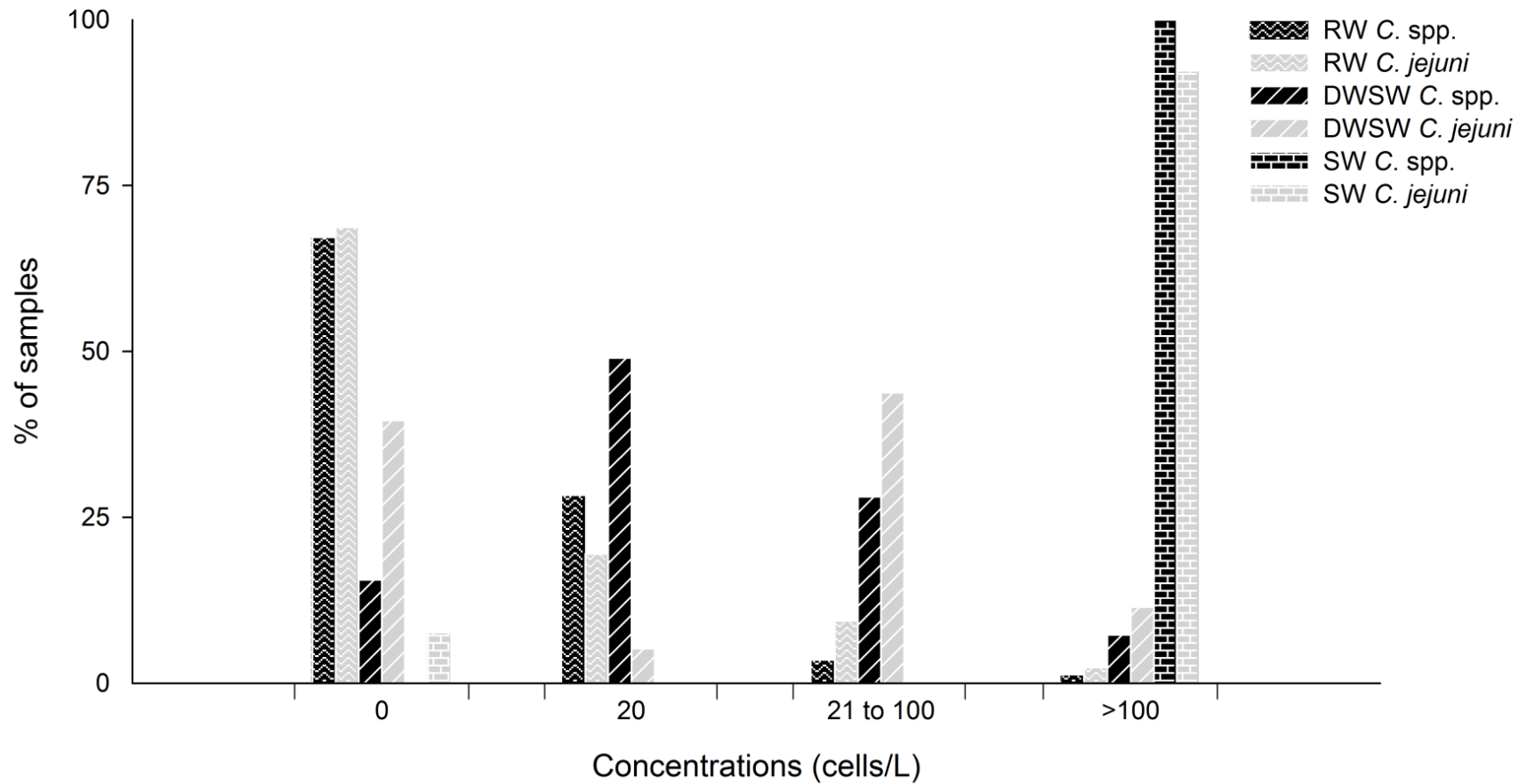


Figure 6. QPCR concentration ranges for *C. spp.* and *C. jejuni* in the three water sources: recreational water (RW) (n=415), drinking water source water (DWSW) (n=96) and sewage water (SW) (n=13).

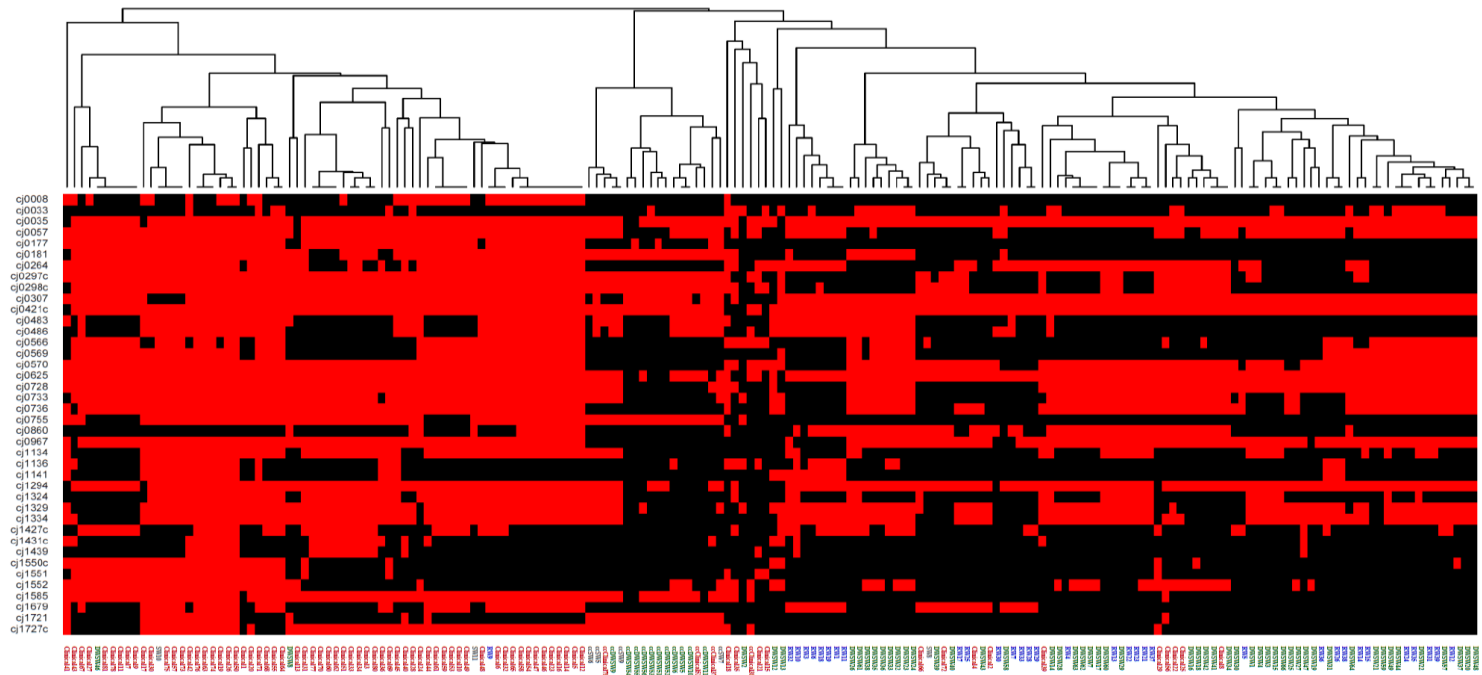


Figure 7. Dendrogram depicting the presence/absence of 40 genes according to CGF genotyping binary results of the 191 *C. jejuni* and *C. coli* (“cc”) isolates from clinical (red), recreational water (RW; blue), drinking water source water (DWSW; green) and sewage water (SW; grey) samples collected in this study. Isolates (columns) are sorted according to UPGMA distances with simple matching coefficient factor. Each row represents the presence (red) or absence (black) of each of the 40 genes. Genes (columns) are sorted based on their position in the *Campylobacter* genome.

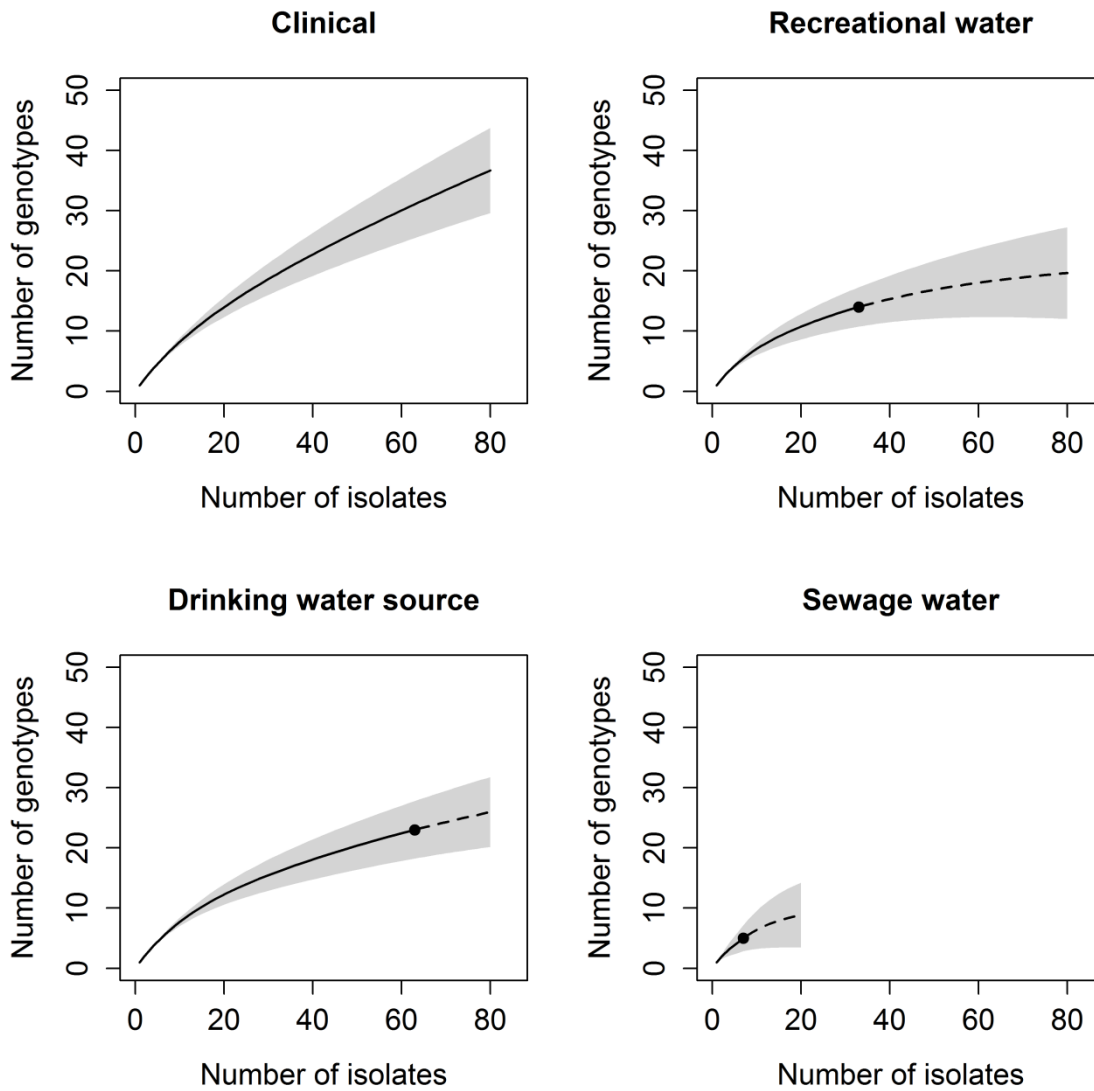


Figure 8. Rarefaction curves showing and comparing genetic diversity among *C. jejuni* and *C. coli* isolated from three different water sources (recreational, drinking water source water and sewage) and clinical samples, based on CGF typing at the 90% homology level. Plot of sample coverage for rarefied samples (solid line) and extrapolated samples (dashed line) was a function of sample size for *C. jejuni* and *C. coli* isolates. The 95% confidence intervals were obtained by a bootstrap method based on 500 replications.

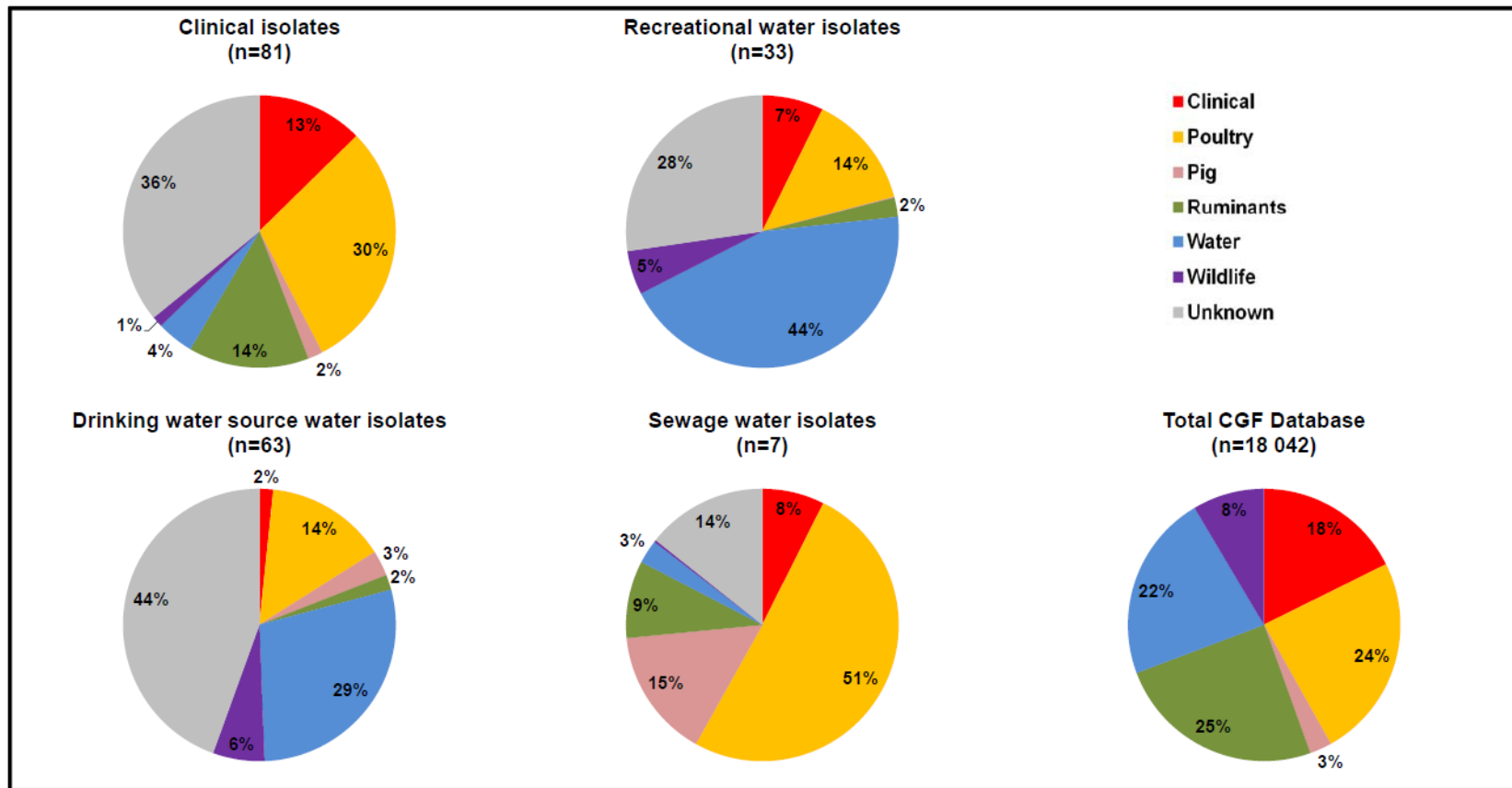


Figure 9. CGF database host sources of the *C. jejuni* and *C. coli* genotypes corresponding to isolates obtained in Southern Quebec, similar at the 100% homology level. Results are shown for the four different sources in our study: clinical, recreational waters, drinking water source waters and sewage waters isolates. Percentages show the representation of different sources with associated-genotypes of interest found in the CGF database. The representation of the sources for all isolates in the total CGF database, at the time of conducting this analysis, is shown at the right.

Discussion générale

Ce mémoire visait à étudier l'implication potentielle de l'eau environnementale dans la transmission de la campylobactériose au sud-est du Québec. Une approche moléculaire a été employée pour déterminer précisément les concentrations de *Campylobacter* dans différentes sources d'eau environnementales. Pour ce faire, différents essais qPCR ciblant *Campylobacter* ont été évalués pour leur spécificité et sensibilité de quantification pour des applications spécifiques à l'eau environnementale. La PCR digitale a été utilisée dans la calibration des courbes standards afin d'augmenter la précision de la quantification. La qPCR a ensuite été appliquée dans différentes sources d'eaux environnementales dans la région sud-est du Québec afin de déterminer précisément et spécifiquement les concentrations de *Campylobacter*. Le PMA a été utilisé en combinaison avec la qPCR comme indicateur de viabilité de *Campylobacter* dans les différentes sources d'eau environnementales. Une portion de l'étude a donc été consacrée à l'optimisation de techniques telles que la quantification de *Campylobacter* par qPCR spécifiquement dans les eaux environnementales, à l'application du PMA sur des échantillons d'eau environnementale afin de mesurer la survie de *Campylobacter* et aux méthodes d'isolement par milieux de culture (notamment pour l'application aux eaux usées; données non présentées). Des souches de *Campylobacter* ont été isolées des différentes sources d'eau et génotypées par CGF afin d'être comparées génétiquement avec des souches provenant d'un hôpital de la même région dans le but d'évaluer si les génotypes des souches humaines étaient également retrouvés dans l'eau. Les génotypes ont également été comparés avec les génotypes retrouvés dans la banque de données canadienne CGF afin d'identifier ceux ayant déjà été rapportés dans des cas cliniques et de proposer des sources potentielles de contamination hypothétiques. Cette discussion a pour but de faire état de la qualité scientifique des résultats générés, de mettre en perspective ces derniers ainsi que d'énumérer les forces et limites de l'étude.

Nouveauté et implications des résultats

Un point fort du projet d'étude fut la démarche concernant l'optimisation d'essais qPCR pour quantifier précisément, sensiblement et spécifiquement *Campylobacter* dans les eaux environnementales, permettant de suggérer une nouvelle approche pour comparer des essais qPCR. Une partie innovante du projet d'étude fut l'incorporation du PMA dans l'essai PCR en temps réel afin de quantifier spécifiquement les cellules viables de *Campylobacter* dans les eaux de l'environnement. Cependant, les résultats obtenus ont montré la présence d'effets toxiques pour les cellules viables de *Campylobacter*; ces effets étaient plus importants chez certaines souches comparativement à d'autres (données non présentées). C'est pourquoi les résultats de PMAqPCR n'ont pas été interprétés de façon quantitative, mais plutôt comme des indicateurs qualitatifs de la survie de *Campylobacter* dans différentes sources d'eau environnementale. De plus, le fait que les différentes sources d'eau ont des propriétés chimiques différentes pouvant varier temporellement représente une limite au PMAqPCR : l'application d'une telle méthode dans le but d'en ressortir des données quantitatives précises génère donc des résultats difficiles à interpréter lorsque vient le temps de comparer différents échantillons d'eau dans le sens où on ne sait plus si une différence entre les échantillons est due à la technique ou à une différence réelle. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser les données issues du PMAqPCR qualitativement plutôt que quantitativement afin d'évaluer la viabilité de *Campylobacter* dans différentes sources d'eau. Par contre, cette limitation est aussi applicable aux méthodes de culture où on peut penser que les propriétés chimiques de l'eau vont affecter l'efficacité et influencer la sélection de souches (ou génotypes) spécifiques de *Campylobacter* comme il semble être le cas avec différentes matrices alimentaires (Messelhauser et al., 2015). De plus, il est important de mentionner que les étapes de filtration et d'extraction d'ADN présentent certains défis tant qu'au taux de récupération d'ADN et pourraient engendrer des pertes, voire même des faux négatifs étant données les faibles concentrations de *Campylobacter* trouvées dans les eaux. Les *Campylobacter* qui forment des biofilms sur des roches ou autres grosses surfaces solides peuvent échapper à l'échantillonnage. Par contre, les *Campylobacter* formants des biofilms sur des petites particules en suspension ou à l'intérieur des protozoaires n'échappent pas à l'échantillonnage.

L'extraction d'ADN directement à partir des filtres inclue une étape de battage de ces derniers à l'aide de fines particules de verre qui viennent briser les biofilms et les protozoaires de manière à libérer l'ADN des *Campylobacter*.

Les données quantitatives ont été issues de la PCR en temps réel sans l'emploi du PMA, sachant que la possibilité d'amplification d'ADN fragmentaire ou provenant de cellules mortes était présente. Le LinRegPCR s'est avéré un outil intéressant pour normaliser les données PCR en temps réel. L'importation de courbes standards dans le logiciel combiné avec les données PCR en temps réel en format RDML (« Real-Time PCR Data Markup Language ») a permis un ajustement basé sur le bruit de fond résultant en une normalisation de toutes les données PCR temps réel provenant de différentes expériences (Ruijter et al., 2009). De cette manière, les différentes comparaisons entre les résultats sont plus justes. L'utilisation de la PCR digitale (dPCR), une technologie émergente de plus en plus disponible, permet de quantifier très précisément de façon absolue la quantité d'ADN présent dans un échantillon donné. Cette technologie a été utilisée pour calibrer les courbes standards utilisées pour la PCR en temps réel dans cette étude. La calibration par dPCR s'est avérée plus efficace que la calibration traditionnelle par spectrophotométrie; l'accessibilité de la dPCR pourrait révolutionner la PCR en temps réel en termes de précision de la courbe standard. Étonnement, les résultats obtenus avec la courbe standard calibrée par la dPCR se rapprochent plus des résultats de quantification obtenus par des méthodes de culture rapportées dans la littérature. Toutes ces décisions vis-à-vis la génération, le traitement, la comparaison et l'interprétation des données ont permis d'obtenir des résultats de bonne qualité scientifique. Enfin, les lignes directrices décrites par le MIQE (Bustin et al., 2009) et le dMIQE (Huggett et al., 2011) ont été suivies lors de la rédaction des articles scientifiques afin de faciliter la communication et d'augmenter la capacité à reproduire les résultats pour la communauté scientifique.

L'étude réalisée présente plusieurs forces, dont l'utilisation de techniques de biologie moléculaire à la fine pointe de la technologie et leur optimisation pour la quantification et le génotypage de *Campylobacter* dans les eaux environnementales. De plus, des isolats provenant d'un hôpital et des eaux environnementales du Québec ont pu être génotypés par

CGF et ajoutés à la banque de données canadienne, et ainsi augmenter la représentativité des échantillons provenant du Québec. Enfin, un point fort de l'étude est qu'elle a permis de dresser un portrait quant à la présence, aux caractéristiques génétiques et aux quantités de *Campylobacter* retrouvées au sud-est du Québec.

