

Caractérisation génétique d'isolats de *Campylobacter* récoltés en Bretagne et issus de différentes sources

INTRODUCTION

Campylobacter sp. est l'une des causes les plus fréquentes de gastro-entérites humaines. Le nombre déclaré de campylobactérioses est en augmentation dans de nombreux pays européens, illustrant l'émergence de l'intérêt pour ces infections en santé publique. Les campylobactérioses sont principalement dues à deux espèces *C. jejuni* et *C. coli* [4].

Les symptômes sont généralement une diarrhée dans 90 % des cas, des douleurs abdominales, de la fièvre et des vomissements. Très rarement mortelles (léthalité inférieure à 0,1 %) mais pouvant engendrer de graves séquelles (syndrome de Guillain-Barré (neuropathie) [19]), les entérites dues à *Campylobacter* sont à prendre en considération pour le problème de santé publique, et essentiellement par les coûts importants qu'elles engendrent [24].

Le syndrome de Guillain-Barré (SGB) est généralement précédé dans 17 à 50 % des cas par une infection à *Campylobacter*. Pour 1000 cas d'infections à *Campylobacter* 1 à 3 patients peuvent développer un SGB. Les symptômes du SGB sont la paralysie flasque des muscles qui peut évoluer vers la mort (2 à 3 % des cas) ou des séquelles neurologiques sévères (15 à 20 % des cas). La récupération partielle ou totale peut avoir lieu après quelques semaines ou mois [14].

En France, le nombre estimé par an de cas d'infections à *Campylobacter* est d'environ 500 000. L'espèce *C. jejuni* représente 76 % des souches collectées chez les patients contre 17 % pour *C. coli* [6]. Ces souches sont collectées par le centre national de référence *Campylobacter-Helicobacter* (CNR-CH), localisé à Bordeaux.

La source principale des infections humaines à *Campylobacter* mise en évidence par de nombreuses études épidémiologiques est la nourriture contaminée, et plus particulièrement la viande de volaille crue ou mal cuite [13, 17]. La viande de porc a été aussi décrite comme jouant un rôle dans les infections humaines à *Campylobacter* [5, 7].

Les deux espèces principalement retrouvées dans les cas humains sont les mêmes que celles trouvées dans la filière volaille (66 % *C. jejuni* et 34 % *C. coli*) [1, 22] et dans la filière porcine (100 % *C. coli*) [20].

L'objectif principal du projet *Campylobacter* Bretagne est d'évaluer les impacts respectifs des différents réservoirs animaux sur la diffusion des *Campylobacters* dans les denrées alimentaires d'origine animale et d'établir les relations éventuelles entre les isolats d'origine animale et ceux retrouvés dans les cas de campylobactérioses humaines. Ce projet fonctionne sur la base du volontariat des laboratoires départementaux, de la collaboration du CNR et de nos sollicitations auprès de chercheurs s'intéressant à ce germe. Plusieurs techniques de typage existent pour étudier l'épidémiologie des infections humaines à *Campylobacter* [26]. Le typage par macro-restriction et électrophorèse en champ pulsé (RFLP/PFGE) est une technique adéquate pour atteindre cet objectif [5, 18]. Cet outil est utilisé en routine à l'Afssa de Ploufragan et a prouvé dans plusieurs études son efficacité pour tracer les bactéries.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Isolats

Tous les isolats de *Campylobacter* analysés dans le travail présenté ici ont été récoltés en Bretagne durant les années 2003 et 2004. Au total, 582 isolats de *Campylobacter* ont été génotypés. Ils proviennent de la filière volaille (137 *C. coli*; 182 *C. jejuni*), de la filière porc (86 *C. coli*) et de prélèvements humains (26 *C. coli*; 151 *C. jejuni*).

Les isolats d'origine humaine ont été reçus au CNR-CH de Bordeaux. Chaque isolat provient d'une analyse réalisée sur un patient présentant une gastro-entérite ou une autre pathologie dans un laboratoire de Bretagne participant au réseau. Ces souches sont envoyées au CNR par les laboratoires sur la base du volontariat. Ces 177 souches sont toutes les souches bretonnes de 2003 et 2004 que le CNR a reçu des laboratoires qui participent à l'envoi.