Limites de l'étude

La qualité de l'étalonnage de la courbe standard est une étape cruciale pour la validité des résultats obtenus par PCR en temps réel, comme il a été démontré dans le premier article présenté dans ce mémoire. L'emploi d'ADN génomique pour la préparation de cette courbe est basé sur le fait que ce qui sera quantifié dans l'environnement ne sera pas de l'ADN plasmidique, ni des fragments d'ADN libres correspondant aux gènes d'intérêt ciblés par la PCR en temps réel, mais plutôt des génomes bactériens faisant en sorte que l'emploi d'ADN génomique pour faire la courbe standard va générer des résultats qui se rapprochent le plus de la réalité environnementale. Les matrices d'ADN employées dans les courbes standards (généralement amplicons, ADN plasmidique ou génomique) diffèrent quant à leur stabilité à long terme lors de la conservation ainsi qu'au niveau de la précision des résultats quantitatifs générés lors d'une PCR en temps réel. En outre, un effet de dégradation de l'ADN a été observé en relation avec la durée de cryoconservation, où les différents Cqs associés aux valeurs de concentration de la courbe standard tendaient à être de plus en plus élevés lorsque le matériel génomique utilisé pour construire ces courbes se faisait de plus en plus vieux. La dégradation de l'ADN employé dans la courbe standard lors de l'entreposage est connue pour affecter la performance de la PCR en temps réel (Rossmannith et al., 2011). Pour contrer cet effet, l'ADN utilisé pour les courbes standard a été réparti en portions aliquotes afin d'éviter les gels/dégels et des concentrations élevées d'ADN génomique ont été utilisées pour l'entreposage. De plus, les changements dans les Cqs à travers différentes expériences ont été surveillés de manière à détecter rapidement tout problème de dégradation d'ADN. Il est aussi connu que l'efficacité de réaction d'une PCR en temps réel est plus élevée lors de l'emploi d'ADN plasmidique dans une courbe standard comparativement à de l'ADN génomique grâce entre autres à l'absence de structure secondaire et tertiaire pouvant interférer au cours de la

réaction PCR (Charrel et al., 2004; Hou et al., 2010; Yun et al., 2006). Par contre, lors de quantification à partir d'échantillons environnementaux, l'ADN amplifiée sera de structure complexe. L'utilisation d'une matrice d'ADN de structure complexe comme l'ADN génomique dans la courbe standard reflétera davantage des concentrations près de la réalité comparativement à l'utilisation d'une matrice d'ADN simple comme les plasmides ou amplicons. De plus, on peut se questionner sur la stabilité de telles matrices lors de l'entreposage. Ce type d'information sur l'ADN de *Campylobacter* n'a pas encore été exploré et pourrait être bénéfique quant à la reconnaissance d'une matrice d'ADN précise pour différentes applications de la PCR en temps réel : des nouvelles technologies telle la dPCR pourraient s'avérer utiles à détecter des changements subtils dans la dégradation de l'ADN et être utilisées afin d'explorer davantage ce phénomène.

Durant ce projet de maîtrise, des échantillons d'eaux provenant de deux autres projets évaluant la qualité microbienne générale de l'eau de différentes plages en Montérégie et en Estrie ainsi que d'eau provenant des tributaires du Lac-Saint-Pierre ont été obtenues dans le but de les analyser pour *Campylobacter*, en plus des échantillons collectés dans les différentes usines de Saint-Hyacinthe et Cowansville. Ce projet a donc permis de valoriser des données issues d'autres projets tout en limitant les coûts, et ainsi de donner un aperçu plus global de l'implication potentielle de l'eau environnementale dans la transmission de la campylobactériose. Cet échantillonnage présente toutefois certaines limites quant à sa représentativité. En effet, il faut garder en tête que lorsqu'on infère sur les concentrations de *Campylobacter* dans les eaux environnementales, il est possible que les sources d'eau sélectionnées étaient plus ou moins à risque de contamination comparativement aux autres sources d'eau de la même région. La sélection des plages était basée sur un indice agricole de manière à ce que des plages faiblement et fortement impactées par l'agriculture soient investiguées (Guy et al., manuscrit en préparation). Par contre, les eaux de captage provenant des tributaires du Lac-Saint-Pierre sont considérées comme étant fortement impactées par l'agriculture. On peut aussi se questionner dans le même ordre d'idée sur la représentativité des eaux usées de Saint-Hyacinthe par rapport aux autres villes de cette région.

Une autre limite due à l'échantillonnage concerne l'intervalle de temps entre l'échantillonnage des eaux environnementales et le moment probable d'infection des cas cliniques. Sachant que la période d'incubation varie généralement entre 24 et 48 heures et peut s'étendre jusqu'à une semaine (Skirrow et Blaser, 1995), les isolats cliniques collectés une semaine après la période d'échantillonnage des eaux environnementales étaient donc moins propices à être génétiquement similaires aux isolats environnementaux comparativement aux isolats cliniques collectés en même temps que l'échantillonnage des eaux environnementales. En fait, cette étude assumait une certaine stabilité temporelle dans les génotypes provenant des eaux environnementales et des patients pendant la période d'échantillonnage (sauf en 2011 et 2012). Est-ce que l'augmentation de la période d'échantillonnage des cas cliniques aurait permis de trouver davantage de liens génétiques entre les souches cliniques et environnementales, ou encore aurait-il été préférable de limiter les comparaisons entre les souches isolées très près dans le temps? Ces circonstances suggèrent que les similarités génétiques observées entre les isolats cliniques et environnementaux représentent probablement une sous-estimation de l'association réelle entre les cas cliniques et les eaux environnementales. Le deuxième article présenté dans ce mémoire conclut que les isolats cliniques collectés en été tendaient à être davantage similaires génétiquement aux isolats d'eau de captage comparativement aux isolats cliniques collectés le reste de l'année ($p < 0.01$, test du Chi-carré). Par contre, cette association n'a pu être observée entre les isolats cliniques et ceux provenant des eaux récréatives ($p = 0.77$, chi carré). Le risque d'infection par l'eau environnementale pourrait donc être plus élevé en été qu'en hiver, mais l'exposition aux eaux de baignade ne semblerait pas y jouer un rôle important. L'éloignement géographique entre les plages étudiées et les cas cliniques habitant majoritairement la région de Saint-Hyacinthe pourrait expliquer une telle affirmation. Donc, ce serait plutôt une hypothèse à tester plus en profondeur avec un échantillonnage plus représentatif des plages et hôpitaux, mais on peut dire que les souches retrouvées chez les cas cliniques et les eaux étudiées sont davantage similaire génétiquement en été que le reste de l'année.

La période où les isolats cliniques ont été collectés s'étend du 31 mai 2013 au 30 septembre 2014, alors que les plages ont été échantillonnées entre juin et août de 2011 à 2013

inclusivement. Donc, l'échantillonnage des isolats cliniques chevauche seulement l'échantillonnage des eaux récréatives pendant une période de 3 mois en 2013 qui correspond au temps de l'année où les plages sont ouvertes au publique. Cette même période correspond aussi à l'échantillonnage des eaux de captage en 2013 et eaux de captage et eaux usées en 2014. Ces périodes de temps limitées pourraient expliquer entre autres les similarités génétiques relativement faibles entre les isolats cliniques et les isolats environnementaux décrits dans cette étude. Il serait intéressant de vérifier si les mêmes résultats seraient obtenus en se limitant aux données provenant des mêmes fenêtres de temps. De plus, seulement 10 % des souches recueillies en clinique entre mai et juin 2013 ont pu être analysés étant donné un problème de conservation des souches hors de notre contrôle : certaines souches conservées à -20°C pendant plus de 2 mois dans un milieu de conservation avant de nous être envoyées n'ont pu être repiquées, car il y avait une absence de croissance; cette étude a donc mis en évidence l'importance de température de conservation à -80°C lors d'entreposage à long terme de souches de *Campylobacter*.

L'emplacement de l'hôpital était relativement éloigné par rapport à certains points de collecte d'eau environnementale (Figure 10, Annexe 1). Il faut se poser la question concernant les gens ayant possiblement été exposés aux eaux étudiées dans cette étude: quels sont les risques que ces mêmes personnes se présentent à l'hôpital de Saint-Hyacinthe s'ils développent une campylobactériose? Ou encore, quelle est la probabilité que les patients présentés à l'hôpital de Saint-Hyacinthe aient été exposés aux sources d'eaux collectées ? On pourrait penser qu'effectivement, les points de collecte d'eau dans la ville de Saint-Hyacinthe (usine de traitement des eaux, usines d'épuration des eaux usées) seraient les endroits où il y aurait le plus de chances de faire des liens avec les souches de l'hôpital étant donné leur proximité géographique. Il faut cependant considérer la zone desservie par l'hôpital de Saint-Hyacinthe : bien des cas peuvent provenir des villes ou municipalités avoisinantes où les sources des eaux usées et des eaux destinées à la consommation ne sont pas les mêmes que celles échantillonnées dans cette étude. Par contre, les autres points de collecte d'eau étaient éloignés : les plages étaient situées en Estrie et en Montérégie, soit au sud-est de Saint-Hyacinthe. S'il n'y avait pas eu de contraintes budgétaires, le nombre d'échantillons aurait pu

être augmenté : plus d'échantillons d'eaux de surface provenant de la région de l'Estrie et de la Montérégie situés dans des rivières environnant les plages étudiées dans cette étude auraient été bénéfiques afin de maximiser la probabilité de faire des liens avec les isolats des affluents des plages et de permettre une meilleure comparaison de la diversité entre deux types d'eau à l'intérieur d'une même région. De plus, il aurait aussi été pertinent d'ajouter plus d'hôpitaux afin de génotyper davantage de souches cliniques : on pense notamment aux hôpitaux de Cowansville et Sherbrooke qui sont situés près des plages étudiées dans cette étude.

Concernant l'interprétation d'un même génotype observé entre une souche clinique et environnementale, on peut se poser la question de la directionnalité du lien, c'est-à-dire à savoir si l'eau a contaminé l'homme ou si l'homme a contaminé l'eau. Ou est-ce qu'une autre source aurait contaminé à la fois l'eau et l'homme? Il est possible, par exemple, qu'une usine de transformation agroalimentaire ait contaminé l'eau environnementale par ses rejets et un humain via vecteur alimentaire à la fois. Pour éclaircir cette interprétation, il aurait également fallu échantillonner des sources potentielles de contamination de l'eau et de l'homme afin de génotyper des isolats de *Campylobacter* issus de ces sources, puis d'investiguer la possible présence de liens génétiques. De plus, une enquête approfondie sur une potentielle exposition à l'eau environnementale précédant la maladie aurait pu être faite pour chaque patient d'hôpital. L'absence de réponses à ces questions limite la possibilité d'interpréter nos résultats de manière absolue en termes de source ou origine hydrique de la contamination vers l'humain.

L'utilisation de la banque de données canadienne CGF afin de faire des liens entre les souches provenant de cette étude et des souches isolées ailleurs au Canada semble un bon outil pour vérifier si un certain génotype d'intérêt a déjà été isolé lors d'un cas clinique de campylobactériose et nous informer sur les différentes possibilités de sources de contamination. Cependant, la représentativité des différentes sources possibles des isolats dans cette banque est questionnable, remettant en question l'usage de cette dernière pour associer un génotype donné à une source spécifique. La représentativité temporelle et géographique limite aussi l'usage de la banque de données pour faire des liens épidémiologiques avec les

isolats provenant de notre étude. En effet, les différentes sources animales présentes dans la banque ne sont pas également représentées comme dans toute banque de données moléculaires où les données proviennent de projets de recherche individuels. La banque de données CGF canadienne comporte principalement des isolats provenant de ruminants et de la volaille (ratio 1 volaille pour 1 ruminant), suivi des rats-laveurs (ratio 1 raton pour 3.3 ruminants) et des porcs (ratio 1 porc pour 9 ruminants) (en date du 5 mars 2015). D'autres espèces sont très faiblement représentées, par exemple, les chiens qui forment seulement 2×10^{-4} % des sources présentes dans la banque de données CGF canadienne. De plus, les souches de *Campylobacter* présentes dans la banque de données CGF et celles de notre étude ont été isolées à plusieurs mois d'intervalle. De plus, les isolats de cette banque proviennent majoritairement de l'Alberta, suivi de l'Ontario. Peu d'isolats de *Campylobacter* provenant du Québec se retrouvent dans cette banque : cela pourrait expliquer la fréquence d'isolement de nouveaux génotypes dans les eaux environnementales, mais surtout dans les souches cliniques. Ceci soulève un autre point intéressant : pourquoi les souches cliniques du Québec sont-elles différentes du reste du Canada ? Peut-être que des habitudes liées à des sources différentes d'infection pourraient expliquer cette différence, ou le simple fait que les sources de contamination présentes au Québec contiennent des souches de *Campylobacter* ayant des génotypes différents des sources de contamination du reste du Canada. Lorsqu'on compare les résultats MLST des souches provenant des Cantons-de-l'Est au Québec et celle de Oxfordshire au Royaume-Unis (les deux régions ayant le plus grand nombre de souches analysées) de la banque de donnée PubMLST, on remarque certains profils plus dominants dans une région comparativement à l'autre, voire même certains profils existants dans une région qui ne sont pas existants dans l'autre. Il serait intéressant d'analyser et de comparer les génotypes de la banque de données CGF canadienne entre les différentes provinces afin de vérifier la présence d'agrégats régionaux dans la distribution des génotypes. Bref, cette étude contribue à enrichir la banque de données CGF canadienne avec l'apport de souches environnementales et cliniques provenant du Québec. De plus en plus d'isolats de *Campylobacter* seront disponibles dans la banque de données CGF canadienne : le Laboratoire de santé publique du Québec fait génotyper leurs souches de *Campylobacter* par CGF depuis 2014 et les isolats provenant du

groupe de recherche de la Dre Sophie Michaud dans la région des Canton-de-l'Est sont présentement en train d'être génotypés par CGF (données non disponibles).

Directions futures

Les résultats de cette étude nous portent à suggérer l'utilisation de méthodes de quantification par PCR en temps réel à la place des méthodes de quantification basées sur des techniques de culture pour détecter *Campylobacter* dans les eaux environnementales, entre autres en raison de la difficulté d'isolement de *Campylobacter* par méthodes de culture (stade VBNC). Par contre, les techniques de culture nous permettent d'obtenir des isolats de *Campylobacter* qui peuvent ensuite être génotypés afin de faire des liens épidémiologiques. Certaines observations, comme le fait qu'un échantillon d'eau donné génère dans la majorité du temps un même génotype de *Campylobacter* d'après le génotypage de 5 colonies, nous amènent à réfléchir sur le fait que la méthode et les conditions de culture employées pour l'isolement de *Campylobacter* pourraient avoir un effet sélectif envers certains génotypes. Cette hypothèse a été confirmée par des collègues à Lethbridge (AB), où différentes souches de *Campylobacter* correspondant à différents génotypes ont été placées dans un même échantillon d'eau aux mêmes concentrations. Suite à un isolement par technique de culture, seuls certains génotypes ont été retrouvés (données non publiées). Il est rapporté que les milieux d'enrichissement sélectifs employés lors de détection de *Campylobacter* promouvaient davantage la croissance de certaines espèces par rapport à d'autres (Denis et al., 1999; Sammarco et al., 2010). Il serait pertinent de faire davantage de recherches au niveau de la physiologie et du métabolisme de *Campylobacter* afin de mieux élucider son comportement en milieu aquatique et son comportement quant à l'emploi de différents milieux de culture et d'enrichissement pour faire son isolement. Une autre possibilité serait le développement d'une méthode de génotypage qui n'aurait pas besoin d'étape préalable d'isolement par culture. On peut penser à une technique relevant de la microfluidique capable de génotyper les génomes entiers de différentes cellules isolées de *Campylobacter* à partir d'échantillons d'eau en temps réel. Nous pourrions de cette manière, entre autre, étudier les génotypes de cellules de *Campylobacter* viables non cultivables qui sont à ce jour très difficiles à étudier.

Conclusion

Cette étude met en perspective le potentiel de l'eau environnementale dans la transmission de la campylobactériose. Les résultats suggèrent une implication possible de l'eau dans la transmission, mais avec un risque relativement faible :

- *Campylobacter* est bel et bien présent dans les eaux environnementales dans la région sud-est du Québec, mais en faibles concentrations. L'utilisation du CGF a permis d'affirmer que les similarités génétiques entre les souches provenant de l'eau et les souches cliniques sont généralement faibles et possiblement sous-estimées en raison de l'échantillonnage, mais on retrouve rarement des souches génétiquement identiques. Dans ces cas, peut-on réellement conclure que l'infection provient de l'eau ? Il peut s'agir d'une source de contamination commune de l'eau et l'homme. On peut par contre affirmer que des souches de *Campylobacter* pathogènes pour l'homme circulent dans l'eau.
- Certains génotypes issus des eaux environnementales de cette étude sont comparables avec des génotypes cliniques de la banque de données CGF canadienne et renforceraient les conclusions que des souches potentiellement pathogéniques de *Campylobacter* circulent dans les eaux environnementales. De plus, la comparaison des génotypes provenant de cette étude avec ceux de la banque de données CGF canadienne permet d'identifier des sources potentielles de contamination : l'agriculture semble potentiellement être une source majeure de contamination de l'eau environnementale par *Campylobacter*.

Les autorités en santé publique peuvent s'inspirer de cette étude afin d'investiguer une possible relation entre les eaux environnementales et la campylobactériose d'une région spécifique. Pour de futures investigations épidémiologiques impliquant *Campylobacter*, il serait pertinent d'intégrer l'information concernant les expositions alimentaires du patient, le contact direct avec les animaux ou les gens malades ainsi que les expositions aux eaux

environnementales pour chaque cas de campylobactériose enquêté par les directions régionales de santé publique.

Sources documentaires

- Abley, M. J., Wittum, T. E., Zerby, H. N., & Funk, J. A. (2012). Quantification of *Campylobacter* and *Salmonella* in cattle before, during, and after the slaughter process. *Foodborne Pathog Dis*, 9(2), 113-119. doi: 10.1089/fpd.2011.0931
- Abu-Halaweh, M., Bates, J., & Patel, B. K. (2005). Rapid detection and differentiation of pathogenic *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by real-time PCR. *Res Microbiol*, 156(1), 107-114. doi: 10.1016/j.resmic.2004.08.008
- Abulreesh, H. H., Paget, T. A., & Goulder, R. (2006). *Campylobacter* in waterfowl and aquatic environments: incidence and methods of detection. *Environ Sci Technol*, 40(23), 7122-7131.
- Abulreesh, H. H., Paget, T. A., & Goulder, R. (2014). A pre-enrichment step is essential for detection of *Campylobacter* spp. in turbid pond water. *Trop Biomed*, 31(2), 320-326.
- Acke, E., Carroll, C., O'Leary, A., McGill, K., Kelly, L., Lawlor, A., . . . Whyte, P. (2011). Genotypic characterisation and cluster analysis of *Campylobacter jejuni* isolates from domestic pets, human clinical cases and retail food. *Ir Vet J*, 64(1), 6. doi: 10.1186/2046-0481-64-6
- Adhikari, B., Connolly, J. H., Madie, P., & Davies, P. R. (2004). Prevalence and clonal diversity of *Campylobacter jejuni* from dairy farms and urban sources. *N Z Vet J*, 52(6), 378-383. doi: 10.1080/00480169.2004.36455
- Ahmad, F., Seyrig, G., Turlousse, D. M., Stedtfeld, R. D., Tiedje, J. M., & Hashsham, S. A. (2011). A CCD-based fluorescence imaging system for real-time loop-mediated isothermal amplification-based rapid and sensitive detection of waterborne pathogens on microchips. *Biomed Microdevices*, 13(5), 929-937. doi: 10.1007/s10544-011-9562-2
- Ahmed, M. U., Dunn, L., & Ivanova, E. P. (2012). Evaluation of current molecular approaches for genotyping of *Campylobacter jejuni* strains. *Foodborne Pathog Dis*, 9(5), 375-385. doi: 10.1089/fpd.2011.0988
- Allos, B. M. (2001). *Campylobacter jejuni* Infections: update on emerging issues and trends. *Clin Infect Dis*, 32(8), 1201-1206. doi: 10.1086/319760

- Altekruse, S. F., & Tollefson, L. K. (2003). Human campylobacteriosis: a challenge for the veterinary profession. *J Am Vet Med Assoc*, 223(4), 445-452.
- Amar, C., Kittl, S., Spreng, D., Thomann, A., Korczak, B. M., Burnens, A. P., & Kuhnert, P. (2014). Genotypes and antibiotic resistance of canine *Campylobacter jejuni* isolates. *Vet Microbiol*, 168(1), 124-130. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.10.006
- Andrzejewska, M., Szczepanska, B., Klawe, J. J., Spica, D., & Chudzinska, M. (2013). Prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* species in cats and dogs from Bydgoszcz (Poland) region. *Pol J Vet Sci*, 16(1), 115-120.
- Arimi, S. M., Fricker, C. R., & Park, R. W. (1988). Occurrence of 'thermophilic' *Campylobacter* in sewage and their removal by treatment processes. *Epidemiol Infect*, 101(2), 279-286.
- Arsenault, J., Letellier, A., Quessy, S., Normand, V., & Boulianne, M. (2007). Prevalence and risk factors for *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. caecal colonization in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada. *Prev Vet Med*, 81(4), 250-264. doi: 10.1016/j.prevetmed.2007.04.016
- Arsenault, J., Ravel, A., Michel, P., Berke, O., & Gosselin, P. (2011). Do patients with recurrent episodes of campylobacteriosis differ from those with a single disease event? *BMC Public Health*, 11, 32. doi: 10.1186/1471-2458-11-32
- Asakura, M., Samosornsuk, W., Hinenoya, A., Misawa, N., Nishimura, K., Matsuhisa, A., & Yamasaki, S. (2008). Development of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 52(2), 260-266. doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00369.x
- Asakura, H., Yamasaki, M., Yamamoto, S. & Igimi, S. (2007). Deletion of *peb4* gene impairs cell adhesion and biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiol Lett*, 275, 278-285
- Atack, J. M., Harvey, P., Jones, M. A., & Kelly, D. J. (2008). The *Campylobacter jejuni* thiol peroxidases *Tpx* and *Bcp* both contribute to aerotolerance and peroxide-mediated stress resistance but have distinct substrate specificities. *J Bacteriol*, 190(15), 5279-5290. doi: 10.1128/jb.00100-08

- Atack, J. M., & Kelly, D. J. (2009). Oxidative stress in *Campylobacter jejuni*: responses, resistance and regulation. *Future Microbiol*, 4(6), 677-690. doi: 10.2217/fmb.09.44
- Axelsson-Olsson, D., Olofsson, J., Svensson, L., Griekspoor, P., Waldenstrom, J., Ellstrom, P., & Olsen, B. (2010). Amoebae and algae can prolong the survival of *Campylobacter* species in co-culture. *Exp Parasitol*, 126(1), 59-64. doi: 10.1016/j.exppara.2009.12.016
- Axelsson-Olsson, D., Waldenstrom, J., Broman, T., Olsen, B., & Holmberg, M. (2005). Protozoan *Acanthamoeba polyphaga* as a potential reservoir for *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol*, 71(2), 987-992. doi: 10.1128/aem.71.2.987-992.2005
- Bachtiar, B. M., Coloe, P. J., & Fry, B. N. (2007). Knockout mutagenesis of the *kpsE* gene of *Campylobacter jejuni* 81116 and its involvement in bacterium-host interactions. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 49(1), 149-154. doi: 10.1111/j.1574-695X.2006.00182.x
- Bacon, D. J., Alm, R. A., Burr, D. H., Hu, L., Kopecko, D. J., Ewing, C. P., . . . Guerry, P. (2000). Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect Immun*, 68(8), 4384-4390.
- Bacon, D. J., Szymanski, C. M., Burr, D. H., Silver, R. P., Alm, R. A., & Guerry, P. (2001). A phase-variable capsule is involved in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Mol Microbiol*, 40(3), 769-777.
- Bae, S., & Wuertz, S. (2012). Survival of host-associated bacteroidales cells and their relationship with *Enterococcus* spp., *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, and adenovirus in freshwater microcosms as measured by propidium monoazide-quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol*, 78(4), 922-932. doi: 10.1128/aem.05157-11
- Baek, K. T., Vegge, C. S., Skorko-Glonek, J., & Brondsted, L. (2011). Different contributions of *HtrA* protease and chaperone activities to *Campylobacter jejuni* stress tolerance and physiology. *Appl Environ Microbiol*, 77(1), 57-66. doi: 10.1128/aem.01603-10
- Baffone, W., Bruscolini, F., Pianetti, A., Biffi, M. R., Brandi, G., Salvaggio, L., & Albano, V. (1995). Diffusion of thermophilic *Campylobacter* in the Pesaro-Urbino area (Italy) from 1985 to 1992. *Eur J Epidemiol*, 11(1), 83-86.