Les 405 isolats d'origine animale proviennent, pour les isolats de volailles, de caeca prélevés en élevage (68 *C. coli*; 52 *C. jejuni*), en abattoir (47 *C. coli*; 42 *C. jejuni*), et de cuisses de poulet provenant de supermarchés (22 *C. coli*; 88 *C. jejuni*), et, pour les isolats de porcs, de prélèvements rectaux collectés en abattoir (86 *C. coli*). De chaque prélèvement, un seul isolat a été génotypé.

Identification de l'espèce

L'identification des espèces *C. jejuni* et *C. coli* a été réalisée par une PCR en temps réel pour les souches humaines [15] et par une m-PCR classique [2] pour les isolats d'origine animale.

Typage des isolats et analyse des profils génétiques

Le typage des isolats a été réalisé par la méthode RFLP/PFGE et l'analyse des profils en utilisant le logiciel BioNumerics [22]. Deux profils enzymatiques ont été obtenus par isolat: un profil après restriction par l'enzyme *KpnI* et un profil après restriction par l'enzyme *SmaI*. Le profil combiné a été codé KS. Les groupes génétiques ou clusters ont été définis pour une similarité génétique à 80 % [3].

RÉSULTATS

Caractéristiques des infections humaines observées en Bretagne

De janvier 2003 à décembre 2004, le CNR a reçu 151 *C. jejuni* et 26 *C. coli* isolés en Bretagne. Une augmentation du nombre de cas d'infections à *Campylobacter* rapportés a été observée pendant



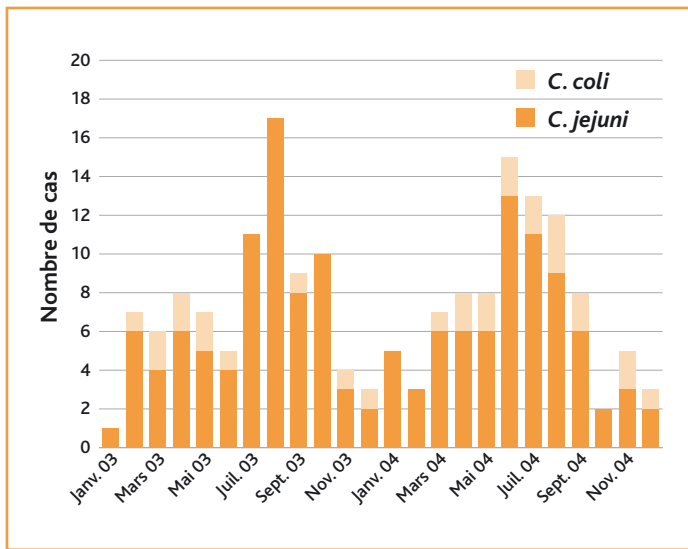


Figure 1 : nombre de cas selon les mois en 2003 et 2004

les mois d'été et était plus prononcée pour *C. jejuni* (Figure 1). En août 2003, le pic était très prononcé (18 cas humains).

L'âge moyen des patients était de 28 ans ; 25 % des cas humains concernent des enfants de moins de 5 ans et le nombre de cas dus à *C. jejuni* diminue avec l'âge (Figure 2). Pour les classes d'âge 5-14 ans et 35-54 ans, les infections à *Campylobacter* concernent plus particulièrement les hommes (Chi2, P=0.003). Le ratio *C. jejuni*/*C. coli* ne varie pas significativement selon les saisons, l'âge et le sexe (Chi2, p> 0.05).

Le typage a généré 123 et 25 profils génétiques KS pour *C. jejuni* et *C. coli* respectivement (Tableau 1). L'indice de Simpson est élevé pour les 2 espèces (0,997 et 0,996, respectivement), ce qui indique une grande diversité génétique pour les souches humaines. Des isolats humains de 2003 et 2004 ont présenté le même profil KS dans 10 et 5 cas respectivement, et pour 3 de ces cas il s'agissait de cas familiaux.

Tableau 1 : diversité génétique des isolats de *Campylobacter*

Espèce		Origine des isolats		
		homme	volaille	porc
<i>C. jejuni</i>	Nombre d'isolats	151	182	–
	Nombre de profils KS	123	165	–
	Indice de Simpson	0,997	0,998	–
<i>C. coli</i>	Nombre d'isolats	26	137	86
	Nombre de profils KS	25	126	84
	Indice de Simpson	0,996	0,998	0,999

L'analyse de la similarité génétique à 80 % a permis la construction de 24 clusters pour *C. jejuni* et de 3 clusters pour *C. coli* qui contiennent 52,8 % et 38,6 % des isolats humains de 2003 et 2004, respectivement. Les clusters ne sont pas caractérisés par un âge spécifique des patients, un mois spécifique de l'année ou un endroit précis en Bretagne (données non montrées).

Douze clusters contiennent des isolats collectés sur les deux années. Ces clusters regroupent 21,3 % et 17 % des isolats collectés en 2003 et 2004, respectivement. Pour quatre cas, des isolats 2003 et 2004 ont le même profil génétique KS.

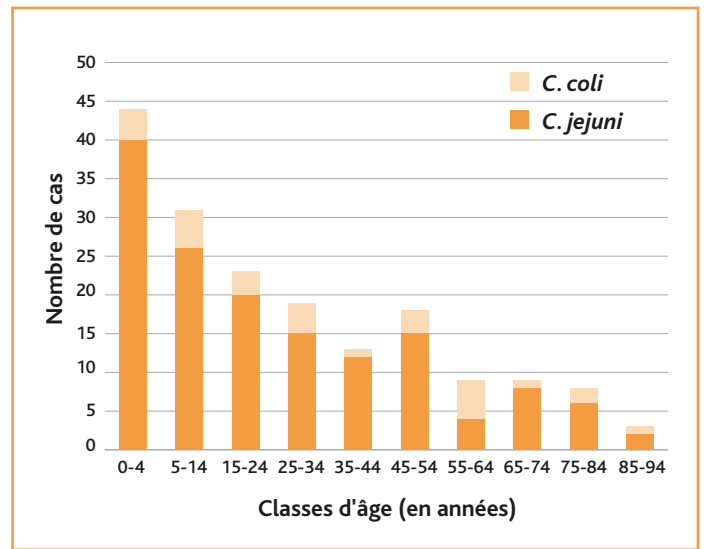


Figure 2 : nombre de cas selon les classes d'âge en 2003 et 2004

Relation génétique entre les isolats d'origine humaine et les isolats d'origine animale

Le typage par RFLP/PFGE a généré 165, 126, et 84 profils génétiques pour les 182 *C. jejuni* de volaille, les 137 *C. coli* de volaille et les 86 *C. coli* de porc, respectivement (Tableau 1). L'indice de Simpson est élevé (0,998, 0,998 et 0,999 respectivement) indiquant une grande diversité génétique dans chaque population animale de *Campylobacter*. Les isolats d'origine animale ont été comparés génétiquement aux isolats d'origine humaine. Six profils KS identiques ont été trouvés entre les isolats de volailles et les isolats humains.

L'analyse de la similarité génétique des *C. jejuni* humains et de volaille a permis la construction de 69 clusters (sur la base de 80 % de similarité) qui contiennent 66,3 % des *C. jejuni*. Dans 37 cas, des isolats de volailles sont regroupés avec des isolats d'humains. Ces isolats ont été collectés en élevage (24,2 %), en abattoir (42,3 %) et en supermarché (33,5 %).

Pour les *C. coli*, aucun pulsotype identique n'a été retrouvé entre les 3 origines, humaine, aviaire et porcine. L'analyse de la similarité génétique des *C. coli* humains, de volailles et de porcs a permis la construction de 37 clusters qui contiennent 62,3 % des *C. coli*. Dans 10 cas, des isolats de volailles sont regroupés avec des isolats d'humains. Ces isolats ont été collectés en élevage (17,6 %), en abattoir (55,2 %) et en supermarché (27,2 %). Les isolats de porc sont toujours dans des clusters différents des isolats de volailles et des isolats humains.

65 des 151 *C. jejuni* humains et 14 des 26 *C. coli* humains ont des profils identiques ou similaires à ceux des isolats de volailles. Ceci indique que 44,6 % d'isolats de *Campylobacter* humains partagent les caractéristiques génétiques d'isolats de volaille. Sur les 106 clusters (69 clusters de *C. jejuni*, 37 clusters de *C. coli*), les isolats d'élevage et d'abattoir partagent seulement 15 clusters avec les isolats de supermarché.

DISCUSSION

Dans notre étude, les données concernant les souches humaines isolées en Bretagne sont en accord avec celles concernant l'ensemble des souches françaises [6]. Le ratio entre *C. jejuni* et *C. coli* est similaire. Une augmentation du nombre de cas pendant la période chaude est observée et est également plus prononcée pour *C. jejuni*. Le taux d'isolement est plus élevé chez les enfants



en dessous de 5 ans. Ceci indique que notre échantillonnage breton est conforme à ce qui est décrit pour toute la France.