- Bahrndorff, S., Rangstrup-Christensen, L., Nordentoft, S., & Hald, B. (2013). Foodborne disease prevention and broiler chickens with reduced *Campylobacter* infection. *Emerg Infect Dis*, *19*(3), 425-430. doi: 10.3201/eid1903.111593
- Baker, M. G., Sneyd, E., & Wilson, N. A. (2007). Is the major increase in notified campylobacteriosis in New Zealand real? *Epidemiol Infect*, *135*(1), 163-170. doi: 10.1017/s0950268806006583
- Bang, D. D., Wedderkopp, A., Pedersen, K., & Madsen, M. (2002). Rapid PCR using nested primers of the 16S rRNA and the hippuricase (*hipO*) genes to detect *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental samples. *Mol Cell Probes*, *16*(5), 359-369.
- Banihashemi, A., Van Dyke, M. I., & Huck, P. M. (2012). Long-amplicon propidium monoazide-PCR enumeration assay to detect viable *Campylobacter* and *Salmonella*. *J Appl Microbiol*, *113*(4), 863-873. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05382.x
- Barer, M. R. & Harwood, C. R. (2002). Bacterial viability and culturability. *Adv Microb Physiol*, *41*, 93-137.
- Barton, C., Ng, L. K., Tyler, S. D., & Clark, C. G. (2007). Temperate bacteriophages affect pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol*, *45*(2), 386-391. doi: 10.1128/jcm.01513-06
- Bashor, M. P., Curtis, P. A., Keener, K. M., Sheldon, B. W., Kathariou, S., & Osborne, J. A. (2004). Effects of carcass washers on *Campylobacter* contamination in large broiler processing plants. *Poult Sci*, *83*(7), 1232-1239.
- Baume, M., Garrelly, L., Facon, J. P., Bouton, S., Fraisse, P. O., Yardin, C., . . . Jarraud, S. (2013). The characterization and certification of a quantitative reference material for *Legionella* detection and quantification by qPCR. *J Appl Microbiol*, *114*(6), 1725-1733. doi: 10.1111/jam.12172
- Baylis, C. L., MacPhee, S., Martin, K. W., Humphrey, T. J., & Betts, R. P. (2000). Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* spp. from foods. *J Appl Microbiol*, *89*(5), 884-891.
- Betaieb, M., & Jones, K. (1990). Thermophilic campylobacters in two sewage treatment plants in Libya. *Lett Appl Microbiol*, *11*(2), 93-95. doi: 10.1111/j.1472-765X.1990.tb01284.x

- Beumer, R. R., Noomen, A., Marijs, J. A., & Kampelmacher, E. (1985). Antibacterial action of the lactoperoxidase on *Campylobacter jejuni* in cow's milk. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 39, 8.
- Biggs, P. J., Fearnhead, P., Hotter, G., Mohan, V., Collins-Emerson, J., Kwan, E., . . . French, N. P. (2011). Whole-genome comparison of two *Campylobacter jejuni* isolates of the same sequence type reveals multiple loci of different ancestral lineage. *PLoS One*, 6(11), e27121. doi: 10.1371/journal.pone.0027121
- Bily, L., Petton, J., Lalande, F., Rouxel, S., Denis, M., Chemaly, M., . . . Fravallo, P. (2010). Quantitative and qualitative evaluation of *Campylobacter* spp. contamination of turkey cecal contents and carcasses during and following the slaughtering process. *J Food Prot*, 73(7), 1212-1218.
- Bingham-Ramos, L. K., & Hendrixson, D. R. (2008). Characterization of two putative cytochrome C peroxidases of *Campylobacter jejuni* involved in promoting commensal colonization of poultry. *Infect Immun*, 76(3), 1105-1114. doi: 10.1128/iai.01430-07
- Binnicker, M. J., & Espy, M. E. (2013). Comparison of six real-time PCR assays for qualitative detection of cytomegalovirus in clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 51(11), 3749-3752. doi: 10.1128/jcm.02005-13
- Black, R. E., Levine, M. M., Clements, M. L., Hughes, T. P., & Blaser, M. J. (1988). Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J Infect Dis*, 157(3), 472-479.
- Blaser, M. J. (1997). Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *J Infect Dis*, 176 Suppl 2, S103-105.
- Blaser, M. J., & Cody, H. J. (1986). Methods for isolating *Campylobacter jejuni* from low-turbidity water. *Appl Environ Microbiol*, 51(2), 312-315.
- Bohaychuk, V. M., Bradbury, R. W., Dimock, R., Fehr, M., Gensler, G. E., King, R. K., . . . Romero Barrios, P. (2009). A microbiological survey of selected Alberta-grown fresh produce from farmers' markets in Alberta, Canada. *J Food Prot*, 72(2), 415-420.
- Bohaychuk, V. M., Gensler, G. E., & Barrios, P. R. (2011). Microbiological baseline study of beef and pork carcasses from provincially inspected abattoirs in Alberta, Canada. *Can Vet J*, 52(10), 1095-1100.

- Bolton, D. J. (2015). *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiol*, 48, 99-108. doi: 10.1016/j.fm.2014.11.017
- Bolton, F. J., Coates, D., Hinchliffe, P. M., & Robertson, L. (1983). Comparison of selective media for isolation of *Campylobacter jejuni/coli*. *J Clin Pathol*, 36(1), 78-83.
- Bolton, F. J., Hutchinson, D. N., & Coates, D. (1984). Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *J Clin Microbiol*, 19(2), 169-171.
- Bolton, F. J., & Robertson, L. (1982). A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. *J Clin Pathol*, 35(4), 462-467.
- Bonjoch, X., Calvò, L., Soler, M., Ruiz-Rueda, O., & Garcia-Gil, L. J. (2010). A new multiplexed real-time PCR assay to detect *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *Food Anal Method*, 3(1), 40-46. doi: 10.1007/s12161-009-9110-3
- Bopp, D. J., Saunders, B. D., Waring, A. L., Ackelsberg, J., Dumas, N., Braun-Howland, E., . . . Limberger, R. J. (2003). Detection, isolation, and molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* associated with a large waterborne outbreak. *J Clin Microbiol*, 41(1), 174-180.
- Bouwknegt, M., van Pelt, W., Kubbinga, M. E., Weda, M., & Havelaar, A. H. (2014). Potential association between the recent increase in campylobacteriosis incidence in the Netherlands and proton-pump inhibitor use - an ecological study. *Euro Surveill*, 19(32), Article 3.
- Boyle, M., Sichel, C., Fernández-Ibáñez, P., Arias-Quiroz, G. B., Iriarte-Puña, M., Mercado, A., . . . McGuigan, K. G. (2008). Bactericidal effect of solar water disinfection under real sunlight conditions. *Appl Environ Microbiol*, 74(10), 2997-3001. doi: 10.1111/aem.02415-07
- Brankatschk, R., Bodenhausen, N., Zeyer, J., & Burgmann, H. (2012). Simple absolute quantification method correcting for quantitative PCR efficiency variations for microbial community samples. *Appl Environ Microbiol*, 78(12), 4481-4489. doi: 10.1128/aem.07878-11
- Breitenmoser, A., Fretz, R., Schmid, J., Besl, A., & Etter, R. (2011). Outbreak of acute gastroenteritis due to a washwater-contaminated water supply, Switzerland, 2008. *J Water Health*, 9(3), 569-576. doi: 10.2166/wh.2011.158

- Brennhovd, O., Kapperud, G., & Langeland, G. (1992). Survey of thermotolerant *Campylobacter* spp. and *Yersinia* spp. in three surface water sources in Norway. *Int J Food Microbiol*, 15(3-4), 327-338.
- Brown, P. E., Christensen, O. F., Clough, H. E., Diggle, P. J., Hart, C. A., Hazel, S., . . . French, N. P. (2004). Frequency and spatial distribution of environmental *Campylobacter* spp. *Appl Environ Microbiol*, 70(11), 6501-6511. doi: 10.1128/aem.70.11.6501-6511.2004
- Buchan, B. W., Olson, W. J., Pezewski, M., Marcon, M. J., Novicki, T., Uphoff, T. S., . . . Ledebor, N. A. (2013). Clinical evaluation of a real-time PCR assay for identification of *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* (*Campylobacter jejuni* and *C. coli*), and shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates in stool specimens. *J Clin Microbiol*, 51(12), 4001-4007. doi: 10.1128/jcm.02056-13
- Buelow, D. R., Christensen, J. E., Neal-McKinney, J. M., & Konkel, M. E. (2011). *Campylobacter jejuni* survival within human epithelial cells is enhanced by the secreted protein *CiaI*. *Mol Microbiol*, 80(5), 1296-1312. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07645.x
- Bull, S. A., Allen, V. M., Domingue, G., Jorgensen, F., Frost, J. A., Ure, R., . . . Humphrey, T. J. (2006). Sources of *Campylobacter* spp. colonizing housed broiler flocks during rearing. *Appl Environ Microbiol*, 72(1), 645-652. doi: 10.1128/aem.72.1.645-652.2006
- Bullman, S., Lucid, A., Corcoran, D., Sleator, R. D., & Lucey, B. (2013). Genomic investigation into strain heterogeneity and pathogenic potential of the emerging gastrointestinal pathogen *Campylobacter ureolyticus*. *PLoS One*, 8(8), e71515. doi: 10.1371/journal.pone.0071515
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., . . . Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55(4), 611-622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
- Buswell, C. M., Herlihy, Y. M., Lawrence, L. M., McGuiggan, J. T., Marsh, P. D., Keevil, C. W., & Leach, S. A. (1998). Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp.

- in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and -rRNA staining. *Appl Environ Microbiol*, 64(2), 733-741.
- Butler, A. J., Thomas, M. K., & Pintar, K. D. (2015). Expert elicitation as a means to attribute 28 enteric pathogens to foodborne, waterborne, animal contact, and person-to-person transmission routes in Canada. *Foodborne Pathog Dis*, 12(4), 335-344. doi: 10.1089/fpd.2014.1856
- Butler, R. C., Lund, V., & Carlson, D. A. (1987). Susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Yersinia enterocolitica* to UV radiation. *Appl Environ Microbiol*, 53(2), 375-378.
- Buzby, J. C., Allos, B. M., & Roberts, T. (1997). The economic burden of *Campylobacter*-associated Guillain-Barre syndrome. *J Infect Dis*, 176 Suppl 2, S192-197.
- Buzby, J. C., & Roberts, T. (1996). ERS updates US foodborne disease costs for seven pathogens. *FoodReview*, 19, 5.
- Cao, Y., Raith, M. R., & Griffith, J. F. (2015). Droplet digital PCR for simultaneous quantification of general and human-associated fecal indicators for water quality assessment. *Water Res*, 70, 337-349. doi: 10.1016/j.watres.2014.12.008
- Carbonero, A., Paniagua, J., Torralbo, A., Arenas-Montes, A., Borge, C., & Garcia-Bocanegra, I. (2014). *Campylobacter* infection in wild artiodactyl species from southern Spain: occurrence, risk factors and antimicrobial susceptibility. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 37(2), 115-121. doi: 10.1016/j.cimid.2014.01.001
- Carlone, G. M., & Lascelles, J. (1982). Aerobic and anaerobic respiratory systems in *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* grown in atmospheres containing hydrogen. *J Bacteriol*, 152(1), 306-314.
- Carrillo, C. D., Kruczkiewicz, P., Mutschall, S., Tudor, A., Clark, C., & Taboada, E. N. (2012). A framework for assessing the concordance of molecular typing methods and the true strain phylogeny of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* using draft genome sequence data. *Front Cell Infect Microbiol*, 2, 57. doi: 10.3389/fcimb.2012.00057
- Carrillo, C. D., Taboada, E., Nash, J. H., Lanthier, P., Kelly, J., Lau, P. C., . . . Szymanski, C. M. (2004). Genome-wide expression analyses of *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by *flhA*. *J Biol Chem*, 279(19), 20327-20338. doi: 10.1074/jbc.M401134200

- Carvalho, A. C., Ruiz-Palacios, G. M., Ramos-Cervantes, P., Cervantes, L. E., Jiang, X., & Pickering, L. K. (2001). Molecular characterization of invasive and noninvasive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *J Clin Microbiol*, *39*(4), 1353-1359. doi: 10.1128/jcm.39.4.1353-1359.2001
- CDC. (2013). Notes from the field: recurrent outbreak of *Campylobacter jejuni* infections associated with a raw milk dairy-Pennsylvania, April-May 2013. *Clin Infect Dis*, *57*(10), i-ii; discussion ii.
- CDC. (2014). Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2012 (Final Report). Dans Centers for Disease Control and Prevention (éd.). Atlanta, Georgia: Department of Health and Human Services.
- Cenciarini-Borde, C., Courtois, S., & La Scola, B. (2009). Nucleic acids as viability markers for bacteria detection using molecular tools. *Future Microbiol*, *4*(1), 45-64. doi: 10.2217/17460913.4.1.45
- Chaban, B., Musil, K. M., Himsworth, C. G., & Hill, J. E. (2009). Development of *cpn60*-based real-time quantitative PCR assays for the detection of 14 *Campylobacter* species and application to screening of canine fecal samples. *Appl Environ Microbiol*, *75*(10), 3055-3061. doi: 10.1128/aem.00101-09
- Chaban, B., Ngeleka, M., & Hill, J. E. (2010). Detection and quantification of 14 *Campylobacter* species in pet dogs reveals an increase in species richness in feces of diarrheic animals. *BMC Microbiol*, *10*, 73. doi: 10.1186/1471-2180-10-73
- Chai, L. C., Ghazali, F. M., Bakar, F. A., Lee, H. Y., Suhaimi, L. R., Talib, S. A., . . . Radu, S. (2009). Occurrence of thermophilic *Campylobacter* spp. contamination on vegetable farms in Malaysia. *J Microbiol Biotechnol*, *19*(11), 1415-1420.
- Champion, O. L., Best, E. L., & Frost, J. A. (2002). Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism techniques for investigating outbreaks of enteritis due to campylobacters. *J Clin Microbiol*, *40*(6), 2263-2265.
- Champion, O. L., Gaunt, M. W., Gundogdu, O., Elmi, A., Witney, A. A., Hinds, J., . . . Wren, B. W. (2005). Comparative phylogenomics of the food-borne pathogen *Campylobacter*

- jejuni* reveals genetic markers predictive of infection source. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(44), 16043-16048. doi: 10.1073/pnas.0503252102
- Charrel, R. N., La Scola, B., & Raoult, D. (2004). Multi-pathogens sequence containing plasmids as positive controls for universal detection of potential agents of bioterrorism. *BMC Microbiol*, 4(21). doi : 10.1186/1471-2180-4-21
- Choi, H. K., Marth, E. H., & Vasada, P. C. (1993). Use of microwave to inactivate *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter jejuni* in milk. *Milchwissenschaft*, 48, 3.
- Chokboonmongkol, C., Patchanee, P., Golz, G., Zessin, K. H., & Alter, T. (2013). Prevalence, quantitative load, and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. from broiler ceca and broiler skin samples in Thailand. *Poult Sci*, 92(2), 462-467. doi: 10.3382/ps.2012-02599
- Chou, S. P., Dular, R., & Kasatiya, S. (1983). Effect of ferrous sulfate, sodium metabisulfite, and sodium pyruvate on survival of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol*, 18(4), 986-987.
- Christensen, J. E., Pacheco, S. A., & Konkel, M. E. (2009). Identification of a *Campylobacter jejuni*-secreted protein required for maximal invasion of host cells. *Mol Microbiol*, 73(4), 650-662. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06797.x
- Chua, K., Gurtler, V., Montgomery, J., Fraenkel, M., Mayall, B. C., & Grayson, M. L. (2007). *Campylobacter insulaenigrae* causing septicaemia and enteritis. *J Med Microbiol*, 56(Pt 11), 1565-1567. doi: 10.1099/jmm.0.47366-0
- Cikos, S., Bukovska, A., & Koppel, J. (2007). Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Mol Biol*, 8, 113. doi: 10.1186/1471-2199-8-113
- Clark, C. G., Bryden, L., Cuff, W. R., Johnson, P. L., Jamieson, F., Ciebin, B., & Wang, G. (2005). Use of the oxford multilocus sequence typing protocol and sequencing of the flagellin short variable region to characterize isolates from a large outbreak of waterborne *Campylobacter* spp. strains in Walkerton, Ontario, Canada. *J Clin Microbiol*, 43(5), 2080-2091. doi: 10.1128/jcm.43.5.2080-2091.2005

- Clark, C. G., Price, L., Ahmed, R., Woodward, D. L., Melito, P. L., Rodgers, F. G., . . . Ellis, A. (2003). Characterization of waterborne outbreak-associated *Campylobacter jejuni*, Walkerton, Ontario. *Emerg Infect Dis*, 9(10), 1232-1241. doi: 10.3201/eid0910.020584
- Clark, C. G., Taboada, E., Grant, C. C., Blakeston, C., Pollari, F., Marshall, B., . . . Ng, L. K. (2012). Comparison of molecular typing methods useful for detecting clusters of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates through routine surveillance. *J Clin Microbiol*, 50(3), 798-809. doi: 10.1128/jcm.05733-11
- Clark, S. T., Gilbride, K. A., Mehrvar, M., Laursen, A. E., Bostan, V., Pushchak, R., & McCarthy, L. H. (2011). Evaluation of low-copy genetic targets for waterborne bacterial pathogen detection via qPCR. *Water Res*, 45(11), 3378-3388. doi: 10.1016/j.watres.2011.03.050
- Close, M., Noonan, M., Hector, R., & Bright, J. (2010). Microbial transport from dairying under two spray-irrigation systems in Canterbury, New Zealand. *J Environ Qual*, 39(3), 824-833. doi: 10.2134/jeq2009.0208
- Coker, A. O., Isokpehi, R. D., Thomas, B. N., Amisu, K. O., & Obi, C. L. (2002). Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerg Infect Dis*, 8(3), 237-243. doi: 10.3201/eid0803.010233
- Contreras, P. J., Urrutia, H., Sossa, K., & Nocker, A. (2011). Effect of PCR amplicon length on suppressing signals from membrane-compromised cells by propidium monoazide treatment. *J Microbiol Methods*, 87(1), 89-95. doi: 10.1016/j.mimet.2011.07.016
- Cools, I., Uyttendaele, M., Caro, C., D'Haese, E., Nelis, H. J., & Debevere, J. (2003). Survival of *Campylobacter jejuni* strains of different origin in drinking water. *J Appl Microbiol*, 94(5), 886-892.
- Corcoran, D., Quinn, T., Cotter, L., Whyte, P., & Fanning, S. (2006). Antimicrobial resistance profiling and *fla*-typing of Irish thermophilic *Campylobacter* spp. of human and poultry origin. *Lett Appl Microbiol*, 43(5), 560-565. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01987.x
- Corry, J. E., Post, D. E., Colin, P., & Laisney, M. J. (1995). Culture media for the isolation of *Campylobacter*. *Int J Food Microbiol*, 26(1), 43-76.

- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., & James, G. (1994). Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol*, *176*(8), 2137-2142.
- Coudray-Meunier, C., Fraisse, A., Martin-Latil, S., Guillier, L., Delannoy, S., Fach, P., & Perelle, S. (2015). A comparative study of digital RT-PCR and RT-qPCR for quantification of Hepatitis A virus and Norovirus in lettuce and water samples. *Int J Food Microbiol*, *201*, 17-26. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.006
- Coupland, L. J., McElarney, I., Meader, E., Cowley, K., Alcock, L., Naunton, J., & Gray, J. (2013). Simultaneous detection of viral and bacterial enteric pathogens using the Seeplex(R) Diarrhea ACE detection system. *Epidemiol Infect*, *141*(10), 2111-2121. doi: 10.1017/s0950268812002622
- Couture, B. (1997). *Bactériologie médicale*. (3^e éd.). Anjou, Québec.
- Cowden, J. (1992). *Campylobacter*: epidemiological paradoxes. *BMJ*, *305*(6846), 132-133.
- Cox, L. A. (2002). Re-examining the causes of campylobacteriosis. *Int J Infect Dis*, *6 Suppl 3*, 3S26-35; discussion 23S36, 23S53-28.
- Curriero, F. C., Patz, J. A., Rose, J. B., & Lele, S. (2001). The association between extreme precipitation and waterborne disease outbreaks in the United States, 1948-1994. *Am J Public Health*, *91*(8), 1194-1199.
- Cypierre, A., Denes, E., Barraud, O., Jamilloux, Y., Jacques, J., Durox, H., . . . Weinbreck, P. (2014). *Campylobacter fetus* infections. *Med Mal Infect*, *44*(4), 167-173. doi: 10.1016/j.medmal.2014.02.001
- Daczowska-Kozon, E., & Brzostek-Nowakowska, J. (2001). *Campylobacter* spp. in waters of three main western Pomerania water bodies. *Int J Hyg Environ Health*, *203*(5-6), 435-443.
- Damjanova, I., Jakab, M., Farkas, T., Meszaros, J., Galantai, Z., Turcsanyi, I., . . . Kardos, G. (2011). From farm to fork follow-up of thermotolerant campylobacters throughout the broiler production chain and in human cases in a Hungarian county during a ten-months period. *Int J Food Microbiol*, *150*(2-3), 95-102. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.011

- Danis, K., Di Renzi, M., O'Neill, W., Smyth, B., McKeown, P., Foley, B., . . . Devine, M. (2009). Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection: an all-Ireland case-control study. *Euro Surveillance*, *14*(7).
- Dasti, J. I., Tareen, A. M., Lugert, R., Zautner, A. E., & Gross, U. (2010). *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *Int J Med Microbiol*, *300*(4), 205-211. doi: 10.1016/j.ijmm.2009.07.002
- Davies, P. R. (2011). Intensive swine production and pork safety. *Foodborne Pathog Dis*, *8*(2), 189-201. doi: 10.1089/fpd.2010.0717
- Day, E., Dear, P. H., & McCaughan, F. (2013). Digital PCR strategies in the development and analysis of molecular biomarkers for personalized medicine. *Methods*, *59*(1), 101-107. doi: 10.1016/j.ymeth.2012.08.001
- de Boer, P., Wagenaar, J. A., Achterberg, R. P., van Putten, J. P., Schouls, L. M., & Duim, B. (2002). Generation of *Campylobacter jejuni* genetic diversity in vivo. *Mol Microbiol*, *44*(2), 351-359.
- de Boer, R. F., Ott, A., Guren, P., van Zanten, E., van Belkum, A., & Kooistra-Smid, A. M. (2013). Detection of *Campylobacter* species and *Arcobacter butzleri* in stool samples by use of real-time multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, *51*(1), 253-259. doi: 10.1128/jcm.01716-12
- de Vries, J. J., Arents, N. L., & Manson, W. L. (2008). *Campylobacter* species isolated from extra-oro-intestinal abscesses: a report of four cases and literature review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, *27*(11), 1119-1123. doi: 10.1007/s10096-008-0550-2
- de Wit, M. A., Koopmans, M. P., Kortbeek, L. M., van Leeuwen, N. J., Bartelds, A. I., & van Duynhoven, Y. T. (2001). Gastroenteritis in sentinel general practices, The Netherlands. *Emerg Infect Dis*, *7*(1), 82-91. doi: 10.3201/eid0701.700082
- Decho, A. W. (1990). Microbial exopolymers secretions in ocean environments: their roles in food webs and marine processes. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev*, *28*, 73-153.
- Deckert, A. E., Taboada, E., Mutschall, S., Poljak, Z., Reid-Smith, R. J., Tamblyn, S., . . . McEwen, S. A. (2014). Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* human and chicken isolates from two health units. *Foodborne Pathog Dis*, *11*(2), 150-155. doi: 10.1089/fpd.2013.1610

- Deer, D. M., & Lampel, K. A. (2010). Development of a multiplex real-time PCR assay with internal amplification control for the detection of *Shigella* species and enteroinvasive *Escherichia coli*. *J Food Prot*, 73(9), 1618-1625.
- Dekker, N. (2000). Outer-membrane phospholipase A: known structure, unknown biological function. *Mol Microbiol*, 35(4), 711-717.
- Denis, M., Chidaine, B., Laisney, M. J., Kempf, I., Rivoal, K., Megraud, F., & Fravallo, P. (2009). Comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry, pig and *Campylobacter* human infections in Brittany, France. *Pathol Biol (Paris)*, 57(1), 23-29. doi: 10.1016/j.patbio.2008.04.007
- Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G., & Colin, P. (1999). Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Lett Appl Microbiol*, 29(6), 406-410.
- Denis, M., Tanguy, M., Chidaine, B., Laisney, M. J., Megraud, F., & Fravallo, P. (2011). Description and sources of contamination by *Campylobacter* spp. of river water destined for human consumption in Brittany, France. *Pathol Biol (Paris)*, 59(5), 256-263. doi: 10.1016/j.patbio.2009.10.007
- Denno, D. M., Keene, W. E., Hutter, C. M., Koepsell, J. K., Patnode, M., Flodin-Hursh, D., . . . Tarr, P. I. (2009). Tri-county comprehensive assessment of risk factors for sporadic reportable bacterial enteric infection in children. *J Infect Dis*, 199(4), 467-476. doi: 10.1086/596555
- Diergaardt, S. M., Venter, S. N., Spreeth, A., Theron, J., & Brozel, V. S. (2004). The occurrence of *Campylobacter* in water sources in South Africa. *Water Res*, 38(10), 2589-2595. doi: 10.1016/j.watres.2004.03.004
- Diker, K. S., Akan, M., Hascelik, G., & Yurdakök, M. (1991). The bactericidal activity of tea against *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Lett Appl Microbiol*, 12(2), 34-35. doi: 10.1111/j.1472-765X.1991.tb00496.x
- Dingle, K. E., Colles, F. M., Falush, D., & Maiden, M. C. (2005). Sequence typing and comparison of population biology of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol*, 43(1), 340-347. doi: 10.1128/jcm.43.1.340-347.2005

- Dingle, K. E., Colles, F. M., Wareing, D. R., Ure, R., Fox, A. J., Bolton, F. E., . . . Maiden, M. C. (2001). Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol*, *39*(1), 14-23. doi: 10.1128/jcm.39.1.14-23.2001
- Djordjevic, S. P., Unicomb, L. E., Adamson, P. J., Mickan, L., & Rios, R. (2007). Clonal complexes of *Campylobacter jejuni* identified by multilocus sequence typing are reliably predicted by restriction fragment length polymorphism analyses of the *flaA* gene. *J Clin Microbiol*, *45*(1), 102-108. doi: 10.1128/jcm.01012-06
- Domingues, A. R., Pires, S. M., Halasa, T., & Hald, T. (2012). Source attribution of human campylobacteriosis using a meta-analysis of case-control studies of sporadic infections. *Epidemiol Infect*, *140*(6), 970-981. doi: 10.1017/s0950268811002676
- Donnison, A. (2003). Isolation of thermotolerant *Campylobacter* – review & methods for New Zealand laboratories: Ministry of Health.
- Doorduyn, Y., Van Den Brandhof, W. E., Van Duynhoven, Y. T., Breukink, B. J., Wagenaar, J. A., & Van Pelt, W. (2010). Risk factors for indigenous *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections in The Netherlands: a case-control study. *Epidemiol Infect*, *138*(10), 1391-1404. doi: 10.1017/s095026881000052x
- Dorrell, N., Mangan, J. A., Laing, K. G., Hinds, J., Linton, D., Al-Ghusein, H., . . . Wren, B. W. (2001). Whole genome comparison of *Campylobacter jejuni* human isolates using a low-cost microarray reveals extensive genetic diversity. *Genome Res*, *11*(10), 1706-1715. doi: 10.1101/gr.185801
- Doyle, M. P., & Roman, D. J. (1982). Response of *Campylobacter jejuni* to sodium chloride. *Appl Environ Microbiol*, *43*(3), 561-565.
- Duarte, A., Botteldoorn, N., Coucke, W., Denayer, S., Dierick, K., & Uyttendaele, M. (2015). Effect of exposure to stress conditions on propidium monoazide (PMA)-qPCR based *Campylobacter* enumeration in broiler carcass rinses. *Food Microbiol*, *48*, 182-190. doi: 10.1016/j.fm.2014.12.011
- Duffy, L., & Dykes, G. A. (2006). Growth temperature of four *Campylobacter jejuni* strains influences their subsequent survival in food and water. *Lett Appl Microbiol*, *43*(6), 596-601. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.02019.x

- Dufour, A. P., Evans, O., Behymer, T. D., & Cantu, R. (2006). Water ingestion during swimming activities in a pool: a pilot study. *J Water Health*, 4(4), 425-430.
- Duncan, G. E. (2014). Determining the health benefits of poultry industry compliance measures: the case of campylobacteriosis regulation in New Zealand. *N Z Med J*, 127(1391), 22-37.
- Dungan, R. S. (2014). Estimation of infectious risks in residential populations exposed to airborne pathogens during center pivot irrigation of dairy wastewaters. *Environ Sci Technol*, 48(9), 5033-5042. doi: 10.1021/es405693v
- Dungan, R. S., Klein, M., & Leytem, A. B. (2012). Quantification of bacterial indicators and zoonotic pathogens in dairy wastewater ponds. *Appl Environ Microbiol*, 78(22), 8089-8095. doi: 10.1128/aem.02470-12
- Eberle, K. N., & Kiess, A. S. (2012). Phenotypic and genotypic methods for typing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry. *Poult Sci*, 91(1), 255-264. doi: 10.3382/ps.2011-01414
- Edge, T. A., Khan, I. U., Bouchard, R., Guo, J., Hill, S., Locas, A., . . . Watson, S. (2013). Occurrence of waterborne pathogens and *Escherichia coli* at offshore drinking water intakes in lake Ontario. *Appl Environ Microbiol*, 79(19), 5799-5813. doi: 10.1128/aem.00870-13
- Effler, P., Jeong, M. C., Kimura, A., Nakata, M., Burr, R., Cremer, E., & Slutsker, L. (2001). Sporadic *Campylobacter jejuni* infections in Hawaii: associations with prior antibiotic use and commercially prepared chicken. *J Infect Dis*, 183(7), 1152-1155. doi: 10.1086/319292
- Engberg, J. (2006). Contributions to the epidemiology of *Campylobacter* infections. A review of clinical and microbiological studies. *Dan Med Bull*, 53(4), 361-389.
- Engvall, E. O., Brandstrom, B., Gunnarsson, A., Morner, T., Wahlstrom, H., & Fermer, C. (2002). Validation of a polymerase chain reaction/restriction enzyme analysis method for species identification of thermophilic *Campylobacter* isolated from domestic and wild animals. *J Appl Microbiol*, 92(1), 47-54.
- Eucker, T. P., & Konkel, M. E. (2012). The cooperative action of bacterial fibronectin-binding proteins and secreted proteins promote maximal *Campylobacter jejuni* invasion of host

- cells by stimulating membrane ruffling. *Cell Microbiol*, 14(2), 226-238. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01714.x
- Evers, E. G., Van Der Fels-Klerx, H. J., Nauta, M. J., Schijven, J. F., & Havelaar, A. H. (2008). *Campylobacter* source attribution by exposure assessment. *Int J Risk Assess Manag* (8), 174-190.
- Eyles, R., Niyogi, D., Townsend, C., Benwell, G., & Weinstein, P. (2003). Spatial and temporal patterns of *Campylobacter* contamination underlying public health risk in the Taieri River, New Zealand. *J Environ Qual*, 32(5), 1820-1828.
- Fischer, S. H., & Nachamkin, I. (1991). Common and variable domains of the flagellin gene, *flaA*, in *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol*, 5(5), 1151-1158.
- Fisher, K., & Phillips, C. A. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *J Appl Microbiol*, 101(6), 1232-1240. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03035.x
- Fittipaldi, M., Nocker, A., & Codony, F. (2012). Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *J Microbiol Methods*, 91(2), 276-289. doi: 10.1016/j.mimet.2012.08.007
- Fitzgerald, C., Sails, A. D., & Fields, P. I. (2005). *Campylobacter jejuni* strain variation. Dans J. M. Ketley & M. E. Konkel (dir.), *Campylobacter jejuni: new perspectives in molecular and cellular biology*. (p. 59-77). Wymondham, UK: Horizon Bioscience.
- Flanagan, R. C., Neal-McKinney, J. M., Dhillon, A. S., Miller, W. G., & Konkel, M. E. (2009). Examination of *Campylobacter jejuni* putative adhesins leads to the identification of a new protein, designated *FlpA*, required for chicken colonization. *Infect Immun*, 77(6), 2399-2407. doi: 10.1128/iai.01266-08
- Fleury, M., Charron, D. F., Holt, J. D., Allen, O. B., & Maarouf, A. R. (2006). A time series analysis of the relationship of ambient temperature and common bacterial enteric infections in two Canadian provinces. *Int J Biometeorol*, 50(6), 385-391. doi: 10.1007/s00484-006-0028-9

- Flint, J. A., Dore, K., Majowicz, S. E., Edge, V. L., & Sockett, P. (2004). From stool to statistics: reporting of acute gastrointestinal illnesses in Canada. *Can J Public Health*, 95(4), 309-313.
- FoodNet Canada. (2006). FoodNet Canada (formerly known as CEnterNet). <http://www.phac-aspc.gc.ca/foodnetcanada/> page consultée le 5 mai 2015.
- FoodNet Canada. (2007). FoodNet Canada (formerly known as CEnterNet). <http://www.phac-aspc.gc.ca/foodnetcanada/> page consultée le 5 mai 2015.
- FoodNet Canada. (2013). FoodNet Canada (formerly known as CEnterNet). <http://www.phac-aspc.gc.ca/foodnetcanada/> page consultée le 5 mai 2015.
- Font, C., Cruceta, A., Moreno, A., Miro, O., Coll-Vinent, B., Almela, M., & Mensa, J. (1997). [A study of 30 patients with bacteremia due to *Campylobacter* spp.]. *Med Clin (Barc)*, 108(9), 336-340.
- Fouts, D. E., Mongodin, E. F., Mandrell, R. E., Miller, W. G., Rasko, D. A., Ravel, J., . . . Nelson, K. E. (2005). Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *Campylobacter* species. *PLoS Biol*, 3(1), e15. doi: 10.1371/journal.pbio.0030015
- Fox, J. G., Ackerman, J. I., & Newcomer, C. E. (1983). Ferret as a potential reservoir for human campylobacteriosis. *Am J Vet Res*, 44(6), 1049-1052.
- Fox, J. G., Hering, A. M., Ackerman, J. I., & Taylor, N. S. (1983). The pet hamster as a potential reservoir of human campylobacteriosis. *J Infect Dis*, 147(4), 784-784.
- Fricke, C. R., & Park, R. W. (1989). A two-year study of the distribution of 'thermophilic' *Campylobacter* in human, environmental and food samples from the Reading area with particular reference to toxin production and heat-stable serotype. *J Appl Bacteriol*, 66(6), 477-490.
- Friedman, M., Henika, P. R., & Mandrell, R. E. (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J Food Prot*, 65(10), 1545-1560.
- Frost, J. A. (2001). Current epidemiological issues in human campylobacteriosis. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*(30), 85s-95s.

- FSA. (2014). FSA releases first results from *Campylobacter* survey. *Vet Rec*, 175(7), 158. doi: 10.1136/vr.g5104
- Gadkar, V. J., & Fillion, M. (2012). Future trends in quantitative real-time polymerase chain reaction technology and their implication in applied microbiology. Dans M. Fillion (dir.), *Quantitative real-time PCR in applied microbiology*. (p. 233). Norfolk, United Kingdom: Caister Academic Press.
- Galanis, E., Mak, S., Otterstatter, M., Taylor, M., Zubel, M., Takaro, T. K., . . . Michel, P. (2014). The association between campylobacteriosis, agriculture and drinking water: a case-case study in a region of British Columbia, Canada, 2005-2009. *Epidemiol Infect*, 142(10), 2075-2084. doi: 10.1017/s095026881400123x
- Gallay, A., Bousquet, V., Siret, V., Prouzet-Mauleon, V., Valk, H., Vaillant, V., . . . Desenclos, J. C. (2008). Risk factors for acquiring sporadic *Campylobacter* infection in France: results from a national case-control study. *J Infect Dis*, 197(10), 1477-1484. doi: 10.1086/587644
- Garenaux, A., Jugiau, F., Rama, F., de Jonge, R., Denis, M., Federighi, M., & Ritz, M. (2008). Survival of *Campylobacter jejuni* strains from different origins under oxidative stress conditions: effect of temperature. *Curr Microbiol*, 56(4), 293-297. doi: 10.1007/s00284-007-9082-8
- Garénaux, A., Luchetti-Miganeh, C., & Ermel, G. (2008). *Better Understanding of the Campylobacter Conundrum*. Nova Science Publishers.
- Gaynor, E. C., Wells, D. H., MacKichan, J. K., & Falkow, S. (2005). The *Campylobacter jejuni* stringent response controls specific stress survival and virulence-associated phenotypes. *Mol Microbiol*, 56(1), 8-27. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04525.x
- Giacomelli, M., & Piccirillo, A. (2014). Pet reptiles as potential reservoir of *Campylobacter* species with zoonotic potential. *Vet Rec*, 174(19), 479. doi: 10.1136/vr.102243
- Gilbert, M., Brisson, J. R., Karwaski, M. F., Michniewicz, J., Cunningham, A. M., Wu, Y., . . . Wakarchuk, W. W. (2000). Biosynthesis of ganglioside mimics in *Campylobacter jejuni* OH4384. Identification of the glycosyltransferase genes, enzymatic synthesis of model compounds, and characterization of nanomole amounts by 600-mhz (1)h and (13)c NMR analysis. *J Biol Chem*, 275(6), 3896-3906.

- Gilbert, M., Godschalk, P. C., Karwaski, M. F., Ang, C. W., van Belkum, A., Li, J., . . . Endtz, H. P. (2004). Evidence for acquisition of the lipooligosaccharide biosynthesis locus in *Campylobacter jejuni* GB11, a strain isolated from a patient with Guillain-Barre syndrome, by horizontal exchange. *Infect Immun*, *72*(2), 1162-1165.
- Gillespie, I. A., O'Brien S, J., Frost, J. A., Tam, C., Tompkins, D., Neal, K. R., . . . Farthing, M. J. (2006). Investigating vomiting and/or bloody diarrhoea in *Campylobacter jejuni* infection. *J Med Microbiol*, *55*(Pt 6), 741-746. doi: 10.1099/jmm.0.46422-0
- Gilpin, B., Cornelius, A., Robson, B., Boxall, N., Ferguson, A., Nicol, C., & Henderson, T. (2006). Application of pulsed-field gel electrophoresis to identify potential outbreaks of campylobacteriosis in New Zealand. *J Clin Microbiol*, *44*(2), 406-412. doi: 10.1128/jcm.44.2.406-412.2006
- Golden, N. J., & Acheson, D. W. (2002). Identification of motility and autoagglutination *Campylobacter jejuni* mutants by random transposon mutagenesis. *Infect Immun*, *70*(4), 1761-1771.
- Gonzalez, M., & Hanninen, M. L. (2012). Effect of temperature and antimicrobial resistance on survival of *Campylobacter jejuni* in well water: application of the Weibull model. *J Appl Microbiol*, *113*(2), 284-293. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05342.x
- Gonzalez, M., Paz Villanueva, M., Debruyne, L., Vandamme, P., & Fernandez, H. (2011). *Campylobacter insulaenigrae*: first isolation report from South American sea lion (*Otaria Flavescens*, (Shaw, 1800)). *Braz J Microbiol*, *42*(1), 261-265. doi: 10.1590/s1517-83822011000100033
- Gonzalez, R. A., & Noble, R. T. (2014). Comparisons of statistical models to predict fecal indicator bacteria concentrations enumerated by qPCR- and culture-based methods. *Water Res*, *48*, 296-305. doi: 10.1016/j.watres.2013.09.038
- Green, C. G., Krause, D. O., & Wylie, J. L. (2006). Spatial analysis of *Campylobacter* infection in the Canadian province of Manitoba. *Int J Health Geogr*, *5*, 2. doi: 10.1186/1476-072x-5-2
- Greig, J. D., & Ravel, A. (2009). Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. *Int J Food Microbiol*, *130*(2), 77-87. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.031

- Gu, G., Luo, Z., Cevallos-Cevallos, J. M., Adams, P., Vellidis, G., Wright, A., & van Bruggen, A. H. (2013). Occurrence and population density of *Campylobacter jejuni* in irrigation ponds on produce farms in the Suwannee River Watershed. *Can J Microbiol*, 59(5), 339-346. doi: 10.1139/cjm-2013-0027
- Gubbels, S. M., Kuhn, K. G., Larsson, J. T., Adelhardt, M., Engberg, J., Ingildsen, P., . . . Ethelberg, S. (2012). A waterborne outbreak with a single clone of *Campylobacter jejuni* in the Danish town of Koge in May 2010. *Scand J Infect Dis*, 44(8), 586-594. doi: 10.3109/00365548.2012.655773
- Guevremont, E., Higgins, R., & Quessy, S. (2004). Characterization of *Campylobacter* isolates recovered from clinically healthy pigs and from sporadic cases of campylobacteriosis in humans. *J Food Prot*, 67(2), 228-234.
- Guevremont, E., Lamoureux, L., Loubier, C. B., Villeneuve, S., & Dubuc, J. (2014). Detection and characterization of *Campylobacter* spp. from 40 dairy cattle herds in Quebec, Canada. *Foodborne Pathog Dis*, 11(5), 388-394. doi: 10.1089/fpd.2013.1706
- Gundogdu, O., Bentley, S. D., Holden, M. T., Parkhill, J., Dorrell, N., & Wren, B. W. (2007). Re-annotation and re-analysis of the *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 genome sequence. *BMC Genomics*, 8, 162. doi: 10.1186/1471-2164-8-162
- Gurtler, M., Alter, T., Kasimir, S., & Fehllhaber, K. (2005). The importance of *Campylobacter coli* in human campylobacteriosis: prevalence and genetic characterization. *Epidemiol Infect*, 133(6), 1081-1087. doi: 10.1017/s0950268805004164
- Hahn, M. W., & Hofle, M. G. (2001). Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiol Ecol*, 35(2), 113-121.
- Hakkinen, M., Nakari, U. M., & Siitonen, A. (2009). Chickens and cattle as sources of sporadic domestically acquired *Campylobacter jejuni* infections in Finland. *Appl Environ Microbiol*, 75(16), 5244-5249. doi: 10.1128/aem.00374-09
- Hald, B., Skovgard, H., Bang, D. D., Pedersen, K., Dybdahl, J., Jespersen, J. B., & Madsen, M. (2004). Flies and *Campylobacter* infection of broiler flocks. *Emerg Infect Dis*, 10(8), 1490-1492. doi: 10.3201/eid1008.040129

- Hald, B., Sommer, H. M., & Skovgard, H. (2007). Use of fly screens to reduce *Campylobacter* spp. introduction in broiler houses. *Emerg Infect Dis*, 13(12), 1951-1953. doi: 10.3201/eid1312.070488
- Haley, C. E., Gunn, R. A., Hughes, J. M., Lippy, E. C., & Craun, G. F. (1980). From the Center for Disease Control. Outbreaks of waterborne diseases in the United States, 1978. *J Infect Dis*, 141(6), 794-797.
- Hamer, R., Chen, P. Y., Armitage, J. P., Reinert, G., & Deane, C. M. (2010). Deciphering chemotaxis pathways using cross species comparisons. *BMC Systems Biology*, 4(3).
- Han, K., Jang, S. S., Choo, E., Heu, S., & Ryu, S. (2007). Prevalence, genetic diversity, and antibiotic resistance patterns of *Campylobacter jejuni* from retail raw chickens in Korea. *Int J Food Microbiol*, 114(1), 50-59. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.042
- Hanninen, M. L., Hakkinen, M., & Rautelin, H. (1999). Stability of related human and chicken *Campylobacter jejuni* genotypes after passage through chick intestine studied by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, 65(5), 2272-2275.
- Hannon, S. J., Taboada, E. N., Russell, M. L., Allan, B., Waldner, C., Wilson, H. L., . . . Townsend, H. G. (2009). Genomics-based molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolates from feedlot cattle and from people in Alberta, Canada. *J Clin Microbiol*, 47(2), 410-420. doi: 10.1128/jcm.01432-08
- Hansson, I., Nyman, A., Lahti, E., Gustafsson, P., & Olsson Engvall, E. (2015). Associations between *Campylobacter* levels on chicken skin, underlying muscle, caecum and packaged fillets. *Food Microbiol*, 48, 178-181. doi: 10.1016/j.fm.2014.12.013
- Harder-Lauridsen, N. M., Kuhn, K. G., Erichsen, A. C., Molbak, K., & Ethelberg, S. (2013). Gastrointestinal illness among triathletes swimming in non-polluted versus polluted seawater affected by heavy rainfall, Denmark, 2010-2011. *PLoS One*, 8(11), e78371. doi: 10.1371/journal.pone.0078371
- Hedberg, C. W., Smith, K. E., Besser, J. M., Boxrud, D. J., Hennessy, T. W., Bender, J. B., . . . Osterholm, M. T. (2001). Limitations of pulsed-field gel electrophoresis for the routine surveillance of *Campylobacter* infections. *J Infect Dis*, 184(2), 242-244. doi: 10.1086/322005

- Hellard, M. E., Sinclair, M. I., Hogg, G. G., & Fairley, C. K. (2000). Prevalence of enteric pathogens among community based asymptomatic individuals. *J Gastroenterol Hepatol*, *15*(3), 290-293.
- Hellein, K. N., Battie, C., Tauchman, E., Lund, D., Oyarzabal, O. A., & Lepo, J. E. (2011). Culture-based indicators of fecal contamination and molecular microbial indicators rarely correlate with *Campylobacter* spp. in recreational waters. *J Water Health*, *9*(4), 695-707. doi: 10.2166/wh.2011.154
- Hendrixson, D. R. (2006). A phase-variable mechanism controlling the *Campylobacter jejuni* FlgR response regulator influences commensalism. *Mol Microbiol*, *61*(6), 1646-1659. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05336.x
- Hendrixson, D. R. (2008). Restoration of flagellar biosynthesis by varied mutational events in *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol*, *70*(2), 519-536. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06428.x
- Hendrixson, D. R., & DiRita, V. J. (2004). Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. *Mol Microbiol*, *52*(2), 471-484. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.03988.x
- Hennessy, T. W., Marcus, R., Deneen, V., Reddy, S., Vugia, D., Townes, J., . . . Angulo, F. J. (2004). Survey of physician diagnostic practices for patients with acute diarrhea: clinical and public health implications. *Clin Infect Dis*, *38 Suppl 3*, S203-211. doi: 10.1086/381588
- Henry, R., Schang, C., Chandrasena, G. I., Deletic, A., Edmunds, M., Jovanovic, D., . . . McCarthy, D. (2015). Environmental monitoring of waterborne *Campylobacter*: evaluation of the Australian standard and a hybrid extraction-free MPN-PCR method. *Front Microbiol*, *6*, 74. doi: 10.3389/fmicb.2015.00074
- Hermans, D., Van Deun, K., Martel, A., Immerseel, F., Messens, W., Heyndrickx, M., . . . Pasmans, F. (2011). Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. *Vet Res*, *42*(82).
- Hernandez, J., Alonso, J. L., Fayos, A., Amoros, I., & Owen, R. J. (1995). Development of a PCR assay combined with a short enrichment culture for detection of *Campylobacter jejuni* in estuarine surface waters. *FEMS Microbiol Lett*, *127*(3), 201-206.

- Hiett, K. L., Stern, N. J., Fedorka-Cray, P., Cox, N. A., & Seal, B. S. (2007). Molecular phylogeny of the *flaA* short variable region among *Campylobacter jejuni* isolates collected during an annual evaluation of poultry flocks in the Southeastern United States. *Foodborne Pathog Dis*, 4(3), 339-347. doi: 10.1089/fpd.2007.0008
- Hijnen, W. A., Beerendonk, E. F., & Medema, G. J. (2006). Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water Res*, 40(1), 3-22.
- Hill, G. A., & Grimes, D. J. (1984). Seasonal study of a freshwater lake and migratory waterfowl for *Campylobacter jejuni*. *Can J Microbiol*, 30(6), 845-849.
- Hill, J. E., Paccagnella, A., Law, K., Melito, P. L., Woodward, D. L., Price, L., . . . Goh, S. H. (2006). Identification of *Campylobacter* spp. and discrimination from *Helicobacter* and *Arcobacter* spp. by direct sequencing of PCR-amplified *cpn60* sequences and comparison to *cpnDB*, a chaperonin reference sequence database. *J Med Microbiol*, 55(Pt 4), 393-399. doi: 10.1099/jmm.0.46282-0
- Hofreuter, D., Tsai, J., Watson, R. O., Novik, V., Altman, B., Benitez, M., . . . Galan, J. E. (2006). Unique features of a highly pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. *Infect Immun*, 74(8), 4694-4707. doi: 10.1128/iai.00210-06
- Hokajarvi, A. M., Pitkanen, T., Siljanen, H. M., Nakari, U. M., Torvinen, E., Siitonen, A., & Miettinen, I. T. (2013). Occurrence of thermotolerant *Campylobacter* spp. and adenoviruses in Finnish bathing waters and purified sewage effluents. *J Water Health*, 11(1), 120-134. doi: 10.2166/wh.2012.192
- Holvoet, K., Sampers, I., Seynaeve, M., Jacxsens, L., & Uyttendaele, M. (2015). Agricultural and management practices and bacterial contamination in greenhouse versus open field lettuce production. *Int J Environ Res Public Health*, 12(1), 32-63. doi: 10.3390/ijerph120100032
- Hou, Y., Zhang, H., Miranda, L., & Lin, S. (2010). Serious overestimation in quantitative PCR by circular (supercoiled) plasmid standard : microalgal *pcna* as the model gene. *PLoS One*, 5(3), e9545. doi : 10.1371/journal.pone.0009545
- Hu, T. L., & Kuo, P. C. (2011). Isolation of *Campylobacter* spp. in surface waters of Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*, 44(1), 15-20. doi: 10.1016/j.jmii.2011.01.004

- Hudson, J. A., Nicol, C., Wright, J., Whyte, R., & Hasell, S. K. (1999). Seasonal variation of *Campylobacter* types from human cases, veterinary cases, raw chicken, milk and water. *J Appl Microbiol*, 87(1), 115-124.
- Huggett, J. F., Foy, C. A., Benes, V., Emslie, K., Garson, J. A., Haynes, R., . . . Bustin, S. A. (2013). The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clin Chem*, 59(6), 892-902. doi : 10.1373/clinchem.2013.206375
- Humphrey, T. J., & Cruickshank, J. G. (1985). Antibiotic and deoxycholate resistance in *Campylobacter jejuni* following freezing or heating. *J Appl Bacteriol*, 59(1), 65-71.
- Hunt, A. P., & Parry, J. D. (1998). The effect of substratum roughness and river flow rate on the development of a freshwater biofilm community. *Biofouling*, 12(4), 287-303. doi: 10.1080/08927019809378361
- Hutchinson, D. N., & Bolton, F. J. (1983). Is enrichment culture necessary for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faeces? *J Clin Pathol*, 36(12), 1350-1352.
- Huws, S. A., McBain, A. J., & Gilbert, P. (2005). Protozoan grazing and its impact upon population dynamics in biofilm communities. *J Appl Microbiol*, 98(1), 238-244. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02449.x
- Inglis, G. D., & Kalischuk, L. D. (2004). Direct quantification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter lanienae* in feces of cattle by real-time quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol*, 70(4), 2296-2306.
- Inglis, G. D., McAllister, T. A., Larney, F. J., & Topp, E. (2010). Prolonged survival of *Campylobacter* species in bovine manure compost. *Appl Environ Microbiol*, 76(4), 1110-1119. doi: 10.1128/aem.01902-09
- Itoh, I., Saito, K., Yanagawa, Y., Sakai, S., & Ohashi, M. (1981). *Campylobacter* enteritis in Tokyo. Dans D. G. Newell (dir.), *Campylobacter: Epidemiology, pathogenesis and Biochemistry*. (p. 5-12). Lancaster, England: MTP Press Limited.
- Jacobs-Reitsma, W., Lyhs, U., & Wagenaar, J. (2008). *Campylobacter* in food supply. Dans I. Nachamkin, C. M. Szymanski & M. J. Blaser (dir.), *Campylobacter*. Washington, D. C.: American Society for Microbiology.

- Jensen, A. N., Andersen, M. T., Dalsgaard, A., Baggesen, D. L., & Nielsen, E. M. (2005). Development of real-time PCR and hybridization methods for detection and identification of thermophilic *Campylobacter* spp. in pig faecal samples. *J Appl Microbiol*, 99(2), 292-300. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02616.x
- Jin, S., Joe, A., Lynett, J., Hani, E. K., Sherman, P., & Chan, V. L. (2001). JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Mol Microbiol*, 39(5), 1225-1236.
- Jokinen, C. C., Koot, J. M., Carrillo, C. D., Gannon, V. P., Jardine, C. M., Mutschall, S. K., . . . Taboada, E. N. (2012). An enhanced technique combining pre-enrichment and passive filtration increases the isolation efficiency of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from water and animal fecal samples. *J Microbiol Methods*, 91(3), 506-513. doi: 10.1016/j.mimet.2012.09.005
- Jokinen, C. C., Schreier, H., Mauro, W., Taboada, E., Isaac-Renton, J. L., Topp, E., . . . Gannon, V. P. (2010). The occurrence and sources of *Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 in the Salmon River, British Columbia, Canada. *J Water Health*, 8(2), 374-386. doi: 10.2166/wh.2009.076
- Jones, M. A., Marston, K. L., Woodall, C. A., Maskell, D. J., Linton, D., Karlyshev, A. V., . . . Barrow, P. A. (2004). Adaptation of *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 to high-level colonization of the avian gastrointestinal tract. *Infect Immun*, 72(7), 3769-3776. doi: 10.1128/iai.72.7.3769-3776.2004
- Jore, S., Viljugrein, H., Brun, E., Heier, B. T., Borck, B., Ethelberg, S., . . . Hofshagen, M. (2010). Trends in *Campylobacter* incidence in broilers and humans in six European countries, 1997-2007. *Prev Vet Med*, 93(1), 33-41. doi: 10.1016/j.prevetmed.2009.09.015
- Josefsen, M. H., Cook, N., D'Agostino, M., Hansen, F., Wagner, M., Demnerova, K., . . . Hoorfar, J. (2004). Validation of a PCR-based method for detection of food-borne thermotolerant *Campylobacter* in a multicenter collaborative trial. *Appl Environ Microbiol*, 70(7), 4379-4383. doi: 10.1128/aem.70.7.4379-4383.2004
- Josefsen, M. H., Lofstrom, C., Hansen, T. B., Christensen, L. S., Olsen, J. E., & Hoorfar, J. (2010). Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses,

- using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. *Appl Environ Microbiol*, 76(15), 5097-5104. doi: 10.1128/aem.00411-10
- Kale, A., Phansopa, C., Suwannachart, C., Craven, C. J., Rafferty, J. B., & Kelly, D. J. (2011). The virulence factor *PEB4* (Cj0596) and the periplasmic protein Cj1289 are two structurally related *SurA*-like chaperones in the human pathogen *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem*, 286(24), 21254-21265. doi: 10.1074/jbc.M111.220442
- Kapperud, G., & Aasen, S. (1992). Descriptive epidemiology of infections due to thermotolerant *Campylobacter* spp. in Norway, 1979-1988. *APMIS*, 100(10), 883-890.
- Kapperud, G., Espeland, G., Wahl, E., Walde, A., Herikstad, H., Gustavsen, S., . . . Digranes, A. (2003). Factors associated with increased and decreased risk of *Campylobacter* infection: a prospective case-control study in Norway. *Am J Epidemiol*, 158(3), 234-242.
- Karenlampi, R., Rautelin, H., Schonberg-Norio, D., Paulin, L., & Hanninen, M. L. (2007). Longitudinal study of Finnish *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates from humans, using multilocus sequence typing, including comparison with epidemiological data and isolates from poultry and cattle. *Appl Environ Microbiol*, 73(1), 148-155. doi: 10.1128/aem.01488-06
- Karlen, Y., McNair, A., Perseguers, S., Mazza, C., & Mermod, N. (2007). Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics*, 8, 131. doi: 10.1186/1471-2105-8-131
- Karlyshev, A. V., Everest, P., Linton, D., Cawthraw, S., Newell, D. G., & Wren, B. W. (2004). The *Campylobacter jejuni* general glycosylation system is important for attachment to human epithelial cells and in the colonization of chicks. *Microbiology*, 150(Pt 6), 1957-1964. doi: 10.1099/mic.0.26721-0
- Kashoma, I. P., Kumar, A., Sanad, Y. M., Gebreyes, W., Kazwala, R. R., Garabed, R., & Rajashekara, G. (2014). Phenotypic and genotypic diversity of thermophilic *Campylobacter* spp. in commercial turkey flocks: a longitudinal study. *Foodborne Pathog Dis*, 11(11), 850-860. doi: 10.1089/fpd.2014.1794

- Keithlin, J., Sargeant, J., Thomas, M. K., & Fazil, A. (2014). Systematic review and meta-analysis of the proportion of *Campylobacter* cases that develop chronic sequelae. *BMC Public Health*, *14*(1), 1203. doi: 10.1186/1471-2458-14-1203
- Keller, J. I., & Shriver, W. G. (2014). Prevalence of three *Campylobacter* species, *C. jejuni*, *C. coli*, and *C. lari*, using multilocus sequence typing in wild birds of the mid-atlantic region, USA. *J Wildl Dis*, *50*(1), 31-41. doi: 10.7589/2013-06-136
- Ketley, J. M. (1997). Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology*, *143* (Pt 1), 5-21.
- Khan, I. U., & Edge, T. A. (2007). Development of a novel triplex PCR assay for the detection and differentiation of thermophilic species of *Campylobacter* using 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) region. *J Appl Microbiol*, *103*(6), 2561-2569. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03511.x
- Khan, I. U., Gannon, V., Jokinen, C. C., Kent, R., Koning, W., Lapen, D. R., . . . Edge, T. A. (2014). A national investigation of the prevalence and diversity of thermophilic *Campylobacter* species in agricultural watersheds in Canada. *Water Res*, *61*, 243-252. doi: 10.1016/j.watres.2014.05.027
- Khan, I. U., Hill, S., Nowak, E., & Edge, T. A. (2013). Effect of incubation temperature on the detection of thermophilic *Campylobacter* species from freshwater beaches, nearby wastewater effluents, and bird fecal droppings. *Appl Environ Microbiol*, *79*(24), 7639-7645. doi: 10.1128/aem.02324-13
- Kienesberger, S., Sprenger, H., Wolfgruber, S., Halwachs, B., Thallinger, G. G., Perez-Perez, G. I., . . . Gorkiewicz, G. (2014). Comparative genome analysis of *Campylobacter fetus* subspecies revealed horizontally acquired genetic elements important for virulence and niche specificity. *PLoS One*, *9*(1), e85491. doi: 10.1371/journal.pone.0085491
- Kirk, K. F., Nielsen, H. L., & Nielsen, H. (2015). The susceptibility of *Campylobacter concisus* to the bactericidal effects of normal human serum. *APMIS*, *123*(3), 269-274. doi: 10.1111/apm.12346
- Kist, M. (1981). *Campylobacter* enteritis: epidemiological and clinical data from recent isolations in the regions of Freiburg, West Germany. Dans D. G. Newell (éd.),

Campylobacter: Epidemiology, pathogenesis and Biochemistry. (p. 138-143).
Lancaster, England: MTP Press Limited.

- Klena, J. D., Parker, C. T., Knibb, K., Ibbitt, J. C., Devane, P. M., Horn, S. T., . . . Konkel, M. E. (2004). Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a multiplex PCR developed from the nucleotide sequence of the lipid A gene *lpxA*. *J Clin Microbiol*, 42(12), 5549-5557. doi: 10.1128/jcm.42.12.5549-5557.2004
- Koenraad, P. M., Ayling, R., Hazeleger, W. C., Rombouts, F. M., & Newell, D. G. (1995). The speciation and subtyping of *Campylobacter* isolates from sewage plants and waste water from a connected poultry abattoir using molecular techniques. *Epidemiol Infect*, 115(3), 485-494.
- Koenraad, P. M. F. J., Hazeleger, W. C., van der Laan, T., Beumer, R. R., & Rombouts, F. M. (1994). Survey of *Campylobacter* spp. in sewage plants in The Netherlands. *Food Microbiology*, 11(1), 65-73. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/fmic.1994.1009>
- Kohler, R., Krause, G., Beutin, L., Stephan, R., & Zweifel, C. (2008). Shedding of food-borne pathogens and microbiological carcass contamination in rabbits at slaughter. *Vet Microbiol*, 132(1-2), 149-157. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.04.020
- Konkel, M. E., Garvis, S. G., Tipton, S. L., Anderson, D. E., Jr., & Cieplak, W., Jr. (1997). Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (*CadF*) from *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol*, 24(5), 953-963.
- Konkel, M. E., Kim, B. J., Klena, J. D., Young, C. R., & Ziprin, R. (1998). Characterization of the thermal stress response of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun*, 66(8), 3666-3672.
- Konkel, M. E., Klena, J. D., Rivera-Amill, V., Monteville, M. R., Biswas, D., Raphael, B., & Mickelson, J. (2004). Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *J Bacteriol*, 186(11), 3296-3303. doi: 10.1128/jb.186.11.3296-3303.2004
- Kotloff, K. L., Nataro, J. P., Blackwelder, W. C., Nasrin, D., Farag, T. H., Panchalingam, S., . . . Levine, M. M. (2013). Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS):

- a prospective, case-control study. *Lancet*, 382(9888), 209-222. doi: 10.1016/s0140-6736(13)60844-2
- Kovats, R. S., Edwards, S. J., Charron, D., Cowden, J., D'Souza, R. M., Ebi, K. L., . . . Schmid, H. (2005). Climate variability and *Campylobacter* infection: an international study. *Int J Biometeorol*, 49(4), 207-214. doi: 10.1007/s00484-004-0241-3
- Kruczkiewicz, P., Mutschall, S., Barker, D., Thomas, J., Carrillo, C. D., Van Domselaar, G., . . . Taboada, E. N. (2013). *MIST: a tool for rapid in silico generation of molecular typing data from bacterial genome sequences*. Communication présentée à Bioinformatics 2013, Barcelona, Spain.
- Kweon, O. J., Lim, Y. K., Yoo, B., Kim, H. R., Kim, T. H., & Lee, M. K. (2015). The first case report of *Campylobacter volucris* bacteremia in an immunocompromised patient. *J Clin Microbiol*. doi: 10.1128/jcm.00442-15
- Laine, J., Huovinen, E., Virtanen, M. J., Snellman, M., Lumio, J., Ruutu, P., . . . Kuusi, M. (2011). An extensive gastroenteritis outbreak after drinking-water contamination by sewage effluent, Finland. *Epidemiol Infect*, 139(7), 1105-1113. doi: 10.1017/s0950268810002141
- Leblanc-Maridor, M., Garenaux, A., Beaudeau, F., Chidaine, B., Seegers, H., Denis, M., & Belloc, C. (2011). Quantification of *Campylobacter* spp. in pig feces by direct real-time PCR with an internal control of extraction and amplification. *J Microbiol Methods*, 85(1), 53-61. doi: 10.1016/j.mimet.2011.01.013
- Lee, K., Iwata, T., Nakadai, A., Kato, T., Hayama, S., Taniguchi, T., & Hayashidani, H. (2011). Prevalence of *Salmonella*, *Yersinia* and *Campylobacter* spp. in feral raccoons (*Procyon lotor*) and masked palm civets (*Paguma larvata*) in Japan. *Zoonoses Public Health*, 58(6), 424-431. doi: 10.1111/j.1863-2378.2010.01384.x
- Lee, M. D., & Newell, D. G. (2006). *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. *Avian Dis*, 50(1), 1-9.
- Lehtola, M. J., Pitkanen, T., Miebach, L., & Miettinen, I. T. (2006). Survival of *Campylobacter jejuni* in potable water biofilms: a comparative study with different detection methods. *Water Sci Technol*, 54(3), 57-61.

- Lemmon, G. H., & Gardner, S. N. (2008). Predicting the sensitivity and specificity of published real-time PCR assays. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 7, 18. doi: 10.1186/1476-0711-7-18
- Leo, Q. J., & Bolger, D. T., Jr. (2014). Septic cavernous sinus thrombosis due to *Campylobacter rectus* infection. *BMJ Case Rep*, 2014. doi: 10.1136/bcr-2013-203351
- Leonard, E. E., 2nd, Takata, T., Blaser, M. J., Falkow, S., Tompkins, L. S., & Gaynor, E. C. (2003). Use of an open-reading frame-specific *Campylobacter jejuni* DNA microarray as a new genotyping tool for studying epidemiologically related isolates. *J Infect Dis*, 187(4), 691-694. doi: 10.1086/368268
- Leonard, E. K., Pearl, D. L., Janecko, N., Weese, J. S., Reid-Smith, R. J., Peregrine, A. S., & Finley, R. L. (2011). Factors related to *Campylobacter* spp. carriage in client-owned dogs visiting veterinary clinics in a region of Ontario, Canada. *Epidemiol Infect*, 139(10), 1531-1541. doi: 10.1017/s0950268810002906
- Lertsethtakarn, P., Ottemann, K. M., & Hendrixson, D. R. (2011). Motility and chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annu Rev Microbiol*, 65, 389-410. doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102908
- Levallois, P., Chevalier, P., Gingras, S., Dery, P., Payment, P., Michel, P., & Rodriguez, M. (2014). Risk of infectious gastroenteritis in young children living in Quebec rural areas with intensive animal farming: results of a case-control study (2004-2007). *Zoonoses Public Health*, 61(1), 28-38. doi: 10.1111/zph.12039
- Levesque, S., Fournier, E., Carrier, N., Frost, E., Arbeit, R. D., & Michaud, S. (2013). Campylobacteriosis in urban versus rural areas: A case-case study integrated with molecular typing to validate risk factors and to attribute sources of infection. *PLoS One*, 8(12), e83731. doi: 10.1371/journal.pone.0083731
- Levesque, S., Frost, E., Arbeit, R. D., & Michaud, S. (2008). Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* isolates from humans, chickens, raw milk, and environmental water in Quebec, Canada. *J Clin Microbiol*, 46(10), 3404-3411. doi: 10.1128/jcm.00042-08
- Levesque, S., St-Pierre, K., Frost, E., Arbeit, R. D., & Michaud, S. (2011). Determination of the optimal culture conditions for detecting thermophilic *Campylobacter* in

- environmental water. *J Microbiol Methods*, 86(1), 82-88. doi: 10.1016/j.mimet.2011.04.001
- Levy, A. J. (1946). A gastro-enteritis outbreak probably due to a bovine strain of vibrio. *Yale J Biol Med*, 18, 243-258.
- Lewis, S. J., Velasquez, A., Cuppett, S. L., & McKee, S. R. (2002). Effect of electron beam irradiation on poultry meat safety and quality. *Poult Sci*, 81(6), 896-903.
- Lillehaug, A., Monceyron Jonassen, C., Bergsjø, B., Hofshagen, M., Tharaldsen, J., Nesse, L. L., & Handeland, K. (2005). Screening of feral pigeon (*Columba livia*), mallard (*Anas platyrhynchos*) and graylag goose (*Anser anser*) populations for *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., avian influenza virus and avian paramyxovirus. *Acta Vet Scand*, 46(4), 193-202.
- Lin, J., Michel, L. O., & Zhang, Q. (2002). CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(7), 2124-2131.
- Linscott, A. J., Flamholtz, R. B., Shukla, D., Song, Y., Liu, C., & Finegold, S. M. (2005). Fatal septicemia due to *Clostridium hathewayi* and *Campylobacter hominis*. *Anaerobe*, 11(1-2), 97-98. doi: 10.1016/j.anaerobe.2004.10.002
- Linton, D., Karlyshev, A. V., Hitchen, P. G., Morris, H. R., Dell, A., Gregson, N. A., & Wren, B. W. (2000). Multiple N-acetyl neuraminic acid synthetase (*neuB*) genes in *Campylobacter jejuni*: identification and characterization of the gene involved in sialylation of lipo-oligosaccharide. *Mol Microbiol*, 35(5), 1120-1134.
- Liu, J., Gratz, J., Maro, A., Kumburu, H., Kibiki, G., Taniuchi, M., . . . Houpt, E. R. (2012). Simultaneous detection of six diarrhea-causing bacterial pathogens with an in-house PCR-luminex assay. *J Clin Microbiol*, 50(1), 98-103. doi: 10.1128/jcm.05416-11
- Liu, J., Kabir, F., Manneh, J., Lertsethtakarn, P., Begum, S., Gratz, J., . . . Houpt, E. R. (2014). Development and assessment of molecular diagnostic tests for 15 enteropathogens causing childhood diarrhoea: a multicentre study. *Lancet Infect Dis*, 14(8), 716-724. doi: 10.1016/s1473-3099(14)70808-4
- Lo, Y. M., Lun, F. M., Chan, K. C., Tsui, N. B., Chong, K. C., Lau, T. K., . . . Chiu, R. W. (2007). Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(32), 13116-13121. doi: 10.1073/pnas.0705765104

- Loesche, W. J., & Gibbons, R. J. (1965). A practical scheme for identification of the most numerous oral gram negative anaerobic rods. *Arch Oral Biol*, 10(4), 723-725.
- Louis, V. R., Gillespie, I. A., O'Brien, S. J., Russek-Cohen, E., Pearson, A. D., & Colwell, R. R. (2005). Temperature-driven *Campylobacter* seasonality in England and Wales. *Appl Environ Microbiol*, 71(1), 85-92. doi: 10.1128/aem.71.1.85-92.2005
- Lund, M., Nordentoft, S., Pedersen, K., & Madsen, M. (2004). Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 42(11), 5125-5132. doi: 10.1128/jcm.42.11.5125-5132.2004
- Lysyk, T. J., & Axtell, R. C. (1986). Movement and distribution of house flies (*Diptera muscidae*) between habitats in two livestock farms. *J Econ Entomol*, 79(4), 993-998.
- Maal-Bared, R., Bartlett, K. H., Bowie, W. R., & Hall, E. R. (2012). *Campylobacter* spp. distribution in biofilms on different surfaces in an agricultural watershed (Elk Creek, British Columbia): using biofilms to monitor for *Campylobacter*. *Int J Hyg Environ Health*, 215(3), 270-278. doi: 10.1016/j.ijheh.2011.12.004
- Madden, R. H., Moran, L., & Scates, P. (2000). Optimising recovery of *Campylobacter* spp. from the lower porcine gastrointestinal tract. *J Microbiol Methods*, 42(2), 115-119.
- Mal-ED. (2014). The MAL-ED study: a multinational and multidisciplinary approach to understand the relationship between enteric pathogens, malnutrition, gut physiology, physical growth, cognitive development, and immune responses in infants and children up to 2 years of age in resource-poor environments. *Clin Infect Dis*, 59 Suppl 4, S193-206. doi: 10.1093/cid/ciu653
- Man, S. M. (2011). The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 8(12), 669-685. doi: 10.1038/nrgastro.2011.191
- Mangen, M. J., Plass, D., Havelaar, A. H., Gibbons, C. L., Cassini, A., Muhlberger, N., . . . Kretzschmar, M. E. (2013). The pathogen- and incidence-based DALY approach: an appropriate [corrected] methodology for estimating the burden of infectious diseases. *PLoS One*, 8(11), e79740. doi: 10.1371/journal.pone.0079740
- Marchant, J., Wren, B., & Ketley, J. (2002). Exploiting genome sequence: predictions for mechanisms of *Campylobacter* chemotaxis. *Trends Microbiol*, 10(4), 155-159.