Entre 2003 et 2004, peu d'isolats humains ont montré de profils identiques et seulement 21,3 % et 17 % des isolats collectés en 2003 et 2004 se retrouvent dans les mêmes clusters. Ces données indiquent qu'il est difficile de lier les infections humaines à *Campylobacter* à des groupes d'isolats possédant des profils particuliers.

La comparaison génétique par RFLP/PFGE d'isolats de volailles et de porcs avec des isolats issus de cas humains met en évidence la présence de profils identiques entre les isolats de la filière avicole et ceux d'origine humaine. De plus, 47 clusters regroupent des isolats de volailles avec des isolats humains.

Ces résultats confirment ceux d'autres études utilisant la même méthode et qui montrent des caractéristiques génétiques communes entre les isolats de volailles et ceux issus de campylobactérioses humaines [12, 16]. Un lien génétique entre les isolats d'origine avicole et les isolats d'origine humaine a été aussi présenté dans des études utilisant d'autres techniques de typage [11, 23, 27].

Notre étude suggère que 44,6 % des campylobactérioses de Bretagne en 2003 et 2004 auraient pour origine la volaille. Ce pourcentage est identique à celui indiqué pour la Belgique (40 %) en 2002 après intervention suite à un problème de dioxine [25].

Une augmentation du nombre de cas humains est notée pendant la saison chaude. Cette augmentation pourrait être associée à la saisonnalité de la contamination par *Campylobacter* des élevages de volailles [10, 21] ou au tourisme.

Nos résultats montrent que les *C. coli* de porc sont toujours dans des clusters différents des isolats de volailles et/ou humains. Cette séparation génétique est décrite dans plusieurs études [8, 9]. Nos résultats indiquent donc qu'en France les deux productions animales ont majoritairement leurs propres génotypes, et que les *Campylobacters* de porcs seraient génétiquement distants de ceux isolés d'humains. Ceci a peut-être un lien avec le flambage des carcasses de porc à l'abattoir qui assainit de ce fait les carcasses en surface et au mode de préparation et de consommation des produits issus du porc.

Deux tiers des isolats de volailles trouvés dans les clusters avec des isolats humains sont des isolats obtenus à partir de contenu caecal pris en élevage et en abattoir, et un tiers de cuisses de poulets achetées en supermarché. Cette disproportion suggère qu'une part des campylobactérioses humaines pourrait être liée à un contact non alimentaire à la volaille. Ethelberg *et al.* [4] ont identifié la vie en zone rurale et le contact avec des animaux comme un facteur de risque d'infection à *Campylobacter*. Notre résultat est cohérent pour la Bretagne, une région de France caractérisée par de nombreux élevages et abattoirs. Il conviendrait cependant de mener une étude dédiée pour confirmer cette hypothèse.

Dans peu de cas, les isolats issus d'élevages et d'abattoirs partagent les mêmes clusters avec les isolats issus de supermarchés. La multiplicité des sources d'approvisionnement sur tout le territoire national pour la distribution des produits de volailles pourrait être une explication de cette observation.

Comparée à d'autres techniques de typage, le typage par RFLP/PFGE s'est révélé très informatif dans notre étude pour évaluer l'implication des filières avicoles et porcines dans les campylobactérioses humaines.

PERSPECTIVES

À ce jour, le projet *Campylobacter* Bretagne a permis d'analyser en trois ans un total de 1460 isolats de *Campylobacter* de diverses origines (humain: 408; volaille: 867; porc: 94; bovin: 9; eau de rivière: 73; et terre: 9).

Chaque isolat est identifié par un code de référence auquel lui correspond un commémoratif. Ce code et ce commémoratif sont intégrés dans une base de données ACCESS. En parallèle, les profils génétiques de chaque isolat sont conservés dans la base BioNumerics. L'analyse annuelle de l'ensemble des données de ce projet contribue ainsi à la surveillance des infections à *Campylobacter*.

RÉFÉRENCES

[1] Avrain, L., *et al.* (2003). Antimicrobial resistance in *Campylobacter* from broilers: association with production type and antimicrobial use. *Vet Microbiol* 96:267-376.

[2] Denis, M., et al. (1999) Development of a m-PCR for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Lett Appl Microbiol 29:406-410.