- Marotta, F., Zilli, K., Tonelli, A., Sacchini, L., Alessiani, A., Migliorati, G., & Di Giannatale, E. (2013). Detection and genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by use of DNA oligonucleotide arrays. *Mol Biotechnol*, 53(2), 182-188. doi: 10.1007/s12033-012-9512-0
- McFadyean, J., & Stockman, S. (1913). Report of the Departemental Committee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to inquire into epizootic abortion. Part III. Abortion in sheep. Dans Her Majesty's Stationery Office (éd.). London.
- Medema, G. J., Teunis, P. F., Havelaar, A. H., & Haas, C. N. (1996). Assessment of the dose-response relationship of *Campylobacter jejuni*. *Int J Food Microbiol*, 30(1-2), 101-111.
- Meinersmann, R. J., Helsel, L. O., Fields, P. I., & Hiett, K. L. (1997). Discrimination of *Campylobacter jejuni* isolates by *fla* gene sequencing. *J Clin Microbiol*, 35(11), 2810-2814.
- Melero, B., Cocolin, L., Rantsiou, K., Jaime, I., & Rovira, J. (2011). Comparison between conventional and qPCR methods for enumerating *Campylobacter jejuni* in a poultry processing plant. *Food Microbiol*, 28(7), 1353-1358. doi: 10.1016/j.fm.2011.06.006
- Melero, B., Juntunen, P., Hanninen, M. L., Jaime, I., & Rovira, J. (2012). Tracing *Campylobacter jejuni* strains along the poultry meat production chain from farm to retail by pulsed-field gel electrophoresis, and the antimicrobial resistance of isolates. *Food Microbiol*, 32(1), 124-128. doi: 10.1016/j.fm.2012.04.020
- Merchant-Patel, S., Blackall, P. J., Templeton, J., Price, E. P., Tong, S. Y., Huygens, F., & Giffard, P. M. (2010). *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genotyping by high-resolution melting analysis of a *flaA* fragment. *Appl Environ Microbiol*, 76(2), 493-499. doi: 10.1128/aem.01164-09
- Merino, F. J., Agulla, A., Villasante, P. A., Diaz, A., Saz, J. V., & Velasco, A. C. (1986). Comparative efficacy of seven selective media for isolating *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol*, 24(3), 451-452.
- Messelhauser, U., Tharigen, D., Fella, C., Schreiner, H., Busch, U. & Holler, C. (2005). Cultural detection of thermotolerant *Campylobacter* spp. in food – Potentials and limitations of diagnostic tools in the context of official food control. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 128(3-4), 117-121.

- Michaud, S., Menard, S., & Arbeit, R. D. (2005). Role of real-time molecular typing in the surveillance of *Campylobacter* enteritis and comparison of pulsed-field gel electrophoresis profiles from chicken and human isolates. *J Clin Microbiol*, 43(3), 1105-1111. doi: 10.1128/jcm.43.3.1105-1111.2005
- Mihaljevic, R. R., Sikic, M., Klancnik, A., Brumini, G., Mozina, S. S., & Abram, M. (2007). Environmental stress factors affecting survival and virulence of *Campylobacter jejuni*. *Microb Pathog*, 43(2-3), 120-125. doi: 10.1016/j.micpath.2007.03.004
- Miller, R. S., Miller, W. G., Behringer, M., Hariharan, H., Matthew, V., & Oyarzabal, O. A. (2010). DNA identification and characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from caecal samples of chickens in Grenada. *J Appl Microbiol*, 108(3), 1041-1049. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04507.x
- Miller, W. G., Chapman, M. H., Yee, E., On, S. L., McNulty, D. K., Lastovica, A. J., . . . Mandrell, R. E. (2012). Multilocus sequence typing methods for the emerging *Campylobacter* species *C. hyointestinalis*, *C. lanienae*, *C. sputorum*, *C. concisus*, and *C. curvus*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2, 45. doi: 10.3389/fcimb.2012.00045
- Miller, W. G., & Mandrell, R. E. (2005). Prevalence of *Campylobacter* in the food and water supply: incidence, outbreaks, isolation and detection. Dans J. M. Ketley & M. E. Konkel (dir.), *Campylobacter. Molecular and cellular biology*. (p. 101-163). Norfolk, UK: Horizon Bioscience.
- Min, T., Vedadi, M., Watson, D. C., Wasney, G. A., Munger, C., Cygler, M., . . . Young, N. M. (2009). Specificity of *Campylobacter jejuni* adhesin *PEB3* for phosphates and structural differences among its ligand complexes. *Biochemistry*, 48(14), 3057-3067. doi: 10.1021/bi802195d
- Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques. (2014). Programme Environnement-Plages.: Ministère du Développement durable, Environnement et lutte contre les changements climatiques.
- Mohawk, K. L., Poly, F., Sahl, J. W., Rasko, D. A., & Guerry, P. (2014). High frequency, spontaneous *motA* mutations in *Campylobacter jejuni* strain 81-176. *PLoS One*, 9(2), e88043. doi: 10.1371/journal.pone.0088043

- Monira, S., Nakamura, S., Gotoh, K., Izutsu, K., Watanabe, H., Alam, N. H., . . . Alam, M. (2011). Gut microbiota of healthy and malnourished children in bangladesh. *Front Microbiol*, 2, 228. doi: 10.3389/fmicb.2011.00228
- Moore, J., Caldwell, P., & Millar, B. (2001). Molecular detection of *Campylobacter* spp. in drinking, recreational and environmental water supplies. *Int J Hyg Environ Health*, 204(2-3), 185-189. doi: 10.1078/1438-4639-00096
- Moore, J. E. (2001). An optimised recovery method for thermophilic *Campylobacter* from liver. *BMC Microbiol*, 1, 32.
- Moran, A. P. & Upton, M. E. (1986). A comparative study of the rod and coccoid forms of *Campylobacter jejuni* ATCC 29428. *J Appl Bacteriol*, 60, 103-110.
- Morant-Minana, M. C., & Elizalde, J. (2015). Microscale electrodes integrated on COP for real sample *Campylobacter* spp. detection. *Biosens Bioelectron*, 70, 491-497. doi: 10.1016/j.bios.2015.03.063
- Moreno, Y., Botella, S., Alonso, J. L., Ferrus, M. A., Hernandez, M., & Hernandez, J. (2003). Specific detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* strains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol*, 69(2), 1181-1186.
- Morishita, S., Fujiwara, H., Murota, H., Maeda, Y., Hara, A., & Horii, T. (2013). Bloodstream infection caused by *Campylobacter lari*. *J Infect Chemother*, 19(2), 333-337. doi: 10.1007/s10156-012-0471-y
- Muellner, P., Pleydell, E., Pirie, R., Baker, M. G., Campbell, D., Carter, P. E., & French, N. P. (2013). Molecular-based surveillance of campylobacteriosis in New Zealand - from source attribution to genomic epidemiology. *Euro Surveill*, 18(3).
- Mughini Gras, L., Smid, J. H., Wagenaar, J. A., de Boer, A. G., Havelaar, A. H., Friesema, I. H. M., . . . van Pelt, W. (2012). Risk factors for campylobacteriosis of chicken, ruminant, and environmental origin: a combined case-control and source attribution analysis. *PLoS ONE*, 7(8), e42599. doi: 10.1371/journal.pone.0042599
- Mughini Gras, L., Smid, J. H., Wagenaar, J. A., Koene, M. G., Havelaar, A. H., Friesema, I. H., . . . W, V. A. N. P. (2013). Increased risk for *Campylobacter jejuni* and *C. coli* infection of pet origin in dog owners and evidence for genetic association between

- strains causing infection in humans and their pets. *Epidemiol Infect*, 141(12), 2526-2535. doi: 10.1017/s0950268813000356
- Mullner, P., Spencer, S. E., Wilson, D. J., Jones, G., Noble, A. D., Midwinter, A. C., . . . French, N. P. (2009). Assigning the source of human campylobacteriosis in New Zealand: a comparative genetic and epidemiological approach. *Infect Genet Evol*, 9(6), 1311-1319. doi: 10.1016/j.meegid.2009.09.003
- Murphy, C., Carroll, C., & Jordan, K. N. (2006). Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *J Appl Microbiol*, 100(4), 623-632. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02903.x
- Murray, C. J., Vos, T., Lozano, R., Naghavi, M., Flaxman, A. D., Michaud, C., . . . Memish, Z. A. (2012). Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380(9859), 2197-2223. doi: 10.1016/s0140-6736(12)61689-4
- Nachamkin, I., Bohachick, K., & Patton, C. M. (1993). Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*, 31(6), 1531-1536.
- Nachamkin, I., Fischer, S. H., Yang, X. H., Benitez, O., & Cravioto, A. (1994). Immunoglobulin A antibodies directed against *Campylobacter jejuni* flagellin present in breast-milk. *Epidemiol Infect*, 112(2), 359-365.
- Nadeau, E., Messier, S., & Quessy, S. (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), 73-78.
- Nam, H. M., Srinivasan, V., Murinda, S. E., & Oliver, S. P. (2005). Detection of *Campylobacter jejuni* in dairy farm environmental samples using SYBR Green real-time polymerase chain reaction. *Foodborne Pathog Dis*, 2(2), 160-168. doi: 10.1089/fpd.2005.2.160
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castano, M. J., & Solera, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta*, 439, 231-250. doi: 10.1016/j.cca.2014.10.017

- Nayak, R., Stewart, T. M., & Nawaz, M. S. (2005). PCR identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by partial sequencing of virulence genes. *Mol Cell Probes*, 19(3), 187-193. doi: 10.1016/j.mcp.2004.11.005
- Neal, K. R., & Slack, R. C. (1997). Diabetes mellitus, anti-secretory drugs and other risk factors for *Campylobacter* gastro-enteritis in adults: a case-control study. *Epidemiol Infect*, 119(3), 307-311.
- Nelson, W., & Harris, B. (2011). Campylobacteriosis rates show age-related static bimodal and seasonality trends. *N Z Med J*, 124(1337), 33-39.
- Newell, D. G., Frost, J. A., Duim, B., Wagenaar, J. A., Madden, R. H., van der Plas, J., & On, S. L. W. (2000). *New developments in the subtyping of Campylobacter species*. (éd.). Washington, DC: American Society for Microbiology Press.
- Nocker, A., Cheung, C. Y., & Camper, A. K. (2006). Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods*, 67(2), 310-320. doi: 10.1016/j.mimet.2006.04.015
- Nogva, H. K., Bergh, A., Holck, A., & Rudi, K. (2000). Application of the 5'-nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol*, 66(9), 4029-4036.
- Novik, V., Hofreuter, D., & Galan, J. E. (2009). Characterization of a *Campylobacter jejuni* *VirK* protein homolog as a novel virulence determinant. *Infect Immun*, 77(12), 5428-5436. doi: 10.1128/iai.00528-09
- Obiri-Danso, K., Paul, N., & Jones, K. (2001). The effects of UVB and temperature on the survival of natural populations and pure cultures of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari* and urease-positive thermophilic campylobacters (UPTC) in surface waters. *J Appl Microbiol*, 90(2), 256-267.
- Ochman, H., Lawrence, J. G., & Groisman, E. A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405(6784), 299-304. doi: 10.1038/35012500
- Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol*, 43 Spec No, 93-100.

- Olofsson, J., Axelsson-Olsson, D., Brudin, L., Olsen, B., & Ellstrom, P. (2013). *Campylobacter jejuni* actively invades the amoeba *Acanthamoeba polyphaga* and survives within non digestive vacuoles. *PLoS One*, 8(11), e78873. doi: 10.1371/journal.pone.0078873
- Olson, C. K., Ethelberg, S., van Pelt, W., & Tauxe, R. V. (2008). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in industrialized nations. Dans I. Nachamkin, C. M. Szymanski & M. J. Blaser (éd.), *Campylobacter*. Washington, D. C.
- Olsvik, O., Wachsmuth, K., Morris, G., & Feeley, J. C. (1984). Genetic probing of *Campylobacter jejuni* for cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Lancet*, 1(8374), 449.
- Onori, M., Coltella, L., Mancinelli, L., Argentieri, M., Menichella, D., Villani, A., . . . Russo, C. (2014). Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of bacterial and viral enteropathogens in stool samples of paediatric patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 79(2), 149-154. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2014.02.004
- Opel, K. L., Chung, D., & McCord, B. R. (2010). A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *J Forensic Sci*, 55(1), 25-33. doi: 10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x
- Oster, R. J., Wijesinghe, R. U., Haack, S. K., Fogarty, L. R., Tucker, T. R., & Riley, S. C. (2014). Bacterial pathogen gene abundance and relation to recreational water quality at seven Great Lakes beaches. *Environ Sci Technol*, 48(24), 14148-14157. doi: 10.1021/es5038657
- Oyarzabal, O. A., Williams, A., Zhou, P., & Samadpour, M. (2013). Improved protocol for isolation of *Campylobacter* spp. from retail broiler meat and use of pulsed field gel electrophoresis for the typing of isolates. *J Microbiol Methods*, 95(1), 76-83. doi: 10.1016/j.mimet.2013.03.008
- Oyofe, B. A., & Rollins, D. M. (1993). Efficacy of filter types for detecting *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental water samples by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*, 59(12), 4090-4095.

- Pacha, R. E., Clark, G. W., & Williams, E. A. (1985). Occurrence of *Campylobacter jejuni* and *Giardia* species in muskrat (*Ondatra zibethica*). *Appl Environ Microbiol*, 50(1), 177-178.
- Pacha, R. E., Clark, G. W., Williams, E. A., Carter, A. M., Scheffellaier, J. J., & Debusschere, P. (1987). Small rodents and other mammals associated with mountain meadows as reservoirs of *Giardia* spp. and *Campylobacter* spp. *Appl Environ Microbiol*, 53(7), 1574-1579.
- Pacholewicz, E., Swart, A., Lipman, L. J., Wagenaar, J. A., Havelaar, A. H., & Duim, B. (2013). Propidium monoazide does not fully inhibit the detection of dead *Campylobacter* on broiler chicken carcasses by qPCR. *J Microbiol Methods*, 95(1), 32-38. doi: 10.1016/j.mimet.2013.06.003
- Palyada, K., Threadgill, D., & Stintzi, A. (2004). Iron acquisition and regulation in *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol*, 186(14), 4714-4729. doi: 10.1128/jb.186.14.4714-4729.2004
- Park, C. E., & Sanders, G. W. (1991). *A sensitive enrichment procedure for the isolation of Campylobacter jejuni from frozen foods*. Communication présentée au 5^e Int. Workshop on *Campylobacter* Infection, National Inst. of Nutrition, Puerto Vallarta, Mexico.
- Park, C. E., & Sanders, G. W. (1992). Occurrence of thermotolerant *Campylobacter* in fresh vegetables sold at farmers' outdoor markets and supermarkets. *Can J Microbiol*, 38(4), 313-316.
- Park, C. E., Stankiewicz, Z. K., Lovett, J., Hunt, J., & Francis, D. W. (1983). Effect of temperature, duration of incubation, and pH of enrichment culture on the recovery of *Campylobacter jejuni* from eviscerated market chickens. *Can J Microbiol*, 29(7), 803-806.
- Park, S. F. (2002). The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol*, 74(3), 177-188.
- Park, S. H., Hanning, I., Jarquin, R., Moore, P., Donoghue, D. J., Donoghue, A. M., & Ricke, S. C. (2011). Multiplex PCR assay for the detection and quantification of

- Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* serotypes in water samples. *FEMS Microbiol Lett*, 316(1), 7-15. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02188.x
- Parker, C. T., Quinones, B., Miller, W. G., Horn, S. T., & Mandrell, R. E. (2006). Comparative genomic analysis of *Campylobacter jejuni* strains reveals diversity due to genomic elements similar to those present in *C. jejuni* strain RM1221. *J Clin Microbiol*, 44(11), 4125-4135. doi: 10.1128/jcm.01231-06
- Parkhill, J., Wren, B. W., Mungall, K., Ketley, J. M., Churcher, C., Basham, D., . . . Barrell, B. G. (2000). The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, 403(6770), 665-668. doi: 10.1038/35001088
- Parry, J. D. (2004). Protozoan grazing of freshwater biofilms. *Adv Appl Microbiol*, 54, 167-196. doi: 10.1016/s0065-2164(04)54007-8
- Pasternack, M. S. (2002). Impact and management of *Campylobacter* in human medicine--US perspective. *Int J Infect Dis*, 6 Suppl 3, 3S37-42; discussion 33S42-33, 33S53-38.
- Patil, S. R., Cates, S., & Morales, R. (2005). Consumer food safety knowledge, practices, and demographic differences: findings from a meta-analysis. *J Food Prot*, 68(9), 1884-1894.
- Patrone, V., Campana, R., Vallorani, L., Dominici, S., Federici, S., Casadei, L., . . . Baffone, W. (2013). *CadF* expression in *Campylobacter jejuni* strains incubated under low-temperature water microcosm conditions which induce the viable but non-culturable (VBNC) state. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103(5), 979-988. doi: 10.1007/s10482-013-9877-5
- Pearson, B. M., Pin, C., Wright, J., l'Anson, K., Humphrey, T., & Wells, J. M. (2003). Comparative genome analysis of *Campylobacter jejuni* using whole genome DNA microarrays. *FEBS Lett*, 554(1-2), 224-230.
- Pei, Z., & Blaser, M. J. (1993). *PEB1*, the major cell-binding factor of *Campylobacter jejuni*, is a homolog of the binding component in gram-negative nutrient transport systems. *J Biol Chem*, 268(25), 18717-18725.
- Pendleton, S., Hanning, I., Biswas, D., & Ricke, S. C. (2013). Evaluation of whole-genome sequencing as a genotyping tool for *Campylobacter jejuni* in comparison with pulsed-

- field gel electrophoresis and *flaA* typing. *Poult Sci*, 92(2), 573-580. doi: 10.3382/ps.2012-02695
- Percival, S. L., Chalmers, R. M., Embrey, M., Hunter, P. R., Sellwood, J., & Wyn-Jones, P. (2004). *Microbiology of Waterborne Diseases*. London, UK: Elsevier Academic Press.
- Perry, M. D., Corden, S. A., & Howe, R. A. (2014). Evaluation of the Luminex xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel and the Savyon Diagnostics Gastrointestinal Infection Panel for the detection of enteric pathogens in clinical samples. *J Med Microbiol*, 63(Pt 11), 1419-1426. doi: 10.1099/jmm.0.074773-0
- Peterson, M. C. (1994). Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* infections in adults. *West J Med*, 161(2), 148-152.
- Piersimoni, C., Bornigia, S., Curzi, L., & De Sio, G. (1995). Comparison of two selective media and a membrane filter technique for isolation of *Campylobacter* species from diarrhoeal stools. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 14(6), 539-542.
- Pitkanen, T. (2010). Studies of the detection methods of *Campylobacter* and faecal indicator bacteria in drinking water. *Research*, 39. (p. 1-118). Helsinki: National Institute for Health and Welfare.
- Pitkanen, T. (2013). Review of *Campylobacter* spp. in drinking and environmental waters. *J Microbiol Methods*, 95(1), 39-47. doi: 10.1016/j.mimet.2013.06.008
- Pittenger, L. G., Englen, M. D., Parker, C. T., Frye, J. G., Quinones, B., Horn, S. T., . . . Harrison, M. A. (2009). Genotyping *Campylobacter jejuni* by comparative genome indexing: an evaluation with pulsed-field gel electrophoresis and *flaA* SVR sequencing. *Foodborne Pathog Dis*, 6(3), 337-349. doi: 10.1089/fpd.2008.0185
- Platts-Mills, J. A., & Kosek, M. (2014). Update on the burden of *Campylobacter* in developing countries. *Curr Opin Infect Dis*, 27(5), 444-450. doi: 10.1097/qco.0000000000000091
- Poly, F., Ewing, C., Goon, S., Hickey, T. E., Rockabrand, D., Majam, G., . . . Guerry, P. (2007). Heterogeneity of a *Campylobacter jejuni* protein that is secreted through the flagellar filament. *Infect Immun*, 75(8), 3859-3867. doi: 10.1128/iai.00159-07

- Poly, F., Threadgill, D., & Stintzi, A. (2004). Identification of *Campylobacter jejuni* ATCC 43431-specific genes by whole microbial genome comparisons. *J Bacteriol*, *186*(14), 4781-4795. doi: 10.1128/jb.186.14.4781-4795.2004
- Potter, R. C., Kaneene, J. B., & Gardiner, J. (2002). A comparison of *Campylobacter jejuni* enteritis incidence rates in high- and low-poultry-density counties: Michigan 1992-1999. *Vector Borne Zoonotic Dis*, *2*(3), 137-143. doi: 10.1089/15303660260613701
- Potter, R. C., Kaneene, J. B., & Hall, W. N. (2003). Risk factors for sporadic *Campylobacter jejuni* infections in rural michigan: a prospective case-control study. *Am J Public Health*, *93*(12), 2118-2123.
- Procter, T. D., Pearl, D. L., Finley, R. L., Leonard, E. K., Janecko, N., Reid-Smith, R. J. . . . Sargeant, J. M. (2014). A cross-sectional study examining *Campylobacter* and other zoonotic enteric pathogens in dogs that frequent dog parks in three cities in southwestern Ontario and risk factors for shedding of *Campylobacter* spp. *Zoonoses Public Health*, *61*(3):208-18. doi : 10.1111/zph.12062
- Quessy, S., & Messier, S. (1992). Prevalence of *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Listeria* spp. in ring-billed gulls (*Larus delawarensis*). *J Wildl Dis*, *28*(4), 526-531. doi: 10.7589/0090-3558-28.4.526
- Quinones, B., Miller, W. G., Bates, A. H., & Mandrell, R. E. (2009). Autoinducer-2 production in *Campylobacter jejuni* contributes to chicken colonization. *Appl Environ Microbiol*, *75*(1), 281-285. doi: 10.1128/aem.01803-08
- Ravel, A., Davidson, V. J., Ruzante, J. M., & Fazil, A. (2010). Foodborne proportion of gastrointestinal illness: estimates from a Canadian expert elicitation survey. *Foodborne Pathog Dis*, *7*(12), 1463-1472. doi: 10.1089/fpd.2010.0582
- Rechenburg, A., & Kistemann, T. (2009). Sewage effluent as a source of *Campylobacter* spp. in a surface water catchment. *Int J Environ Health Res*, *19*(4), 239-249. doi: 10.1080/09603120802460376
- Reeser, R. J., Medler, R. T., Billington, S. J., Jost, B. H. & Joens, L. A. (2007). Characterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions. *Appl Environ Microbiol*, *73*, 1908-1913.

- Revez, J., Llarena, A. K., Schott, T., Kuusi, M., Hakkinen, M., Kivisto, R., . . . Rossi, M. (2014). Genome analysis of *Campylobacter jejuni* strains isolated from a waterborne outbreak. *BMC Genomics*, *15*, 768. doi: 10.1186/1471-2164-15-768
- Ribot, E. M., Fitzgerald, C., Kubota, K., Swaminathan, B., & Barrett, T. J. (2001). Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol*, *39*(5), 1889-1894. doi: 10.1128/jcm.39.5.1889-1894.2001
- Richardson, P. T., & Park, S. F. (1995). Enterochelin acquisition in *Campylobacter coli*: characterization of components of a binding-protein-dependent transport system. *Microbiology*, *141* (Pt 12), 3181-3191.
- Ridley, C. M., Jamieson, R. C., Truelstrup Hansen, L., Yost, C. K., & Bezanson, G. S. (2014). Baseline and storm event monitoring of *Bacteroidales* marker concentrations and enteric pathogen presence in a rural Canadian watershed. *Water Res*, *60*, 278-288. doi: 10.1016/j.watres.2014.04.039
- Rinsoz, T., Hilfiker, S., & Oppliger, A. (2009). Quantification of thermotolerant *Campylobacter* in Swiss water treatment plants, by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Water Environ Res*, *81*(9), 929-933.
- Risebro, H. L., Doria, M. F., Andersson, Y., Medema, G., Osborn, K., Schlosser, O., & Hunter, P. R. (2007). Fault tree analysis of the causes of waterborne outbreaks. *J Water Health*, *5 Suppl 1*, 1-18. doi: 10.2166/wh.2007.136
- Rivera-Amill, V., Kim, B. J., Seshu, J., & Konkel, M. E. (2001). Secretion of the virulence-associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. *J Infect Dis*, *183*(11), 1607-1616. doi: 10.1086/320704
- Roberts, J. A., Cumberland, P., Sockett, P. N., Wheeler, J., Rodrigues, L. C., Sethi, D., & Roderick, P. J. (2003). The study of infectious intestinal disease in England: socio-economic impact. *Epidemiol Infect*, *130*(1), 1-11.
- Robinson, D. A. (1981). Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *Br Med J (Clin Res Ed)*, *282*(6276), 1584.
- Rodin, S., Andersson, A. F., Wirta, V., Eriksson, L., Ljungstrom, M., Bjorkholm, B., . . . Engstrand, L. (2008). Performance of a 70-mer oligonucleotide microarray for

genotyping of *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol*, 8, 73. doi: 10.1186/1471-2180-8-73

- Rodriguez, S., & Araujo, R. (2012). Effect of environmental parameters on the inactivation of the waterborne pathogen *Campylobacter* in a Mediterranean river. *J Water Health*, 10(1), 100-107. doi: 10.2166/wh.2011.044
- Roels, T. H., Wickus, B., Bostrom, H. H., Kazmierczak, J. J., Nicholson, M. A., Kurzynski, T. A., & Davis, J. P. (1998). A foodborne outbreak of *Campylobacter jejuni* (O:33) infection associated with tuna salad: a rare strain in an unusual vehicle. *Epidemiol Infect*, 121(2), 281-287.
- Rollins, D. M., & Colwell, R. R. (1986). Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl Environ Microbiol*, 52(3), 531-538.
- Rosef, O., & Kapperud, G. (1983). House flies (*Musca domestica*) as possible vectors of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. *Appl Environ Microbiol*, 45(2), 381-383.
- Rosef, O., Rettedal, G., & Lageide, L. (2001). Thermophilic *Campylobacter* in surface water: a potential risk of campylobacteriosis. *Int J Environ Health Res*, 11(4), 321-327. doi: 10.1080/09603120120081791
- Ross, C. M., & Donnison, A. M. (2006). *Campylobacter jejuni* inactivation in New Zealand soils. *J Appl Microbiol*, 101(5), 1188-1197. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02984.x
- Rossmann, P., Roder, B., Fruhwirth, K., Volg, C., & Wagner, M. (2011). Mechanisms of degradation of DNA standards for calibration function during storage. *Appl Microbiol Biotechnol*, 89(2), 407-417. doi : 10.1007/s00253-010-2943-2
- Rudi, K., Moen, B., Dromtorp, S. M., & Holck, A. L. (2005). Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Appl Environ Microbiol*, 71(2), 1018-1024. doi: 10.1128/aem.71.2.1018-1024.2005
- Ruijter, J. M., Lorenz, P., Tuomi, J. M., Hecker, M., & van den Hoff, M. J. (2014). Fluorescent-increase kinetics of different fluorescent reporters used for qPCR depend on monitoring chemistry, targeted sequence, type of DNA input and PCR efficiency. *Mikrochim Acta*, 181(13-14), 1689-1696. doi: 10.1007/s00604-013-1155-8

- Ruijter, J. M., Pfaffl, M. W., Zhao, S., Spiess, A. N., Boggy, G., Blom, J., . . . Vandesompele, J. (2013). Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: bias, resolution, precision, and implications. *Methods*, *59*(1), 32-46. doi: 10.1016/j.ymeth.2012.08.011
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J., & Moorman, A. F. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res*, *37*(6), e45. doi: 10.1093/nar/gkp045
- Ruijter, J. M., Thygesen, H. H., Schoneveld, O. J., Das, A. T., Berkhout, B., & Lamers, W. H. (2006). Factor correction as a tool to eliminate between-session variation in replicate experiments: application to molecular biology and retrovirology. *Retrovirology*, *3*, 2. doi: 10.1186/1742-4690-3-2
- Ruiz-Palacios, G. M., Calva, J. J., Pickering, L. K., Lopez-Vidal, Y., Volkow, P., Pezzarossi, H., & West, M. S. (1990). Protection of breast-fed infants against *Campylobacter* diarrhea by antibodies in human milk. *J Pediatr*, *116*(5), 707-713.
- Russell, R. G. (1992). *Campylobacter jejuni* colitis and immunity in primates: Epidemiology of natural infection. Dans I. Nchamkin, M. J. Blaser & L. S. Tompkins (éd.), *Campylobacter jejuni: current status and future trends*. (p. 148-157). Washington, DC : American Society for Microbiology.
- Rutledge, R. G., & Cote, C. (2003). Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res*, *31*(16), e93.
- Sails, A. D., Swaminathan, B., & Fields, P. I. (2003). Utility of multilocus sequence typing as an epidemiological tool for investigation of outbreaks of gastroenteritis caused by *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol*, *41*(10), 4733-4739.
- Sammarco, M. L., Ripabelli, G., Fanelli, I., Grasso, G. M., & Tamburro, M. (2010). Prevalence and biomolecular characterization of *Campylobacter* spp. isolated from retail meat. *J Food Prot*, *73*(4), 720-728.
- Samuel, M. C., Vugia, D. J., Shallow, S., Marcus, R., Segler, S., McGivern, T., . . . Tauxe, R. V. (2004). Epidemiology of sporadic *Campylobacter* infection in the United States and

- declining trend in incidence, FoodNet 1996-1999. *Clin Infect Dis*, 38 Suppl 3, S165-174. doi: 10.1086/381583
- Savill, M. G., Hudson, J. A., Ball, A., Klena, J. D., Scholes, P., Whyte, R. J., . . . Jankovic, D. (2001). Enumeration of *Campylobacter* in New Zealand recreational and drinking waters. *J Appl Microbiol*, 91(1), 38-46.
- Scallan, E., Jones, T. F., Cronquist, A., Thomas, S., Frenzen, P., Hoefler, D., . . . Angulo, F. J. (2006). Factors associated with seeking medical care and submitting a stool sample in estimating the burden of foodborne illness. *Foodborne Pathog Dis*, 3(4), 432-438. doi: 10.1089/fpd.2006.3.432
- Schmidt, P. J., Pintar, K. D., Fazil, A. M., Flemming, C. A., Lanthier, M., Laprade, N., . . . Lapen, D. R. (2013). Using *Campylobacter* spp. and *Escherichia coli* data and Bayesian microbial risk assessment to examine public health risks in agricultural watersheds under tile drainage management. *Water Res*, 47(10), 3255-3272. doi: 10.1016/j.watres.2013.02.002
- Schonberg-Norio, D., Sarna, S., Hanninen, M. L., Katila, M. L., Kaukoranta, S. S., & Rautelin, H. (2006). Strain and host characteristics of *Campylobacter jejuni* infections in Finland. *Clin Microbiol Infect*, 12(8), 754-760. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01501.x
- Schonberg-Norio, D., Takkinen, J., Hanninen, M. L., Katila, M. L., Kaukoranta, S. S., Mattila, L., & Rautelin, H. (2004). Swimming and *Campylobacter* infections. *Emerg Infect Dis*, 10(8), 1474-1477. doi: 10.3201/eid1008.030924
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol*, 113(5), 1014-1026. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x
- Schuster, C. J., Ellis, A. G., Robertson, W. J., Charron, D. F., Aramini, J. J., Marshall, B. J., & Medeiros, D. T. (2005). Infectious disease outbreaks related to drinking water in Canada, 1974-2001. *Can J Public Health*, 96(4), 254-258.
- Sebald, M., & Veron, M. (1963). Base DNA content and classification of *Vibrios*. *Ann Inst Pasteur (Paris)*, 105, 897-910.

- Seinige, D., von Kockritz-Blickwede, M., Krischek, C., Klein, G., & Kehrenberg, C. (2014). Influencing factors and applicability of the viability EMA-qPCR for a detection and quantification of *Campylobacter* cells from water samples. *PLoS One*, 9(11), e113812. doi: 10.1371/journal.pone.0113812
- Sheerin, I., Bartholomew, N., & Brunton, C. (2014). Estimated community costs of an outbreak of campylobacteriosis resulting from contamination of a public water supply in Darfield, New Zealand. *N Z Med J*, 127(1391), 13-21.
- Shen, F., Sun, B., Kreutz, J. E., Davydova, E. K., Du, W., Reddy, P. L., . . . Ismagilov, R. F. (2011). Multiplexed quantification of nucleic acids with large dynamic range using multivolume digital RT-PCR on a rotational SlipChip tested with HIV and hepatitis C viral load. *J Am Chem Soc*, 133(44), 17705-17712. doi: 10.1021/ja2060116
- Sheppard, S. K., Didelot, X., Jolley, K. A., Darling, A. E., Pascoe, B., Meric, G., . . . Falush, D. (2013). Progressive genome-wide introgression in agricultural *Campylobacter coli*. *Mol Ecol*, 22(4), 1051-1064. doi: 10.1111/mec.12162
- Signor, R. S., Roser, D. J., Ashbolt, N. J., & Ball, J. E. (2005). Quantifying the impact of runoff events on microbiological contaminant concentrations entering surface drinking source waters. *J Water Health*, 3(4), 453-468.
- Simonsen, J., Frisch, M., & Ethelberg, S. (2008). Socioeconomic risk factors for bacterial gastrointestinal infections. *Epidemiology*, 19(2), 282-290. doi: 10.1097/EDE.0b013e3181633c19
- Sinton, L., Hall, C., & Braithwaite, R. (2007). Sunlight inactivation of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella enterica*, compared with *Escherichia coli*, in seawater and river water. *J Water Health*, 5(3), 357-365. doi: 10.2166/wh.2007.031
- Skirrow, M. B. (2006). John McFadyean and the centenary of the first isolation of *Campylobacter* species. *Clin Infect Dis*, 43(9), 1213-1217. doi: 10.1086/508201
- Skirrow, M. B., & Blaser, M. J. (1995). *Campylobacter jejuni*. Dans M. J. Blaser, P. D. Smith, J. I. Ravdin, H. B. Greenberg & R. L. Guerrant (dir.), *Infections of the gastro-intestinal tract* (p. 825-848). New York: Raven Press.

- Slavik, M. F., Kim, J.-W., Pharr, M. D., Raben, D. P., Tsai, S., & Lobsinger, C. M. (1994). Effect of trisodium phosphate on *Campylobacter* attached to post-chill chicken carcasses. *J Food Protect*, 57(4), 324-326.
- Smith, J. L. (1998). Foodborne illness in the elderly. *J Food Prot*, 61(9), 1229-1239.
- Smith, J. L. (2002). *Campylobacter jejuni* infection during pregnancy: long-term consequences of associated bacteremia, Guillain-Barre syndrome, and reactive arthritis. *J Food Prot*, 65(4), 696-708.
- Snelling, W. J., McKenna, J. P., Lecky, D. M., & Dooley, J. S. (2005). Survival of *Campylobacter jejuni* in waterborne protozoa. *Appl Environ Microbiol*, 71(9), 5560-5571. doi: 10.1128/aem.71.9.5560-5571.2005
- Soderstrom, C., Schalen, C., & Walder, M. (1991). Septicaemia caused by unusual *Campylobacter* species (*C. laridis* and *C. mucosalis*). *Scand J Infect Dis*, 23(3), 369-371.
- Solomon, E. B., & Hoover, D. G. (2004). Inactivation of *Campylobacter jejuni* by high hydrostatic pressure. *Lett Appl Microbiol*, 38(6), 505-509. doi: 10.1111/j.1472-765X.2004.01527.x
- Sommerlad, S. M., & Hendrixson, D. R. (2007). Analysis of the roles of *FlgP* and *FlgQ* in flagellar motility of *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol*, 189(1), 179-186. doi: 10.1128/jb.01199-06
- Sopwith, W., Birtles, A., Matthews, M., Fox, A., Gee, S., James, S., . . . Bolton, E. (2010). Investigation of food and environmental exposures relating to the epidemiology of *Campylobacter coli* in humans in Northwest England. *Appl Environ Microbiol*, 76(1), 129-135. doi: 10.1128/aem.00942-09
- Sopwith, W., Birtles, A., Matthews, M., Fox, A., Gee, S., Painter, M., . . . Bolton, E. (2008). Identification of potential environmentally adapted *Campylobacter jejuni* strain, United Kingdom. *Emerg Infect Dis*, 14(11), 1769-1773. doi: 10.3201/eid1411.071678
- St-Pierre, K., Levesque, S., Frost, E., Carrier, N., Arbeit, R. D., & Michaud, S. (2009). Thermotolerant coliforms are not a good surrogate for *Campylobacter* spp. in environmental water. *Appl Environ Microbiol*, 75(21), 6736-6744. doi: 10.1128/aem.00486-09

- Stafford, R. J., Schluter, P., Kirk, M., Wilson, A., Unicomb, L., Ashbolt, R., & Gregory, J. (2007). A multi-centre prospective case-control study of *Campylobacter* infection in persons aged 5 years and older in Australia. *Epidemiol Infect*, *135*(6), 978-988. doi: 10.1017/s0950268806007576
- Stafford, R. J., Schluter, P. J., Wilson, A. J., Kirk, M. D., Hall, G., & Unicomb, L. (2008). Population-attributable risk estimates for risk factors associated with *Campylobacter* infection, australia. *Emerg Infect Dis*, *14*(6), 895-901. doi: 10.3201/eid1406.071008
- Stampi, S., De Luca, G., Varoli, O., & Zanetti, F. (1999). Occurrence, removal and seasonal variation of thermophilic *Campylobacter* and *Arcobacter* in sewage sludge. *Zentralbl Hyg Umweltmed*, *202*(1), 19-27.
- Standardization ISO. (2014). ISO 17995:2014. Water quality: detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* species. Geneva: International Organization of Standardization.
- Stanley, K., Cunningham, R., & Jones, K. (1998). Isolation of *Campylobacter jejuni* from groundwater. *J Appl Microbiol*, *85*(1), 187-191.
- Stanley, K., & Jones, K. (2003). Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*. *J Appl Microbiol*, *94 Suppl*, 104s-113s.
- Steinbrueckner, B., Ruberg, F., & Kist, M. (2001). Bacterial genetic fingerprint: a reliable factor in the study of the epidemiology of human *Campylobacter* enteritis? *J Clin Microbiol*, *39*(11), 4155-4159. doi: 10.1128/jcm.39.11.4155-4159.2001
- Stern, N. J., Hiatt, K. L., Alfredsson, G. A., Kristinsson, K. G., Reiersen, J., Hardardottir, H., . . . Musgrove, M. T. (2003). *Campylobacter* spp. in Icelandic poultry operations and human disease. *Epidemiol Infect*, *130*(1), 23-32.
- Stern, N. J., Svetoch, E. A., Eruslanov, B. V., Perelygin, V. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P., . . . Seal, B. S. (2006). Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrob Agents Chemother*, *50*(9), 3111-3116. doi: 10.1128/aac.00259-06
- Strachan, N. J., Gormley, F. J., Rotariu, O., Ogden, I. D., Miller, G., Dunn, G. M., . . . Forbes, K. J. (2009). Attribution of *Campylobacter* infections in northeast Scotland to specific

- sources by use of multilocus sequence typing. *J Infect Dis*, 199(8), 1205-1208. doi: 10.1086/597417
- Strachan, N. J., Watson, R. O., Novik, V., Hofreuter, D., Ogden, I. D., & Galan, J. E. (2008). Sexual dimorphism in campylobacteriosis. *Epidemiol Infect*, 136(11), 1492-1495. doi: 10.1017/s0950268807009934
- Studahl, A., & Andersson, Y. (2000). Risk factors for indigenous *Campylobacter* infection: a Swedish case-control study. *Epidemiol Infect*, 125(2), 269-275.
- Suzuki, J., Sugiyama, T., Ito, K., Hadano, Y., Kawamura, I., Okinaka, K., . . . Ohmagari, N. (2013). *Campylobacter showae* bacteremia with cholangitis. *J Infect Chemother*, 19(5), 960-963. doi: 10.1007/s10156-012-0524-2
- Taboada, E. N., Acedillo, R. R., Carrillo, C. D., Findlay, W. A., Medeiros, D. T., Mykytczuk, O. L., . . . Nash, J. H. (2004). Large-scale comparative genomics meta-analysis of *Campylobacter jejuni* isolates reveals low level of genome plasticity. *J Clin Microbiol*, 42(10), 4566-4576. doi: 10.1128/jcm.42.10.4566-4576.2004
- Taboada, E. N., Acedillo, R. R., Luebbert, C. C., Findlay, W. A., & Nash, J. H. (2005). A new approach for the analysis of bacterial microarray-based Comparative Genomic Hybridization: insights from an empirical study. *BMC Genomics*, 6, 78. doi: 10.1186/1471-2164-6-78
- Taboada, E. N., Clark, C. G., Sproston, E. L., & Carrillo, C. D. (2013). Current methods for molecular typing of *Campylobacter* species. *J Microbiol Methods*, 95(1), 24-31. doi: 10.1016/j.mimet.2013.07.007
- Taboada, E. N., Mackinnon, J. M., Luebbert, C. C., Gannon, V. P., Nash, J. H., & Rahn, K. (2008). Comparative genomic assessment of Multi-Locus Sequence Typing: rapid accumulation of genomic heterogeneity among clonal isolates of *Campylobacter jejuni*. *BMC Evol Biol*, 8, 229. doi: 10.1186/1471-2148-8-229
- Taboada, E. N., Ross, S. L., Mutschall, S. K., Mackinnon, J. M., Roberts, M. J., Buchanan, C. J., . . . Clark, C. G. (2012). Development and validation of a comparative genomic fingerprinting method for high-resolution genotyping of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol*, 50(3), 788-797. doi: 10.1128/jcm.00669-11

- Taboada, E. N., van Belkum, A., Yuki, N., Acedillo, R. R., Godschalk, P. C., Koga, M., . . . Nash, J. H. (2007). Comparative genomic analysis of *Campylobacter jejuni* associated with Guillain-Barre and Miller Fisher syndromes: neuropathogenic and enteritis-associated isolates can share high levels of genomic similarity. *BMC Genomics*, 8, 359. doi: 10.1186/1471-2164-8-359
- Tallon, P., Magajna, B., Lofranco, C., & Leung, K. T. (2005). Microbial indicators of faecal contamination in water : a current perspective. *Water, Air, and Soil Pollution*(166), 139-166.
- Tam, C. C., Rodrigues, L. C., & O'Brien, S. J. (2003). The study of infectious intestinal disease in England: what risk factors for presentation to general practice tell us about potential for selection bias in case-control studies of reported cases of diarrhoea. *Int J Epidemiol*, 32(1), 99-105.
- Tam, C. C., Rodrigues, L. C., O'Brien, S. J., & Hajat, S. (2006). Temperature dependence of reported *Campylobacter* infection in England, 1989-1999. *Epidemiol Infect*, 134(1), 119-125. doi: 10.1017/s0950268805004899
- Tambalo, D. D., Fremaux, B., Boa, T., & Yost, C. K. (2012). Persistence of host-associated *Bacteroidales* gene markers and their quantitative detection in an urban and agricultural mixed prairie watershed. *Water Res*, 46(9), 2891-2904. doi: 10.1016/j.watres.2012.02.048
- Tatchou-Nyamsi-Konig, J. A., Moreau, A., Federighi, M., & Block, J. C. (2007). Behaviour of *Campylobacter jejuni* in experimentally contaminated bottled natural mineral water. *J Appl Microbiol*, 103(2), 280-288. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03239.x
- Tauxe, R. V. (1992). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialised nations. Dans I. Nchamkin, M. J. Blaser & L. S. Tompkins (éd.), *Campylobacter jejuni: current status and future trends*. Washinton, D. C.
- Taylor, D. N., Perlman, D. M., Echeverria, P. D., Lexomboon, U., & Blaser, M. J. (1993). *Campylobacter* immunity and quantitative excretion rates in Thai children. *J Infect Dis*, 168(3), 754-758.
- Taylor, E. V., Herman, K. M., Ailes, E. C., Fitzgerald, C., Yoder, J. S., Mahon, B. E., & Tauxe, R. V. (2013). Common source outbreaks of *Campylobacter* infection in the

- USA, 1997-2008. *Epidemiol Infect*, 141(5), 987-996. doi: 10.1017/s0950268812001744
- Teh, A. H., Lee, S. M. & Dykes, G. A. (2014). Does *Campylobacter jejuni* form biofilms in food-related environments? *Appl Environ Microbiol*, 80(17), 5154-5160.
- Tee, W., Baird, R., Dyll-Smith, M., & Dwyer, B. (1988). *Campylobacter cryaerophila* isolated from a human. *J Clin Microbiol*, 26(12), 2469-2473.
- Templeton, J. M., De Jong, A. J., Blackall, P. J., & Miflin, J. K. (2006). Survival of *Campylobacter* spp. in darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) and their larvae in Australia. *Appl Environ Microbiol*, 72(12), 7909-7911. doi: 10.1128/aem.01471-06
- ten Veldhuis, J. A., Clemens, F. H., Sterk, G., & Berends, B. R. (2010). Microbial risks associated with exposure to pathogens in contaminated urban flood water. *Water Res*, 44(9), 2910-2918. doi: 10.1016/j.watres.2010.02.009
- Tenover, F. C., Williams, S., Gordon, K. P., Nolan, C., & Plorde, J. J. (1985). Survey of plasmids and resistance factors in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 27(1), 37-41.
- Teunis, P., Van den Brandhof, W., Nauta, M., Wagenaar, J., Van den Kerkhof, H., & Van Pelt, W. (2005). A reconsideration of the *Campylobacter* dose-response relation. *Epidemiol Infect*, 133(4), 583-592.
- The *Campylobacter* Sentinel Surveillance Scheme Collaborators. (2003). Foreign and domestic travel and the risk of *Campylobacter* infection: results from a population-based sentinel surveillance scheme. *J Travel Med*, 10(2), 136-138.
- Theron, J., & Cloete, T. E. (2002). Emerging waterborne infections: contributing factors, agents, and detection tools. *Crit Rev Microbiol*, 28(1), 1-26. doi: 10.1080/1040-840291046669
- Thibodeau, A., Fravallo, P., Laurent-Lewandowski, S., Guevremont, E., Quessy, S., & Letellier, A. (2011). Presence and characterization of *Campylobacter jejuni* in organically raised chickens in Quebec. *Can J Vet Res*, 75(4), 298-307.
- Tholozan, J. L., Cappelier, J. M., Tissier, J. P., Delattre, G., & Federighi, M. (1999). Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. *Appl Environ Microbiol*, 65(3), 1110-1116.