[3] Denis, M., et al. (2008) Diversity of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Profiles of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* From Broiler Chickens In France. Poultry Science, 87:1662-1671.

[4] Ethelberg, S., et al. (2005). Spatial distribution and registry-based case-control analysis of *Campylobacter* infections in Denmark, 1991-2001. Am J Epidemiol 162:1008-1015.

[5] Friedman C.R., et al. (2004) Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: A case-control study in FoodNet sites. Clin Infect Dis 15;38 Suppl 3:S285-96.

[6] Gallay, A., et al. (2007) *Campylobacter* antimicrobial drug resistance among humans, broiler chickens, and pigs, France. Emerg Infect Dis 13:259-601.

[7] Gillespie, I.A., et al. (2002) A case-case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infections: a tool for generating hypothesis. Emerg Infect Dis 8:937-942.

[8] Guévremont, E., et al. (2004). Characterization of *Campylobacter* isolates recovered from clinically healthy pigs and from sporadic cases of campylobacteriosis in humans. J Food Prot 67:228-234.

[9] Hopkins, K.L., et al. (2004) Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains and its relationship with host specificity, serotyping, and phage typing. J Clin Microbiol 42:229-235.

[10] Huneau-Salaün, A., et al. (2007). Risk factors for *Campylobacter* spp. colonization in French free range broiler-chicken flocks at the end of the indoor rearing period. Prev Vet Med 80:34-48.

[11] Ishihara, K., et al. (2006) Comparison of *Campylobacter* isolated from humans and food-producing animals in Japan. J Appl Microbiol 100:153-160.

[12] Lindmark, H., et al. (2004) Genetic characterization and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from meats, water, and humans in Sweden. J Clin Microbiol 42:700-706.

[13] Mazick, A., et al. (2005) An outbreak of *Campylobacter jejuni* associated with consumption of chicken, Copenhagen, 2005. Euro Surveill. 11:137-139.

[14] Mégraud, F. (2001). *Campylobacter*: Présentation du micro-organisme et des maladies associées. Journées scientifiques Afssa-Ploufragan « *Campylobacter*: bien les connaître, mieux les détecter ». Ploufragan, 29-30 novembre 2001.

[15] Menard, A., et al. (2005) Development of a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR to identify the main pathogenic *Campylobacter* spp. Clin Microbiol Infect 11:281-287.

[16] Michaud S, et al. (2005) Role of real-time molecular typing in the surveillance of *Campylobacter enteritidis* and comparison of pulsed-field gel electrophoresis profiles from chicken and human isolates. J Clin Microbiol 43:1105-1111.

[17] Moore, J.E., et al. (2005) *Campylobacter*. Vet Research 36:351-382.

[18] On, S.L., et al. (1998) Validity of Smal-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by Sall, KpnI and BamHI polymorphisms: evidence of identical clones infecting humans, poultry, and cattle. Epidemiol Infect 120:213-237.

[19] Park R.W.A., et al. (1991). Sources and survival of *Campylobacter*: relevance to enteritis and the food industry. Journal of Applied Bacteriology – Symposium supplement, 70, 97S-106S.

[20] Payot., S., et al. (2004) Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* isolated from fattenings pigs in France. Vet Microbiol 101:91-99.

[21] Refrégier-Petton, J., et al. (2001) Risk factors for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. Prev Vet Med 50:89-100.

[22] Rivoal, K., et al. (2005) Genomic diversity of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolates recovered from free range broiler farms. Comparison with isolates of various origins. Appl Environ Microbiol 71:6216-6227.

[23] Siemer BL, et al. (2005) Identification and molecular epidemiology of *Campylobacter coli* isolates from humans gastroenteritis, food and animal sources by amplified fragment length polymorphism analysis and Penner serotyping. Appl Environ Microbiol 71:1953-1958.

[24] Skirrow, M.B., (1991). Epidemiology of *Campylobacter enteritis*. IJFM, 12 : 9-16.

[25] Vellinga, A. et Van Loock, F. (2002) The dioxin crisis as experiment to determine poultry-related *Campylobacter enteritis*. Emerg Infect Dis 8:19-22.

[26] Wassenaar, T.M., et Newell, D.G. (2000) Genotyping of *Campylobacter* spp. Appl Environ Microbiol 66:1-9.

[27] Wieland, B., et al. (2005) Phenon cluster analysis as a method to investigate epidemiological relatedness between sources of *Campylobacter jejuni*. J Appl Microbiol 100:316-324.