- Thomas, C., Hill, D. J., & Mabey, M. (1999). Evaluation of the effect of temperature and nutrients on the survival of *Campylobacter* spp. in water microcosms. *J Appl Microbiol*, 86(6), 1024-1032.
- Thomas, D. K., Lone, A. G., Selinger, L. B., Taboada, E. N., Uwiera, R. R., Abbott, D. W., & Inglis, G. D. (2014). Comparative variation within the genome of *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 in human and murine hosts. *PLoS One*, 9(2), e88229. doi: 10.1371/journal.pone.0088229
- Thomas, M. K., Majowicz, S. E., Sockett, P. N., Fazil, A., Pollari, F., Dore, K., . . . Edge, V. L. (2006). Estimated numbers of community cases of illness due to *Salmonella*, *Campylobacter* and verotoxigenic *Escherichia coli*: pathogen-specific community rates. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 17(4), 229-234.
- Thomas, M. K., Murray, R., Flockhart, L., Pintar, K., Pollari, F., Fazil, A., . . . Marshall, B. (2013). Estimates of the burden of foodborne illness in Canada for 30 specified pathogens and unspecified agents, circa 2006. *Foodborne Pathog Dis*, 10(7), 639-648. doi: 10.1089/fpd.2012.1389
- Thompson, J. S., Cahoon, F. E., & Hodge, D. S. (1986). Rate of *Campylobacter* spp. isolation in three regions of Ontario, Canada, from 1978 to 1985. *J Clin Microbiol*, 24(5), 876-878.
- Thornton, S. A., Logan, S. M., Trust, T. J., & Guerry, P. (1990). Polynucleotide sequence relationships among flagellin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Infect Immun*, 58(8), 2686-2689.
- Till, D., McBride, G., Ball, A., Taylor, K., & Pyle, E. (2008). Large-scale freshwater microbiological study: rationale, results and risks. *J Water Health*, 6(4), 443-460. doi: 10.2166/wh.2008.071
- Tissier, A., Denis, M., Hartemann, P., & Gassilloud, B. (2012). Development of a rapid and sensitive method combining a cellulose ester microfilter and a real-time quantitative PCR assay to detect *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in 20 liters of drinking water or low-turbidity waters. *Appl Environ Microbiol*, 78(3), 839-845. doi: 10.1128/aem.06754-11

- Tompkins, D. S., Hudson, M. J., Smith, H. R., Eglin, R. P., Wheeler, J. G., Brett, M. M., . . . Cook, P. E. (1999). A study of infectious intestinal disease in England: microbiological findings in cases and controls. *Commun Dis Public Health*, 2(2), 108-113.
- Toplak, N., Kovac, M., Piskernik, S., Mozina, S. S., & Jersek, B. (2012). Detection and quantification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* using real-time multiplex PCR. *J Appl Microbiol*, 112(4), 752-764. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05235.x
- Tourlousse, D. M., Ahmad, F., Stedtfeld, R. D., Seyrig, G., Tiedje, J. M., & Hashsham, S. A. (2012). A polymer microfluidic chip for quantitative detection of multiple water- and foodborne pathogens using real-time fluorogenic loop-mediated isothermal amplification. *Biomed Microdevices*, 14(4), 769-778. doi: 10.1007/s10544-012-9658-3
- Tran, T. T. (1995). Evaluation of Oxyrase enrichment method for isolation of *Campylobacter jejuni* from inoculated foods. *Lett Appl Microbiol*, 21(6), 345-347.
- Tuomi, J. M., Voorbraak, F., Jones, D. L., & Ruijter, J. M. (2010). Bias in the Cq value observed with hydrolysis probe based quantitative PCR can be corrected with the estimated PCR efficiency value. *Methods*, 50(4), 313-322. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.02.003
- Ugarte-Ruiz, M., Florez-Cuadrado, D., Wassenaar, T. M., Porrero, M. C., & Dominguez, L. (2015). Method comparison for enhanced recovery, isolation and qualitative detection of *C. jejuni* and *C. coli* from wastewater effluent samples. *Int J Environ Res Public Health*, 12(3), 2749-2764. doi: 10.3390/ijerph120302749
- Uhlmann, S., Galanis, E., Takaro, T., Mak, S., Gustafson, L., Embree, G., . . . Isaac-Renton, J. (2009). Where's the pump? Associating sporadic enteric disease with drinking water using a geographic information system, in British Columbia, Canada, 1996-2005. *J Water Health*, 7(4), 692-698. doi: 10.2166/wh.2009.108
- Umaraw, P., Prajapati, A., Verma, A. K., Pathak, V., & Singh, V. P. (2015). Control of *Campylobacter* in poultry industry from farm to poultry processing unit - a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 0. doi: 10.1080/10408398.2014.935847

- Unicomb, L. E., Dalton, C. B., Gilbert, G. L., Becker, N. G., & Patel, M. S. (2008). Age-specific risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in regional Australia. *Foodborne Pathog Dis*, 5(1), 79-85. doi: 10.1089/fpd.2007.0047
- Van Donkersgoed, J., Bohaychuk, V., Besser, T., Song, X. M., Wagner, B., Hancock, D., . . . Dargatz, D. (2009). Occurrence of foodborne bacteria in Alberta feedlots. *Can Vet J*, 50(2), 166-172.
- Van Dyke, M. I., Morton, V. K., McLellan, N. L., & Huck, P. M. (2010). The occurrence of *Campylobacter* in river water and waterfowl within a watershed in southern Ontario, Canada. *J Appl Microbiol*, 109(3), 1053-1066. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04730.x
- van Hees, B. C., Veldman-Ariesen, M. J., de Jongh, B. M., Tersmette, M., & van Pelt, W. (2007). Regional and seasonal differences in incidence and antibiotic resistance of *Campylobacter* from a nationwide surveillance study in The Netherlands: an overview of 2000-2004. *Clin Microbiol Infect*, 13(3), 305-310. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01643.x
- Van Loock, F., Ducoffre, G., Dumont, J. M., Libotte-Chasseur, M. L., Imberechts, H., Gouffaux, M., . . . Daube, G. (2000). Analysis of foodborne disease in Belgium in 1997. *Acta Clin Belg*, 55(6), 300-306.
- Van Vliet, A. H. & Ketley, J. M. (2001). Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*, 30, 45S-56S.
- Vandamme, P., Debruyne, L., De Brandt, E., & Falsen, E. (2010). Reclassification of *Bacteroides ureolyticus* as *Campylobacter ureolyticus* comb. nov., and emended description of the genus *Campylobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60(Pt 9), 2016-2022. doi: 10.1099/ij.s.0.017152-0
- Vereen, E., Jr., Lowrance, R. R., Cole, D. J., & Lipp, E. K. (2007). Distribution and ecology of *Campylobacter* in coastal plain streams (Georgia, United States of America). *Appl Environ Microbiol*, 73(5), 1395-1403. doi: 10.1128/aem.01621-06
- Vereen, E., Jr., Lowrance, R. R., Jenkins, M. B., Adams, P., Rajeev, S., & Lipp, E. K. (2013). Landscape and seasonal factors influence *Salmonella* and *Campylobacter* prevalence in a rural mixed use watershed. *Water Res*, 47(16), 6075-6085. doi: 10.1016/j.watres.2013.07.028

- Verhoeff-Bakkenes, L., Jansen, H. A., in 't Veld, P. H., Beumer, R. R., Zwietering, M. H., & van Leusden, F. M. (2011). Consumption of raw vegetables and fruits: a risk factor for *Campylobacter* infections. *Int J Food Microbiol*, *144*(3), 406-412. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.027
- Verhougstraete, M. P., Byappanahalli, M. N., Rose, J. B., & Whitman, R. L. (2010). *Cladophora* in the Great Lakes: impacts on beach water quality and human health. *Water Sci Technol*, *62*(1), 68-76. doi: 10.2166/wst.2010.230
- Vestergaardm, L. S., Olsen, K. E., Stensvold, C. R., Bottiger, B. E., Adelhardt, M., Lisby, M., . . . Molbak, K. (2007). Outbreak of severe gastroenteritis with multiple aetiologies caused by contaminated drinking water in Denmark, January 2007. *Euro Surveillance*, *12*(13), 3164.
- Vieira, A., Seddon, A. M., & Karlyshev, A. V. (2015). *Campylobacter-Acanthamoeba* interactions. *Microbiology*, *In press*. doi: 10.1099/mic.0.000075
- Vondrakova, L., Pazlarova, J., & Demnerova, K. (2014). Detection, identification and quantification of *Campylobacter jejuni*, *coli* and *lari* in food matrices all at once using multiplex qPCR. *Gut Pathog*, *6*, 12. doi: 10.1186/1757-4749-6-12
- Waage, A. S., Vardund, T., Lund, V., & Kapperud, G. (1999). Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* cells in environmental water, sewage, and food samples by a seminested PCR assay. *Appl Environ Microbiol*, *65*(4), 1636-1643.
- Wallace, D. J., Van Gilder, T., Shallow, S., Fiorentino, T., Segler, S. D., Smith, K. E., . . . Angulo, F. J. (2000). Incidence of foodborne illnesses reported by the foodborne diseases active surveillance network (FoodNet)-1997. FoodNet Working Group. *J Food Prot*, *63*(6), 807-809.
- Wallis, M. R. (1994). The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*. *Br J Biomed Sci*, *51*(1), 57-64.
- Wang, G., Clark, C. G., Taylor, T. M., Pucknell, C., Barton, C., Price, L., . . . Rodgers, F. G. (2002). Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J Clin Microbiol*, *40*(12), 4744-4747.

- Wang, G., & Maier, R. J. (2004). An NADPH quinone reductase of *Helicobacter pylori* plays an important role in oxidative stress resistance and host colonization. *Infect Immun*, 72(3), 1391-1396.
- Wang, Y., & Taylor, D. E. (1990). Natural transformation in *Campylobacter* species. *J Bacteriol*, 172(2), 949-955.
- Wardak, S., Duda, U., & Wojsa, B. (2009). [Molecular investigation of relatedness of *Campylobacter coli* isolated from child with campylobacteriosis and healthy, household dog]. *Med Dosw Mikrobiol*, 61(3), 235-241.
- Wassenaar, T. M., Geilhausen, B., & Newell, D. G. (1998). Evidence of genomic instability in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry. *Appl Environ Microbiol*, 64(5), 1816-1821.
- Wassenaar, T. M., van der Zeijst, B. A., Ayling, R., & Newell, D. G. (1993). Colonization of chicks by motility mutants of *Campylobacter jejuni* demonstrates the importance of flagellin A expression. *J Gen Microbiol*, 139 Pt 6, 1171-1175.
- Wery, N., Lhoutellier, C., Ducray, F., Delgenes, J. P., & Godon, J. J. (2008). Behaviour of pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. *Water Res*, 42(1-2), 53-62. doi: 10.1016/j.watres.2007.06.048
- West, L. S. (1951). *The housefly - Its natural history, medical importance and control*. Ithaca, New York: Comstock Publishing Company.
- Westrell, T., Ciampa, N., Boelaert, F., Helwigh, B., Korsgaard, H., Chriel, M., . . . Makela, P. (2009). Zoonotic infections in Europe in 2007: a summary of the EFSA-ECDC annual report. *Euro Surveill*, 14(3).
- Wetsch, N. M., Somani, K., Tyrrell, G. J., Gebhart, C., Bailey, R. J., & Taylor, D. E. (2006). *Campylobacter curvus*-associated hepatic abscesses: a case report. *J Clin Microbiol*, 44(5), 1909-1911. doi: 10.1128/jcm.44.5.1909-1911.2006
- Wheeler, J. G., Sethi, D., Cowden, J. M., Wall, P. G., Rodrigues, L. C., Tompkins, D. S., . . . Roderick, P. J. (1999). Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. The Infectious Intestinal Disease Study Executive. *BMJ*, 318(7190), 1046-1050.

- White, A. N., Kinlin, L. M., Johnson, C., Spain, C. V., Ng, V., & Fisman, D. N. (2009). Environmental determinants of campylobacteriosis risk in Philadelphia from 1994 to 2007. *Ecohealth*, 6(2), 200-208. doi: 10.1007/s10393-009-0246-9
- Whyte, P., Collins, J. D., McGill, K., Monahan, C., & O'Mahony, H. (2001). Distribution and prevalence of airborne microorganisms in three commercial poultry processing plants. *J Food Prot*, 64(3), 388-391.
- Whyte, P., McGill, K., Cowley, D., Madden, R. H., Moran, L., Scates, P., . . . Cormican, M. (2004). Occurrence of *Campylobacter* in retail foods in Ireland. *Int J Food Microbiol*, 95(2), 111-118. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.018
- Wilkes, G., Edge, T. A., Gannon, V. P., Jokinen, C., Lyautey, E., Neumann, N. F., . . . Lapen, D. R. (2011). Associations among pathogenic bacteria, parasites, and environmental and land use factors in multiple mixed-use watersheds. *Water Res*, 45(18), 5807-5825. doi: 10.1016/j.watres.2011.06.021
- Williams, M. S., & Ebel, E. D. (2012). Methods for fitting a parametric probability distribution to most probable number data. *Int J Food Microbiol*, 157(2), 251-258. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.014
- Wilson, I. G. (2004). Airborne *Campylobacter* infection in a poultry worker: case report and review of the literature. *Commun Dis Public Health*, 7(4), 349-353.
- Wilson, I. G., & Moore, J. E. (1996). Presence of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in shellfish. *Epidemiol Infect*, 116(2), 147-153.
- Won, G., Gill, A., & Lejeune, J. T. (2013). Microbial quality and bacteria pathogens in private wells used for drinking water in northeastern Ohio. *J Water Health*, 11(3), 555-562. doi: 10.2166/wh.2013.247
- Wong, T. L. (2009). Potential dissemination of *Campylobacter* by farmers' overalls in broiler farms. Client report FW09004. New Zealand: New Zealand Food Safety Authority.
- Woodall, C. A., Jones, M. A., Barrow, P. A., Hinds, J., Marsden, G. L., Kelly, D. J., . . . Maskell, D. J. (2005). *Campylobacter jejuni* gene expression in the chick cecum: evidence for adaptation to a low-oxygen environment. *Infect Immun*, 73(8), 5278-5285. doi: 10.1128/iai.73.8.5278-5285.2005

- Wright, E. P. (1983). The isolation of *Campylobacter jejuni* from flies. *J Hyg (Lond)*, *91*(2), 223-226.
- Xu, F., Zeng, X., Haigh, R. D., Ketley, J. M., & Lin, J. (2010). Identification and characterization of a new ferric enterobactin receptor, *CfrB*, in *Campylobacter*. *J Bacteriol*, *192*(17), 4425-4435. doi: 10.1128/jb.00478-10
- Yamazaki-Matsune, W., Taguchi, M., Seto, K., Kawahara, R., Kawatsu, K., Kumeda, Y., . . . Tsukamoto, T. (2007). Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. *J Med Microbiol*, *56*(Pt 11), 1467-1473. doi: 10.1099/jmm.0.47363-0
- Yang, C., Jiang, Y., Huang, K., Zhu, C., & Yin, Y. (2003). Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water. *FEMS Immunol Med Microbiol*, *38*(3), 265-271.
- Yang, S., Leff, M. G., McTague, D., Horvath, K. A., Jackson-Thompson, J., Murayi, T., . . . Angulo, F. J. (1998). Multistate surveillance for food-handling, preparation, and consumption behaviors associated with foodborne diseases: 1995 and 1996 BRFSS food-safety questions. *MMWR CDC Surveill Summ*, *47*(4), 33-57.
- Yeh, H. Y., Hiatt, K. L., Line, J. E., & Seal, B. S. (2014). Characterization and antigenicity of recombinant *Campylobacter jejuni* flagellar capping protein FliD. *J Med Microbiol*, *63*(Pt 4), 602-609. doi: 10.1099/jmm.0.060095-0
- Yun, J. J., Heisler, L. E., Hwang, I. I., Wilkins, O., Lau, S. K., Hycza, M., . . . Der, S. D. (2006). Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, *34*(12), e85. doi : 10.1093/nar/gkl400
- Zeng, X., Xu, F., & Lin, J. (2013). Specific TonB-ExbB-ExbD energy transduction systems required for ferric enterobactin acquisition in *Campylobacter*. *FEMS Microbiol Lett*, *347*(1), 83-91. doi: 10.1111/1574-6968.12221
- Zhang, M. J., Qiao, B., Xu, X. B., & Zhang, J. Z. (2013). Development and application of a real-time polymerase chain reaction method for *Campylobacter jejuni* detection. *World J Gastroenterol*, *19*(20), 3090-3095. doi: 10.3748/wjg.v19.i20.3090

Ziprin, R. L., Young, C. R., Byrd, J. A., Stanker, L. H., Hume, M. E., Gray, S. A., . . . Konkel, M. E. (2001). Role of *Campylobacter jejuni* potential virulence genes in cecal colonization. *Avian Dis*, 45(3), 549-557.

Appendices

Annexe 1. Carte des cas cliniques et des sites de collecte des eaux environnementales

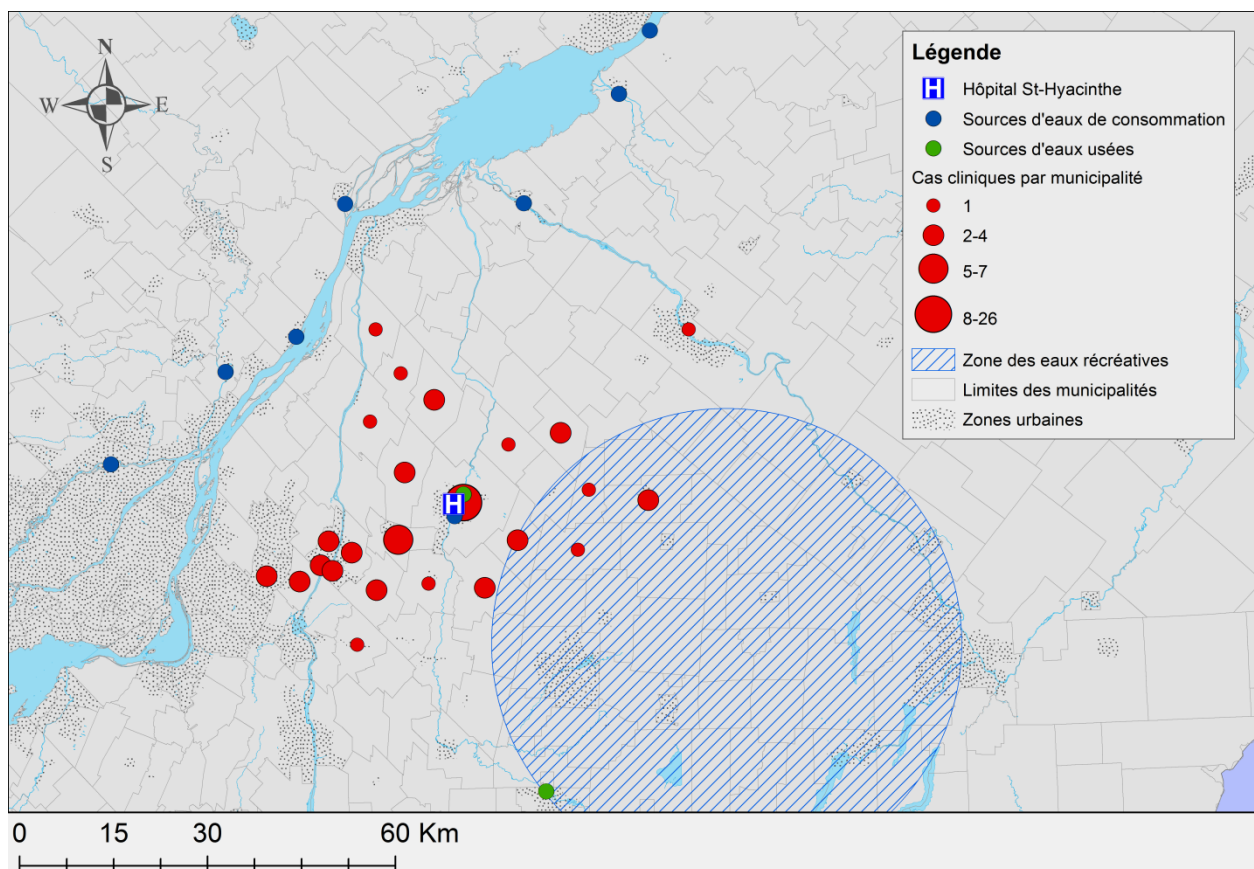


Figure 10. Représentation des cas de campylobactérioses et des sites de collecte des différentes sources d'eau par municipalité dans la région sud-est du Québec.