

CAMPYLOBACTÉRIOSE GÉNITALE BOVINE

RÉSUMÉ

Définition de la maladie : la campylobactériose génitale bovine (CGB) est une maladie vénérienne aussi connue sous le nom de campylobactériose vénérienne bovine (CVB). L'agent causal de cette maladie sexuellement transmissible est *Campylobacter fetus subsp. venerealis*, qui est divisé en deux sous-espèces étroitement apparentées : *C. fetus subsp. venerealis* et *C. fetus subsp. fetus*. Par définition, *C. fetus subsp. venerealis* est associé à la CGB caractérisée par des problèmes de fertilité et des pertes économiques considérables, notamment dans les régions d'enzootie. Les infections bovines à *C. fetus subsp. fetus* sont associées à des avortements et surviennent de façon sporadique.

Description de la maladie : la CGB est une maladie vénérienne caractérisée par de l'infertilité, une mortalité embryonnaire précoce et de l'avortement. Elle est causée par *C. fetus subsp. venerealis*, une bactérie qui possède un tropisme prononcé pour l'appareil génital des bovins. La transmission de l'agent infectieux s'opère principalement lors de la monte naturelle, mais la présence de *C. fetus subsp. venerealis* dans la semence de taureaux porteurs chroniques crée un risque de transmission de la maladie lors d'insémination artificielle.

Identification de l'agent pathogène : des échantillons provenant de taureaux, de vaches ou de fœtus peuvent être testés pour la présence de l'agent causal. Il s'agit d'une bactérie Gram négative, qui se présente sous forme de bâtonnets fins incurvés en forme de S, de « mouette » ou en spirale, et qui peut être cultivée en condition microaérobie à 37 °C pendant au moins 3 jours. La confirmation de l'isolement et le diagnostic différentiel avec *C. fetus* se fait à l'aide de méthodes biochimique ou moléculaire. L'immunofluorescence peut aussi être utilisée pour l'identification bactérienne, mais cette technique ne permet pas de différencier les sous-espèces.

Épreuves sérologiques : une épreuve immuno-enzymatique (ELISA) peut être utilisée pour vérifier l'immunité au niveau du troupeau, mais ne convient pas pour le diagnostic de l'infection au niveau individuel. Cette épreuve ne peut pas faire la différence, lors d'une infection, entre les deux sous-espèces.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : un vaccin peut être préparé à partir de cultures de *C. fetus subsp. venerealis* et/ou de *C. fetus subsp. fetus*, qui présente des antigènes communs avec *C. fetus subsp. venerealis*. Ce vaccin est inactivé par le formol et peut être administré, mélangé à un adjuvant huileux.

A. INTRODUCTION

1. La maladie

La campylobactériose génitale bovine (CGB), aussi connue sous le nom de campylobactériose vénérienne bovine (CVB), est une maladie vénérienne qui se caractérise chez le bétail par de l'infertilité, une mortalité embryonnaire précoce et de l'avortement. L'agent causal de cette maladie sexuellement transmissible est *Campylobacter fetus subsp. venerealis*. Il peut être isolé du tractus génital des bovins (par ex. le smegma préputial ou le mucus vaginal) ou des organes internes des avortons.

Campylobacter fetus comprend deux sous-espèces étroitement apparentées : *C. fetus subsp. venerealis* et *C. fetus subsp. fetus* (28). Un biovar intermédiaire de *C. fetus subsp. venerealis* a été décrit, mais il n'est pas encore clairement établi si ce biovar a des caractéristiques cliniques spécifiques. Par définition, *C. fetus subsp. venerealis* est associé à la CGB caractérisée par des problèmes de fertilité et des pertes économiques

considérables, notamment dans les régions d'enzootie. Les infections à *C. fetus* subsp. *fetus* peut être retrouvé de l'intestin des bovins et d'autres espèces animales (6). *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* peut être isolé d'avortons bovins ce qui démontre un rapport avec la clinique chez le bétail. Cependant, *C. fetus* subsp. *fetus* est associé à des cas sporadiques d'avortement tandis que *C. fetus* subsp. *venerealis* est associé à des avortements de type enzootique et des problèmes d'infertilité dans certaines régions.

Bien que *C. fetus* soit considéré comme un agent pathogène primaire en médecine vétérinaire, *C. fetus* subsp. *fetus* est reconnu à l'occasion comme un agent pathogène émergent opportuniste en médecine humaine. En général, les infections surviennent chez des personnes immunodéprimées ou au cours de la gestation et revêtent une forme systémique avec une grande variété de complications neurologiques ou vasculaires (21).

2. Taxonomie

En 1991, une révision de la taxonomie et de la nomenclature du genre *Campylobacter* a été proposée. Selon le *Manuel de Bergey*, le genre *Campylobacter* comprend 16 espèces et 6 sous-espèces. Récemment, deux espèces supplémentaires ont été proposées. Deux sous-espèces de *C. fetus* ont été identifiées. Bien que les symptômes des deux sous-espèces soient proches, elles ont été à l'origine reconnues sur la base des différences cliniques (19, 28). Les deux sous-espèces peuvent être différenciées au laboratoire par une caractéristique biochimique : la tolérance à la glycine. La sous-espèce *venerealis* est considérée comme sensible à la glycine tandis que la sous-espèce *fetus* est tolérante. Des souches du biovar *intermedius* de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* ont été décrites (18), mais leur position taxonomique doit encore être précisée. Les analyses des profils des protéines des bactéries par électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) n'ont montré aucune différence entre les deux sous-espèces de *C. fetus* (27). Des études comparatives d'hybridation ADN-ADN n'ont pas permis de montrer de différences majeures entre les sous-espèces *venerealis* et *fetus* (10). Cependant, plusieurs techniques moléculaires se sont révélées capables de différencier les deux sous-espèces, notamment l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) (12, 22, 25, 30), l'électrophorèse d'ADN sur champs pulsés (PFGE pour *pulsed-field gel electrophoresis*) (17), le typage des séquences multilocus (MLST pour *multilocus sequence typing*) (23), et l'analyse du polymorphisme de la longueur des fragments amplifiés (AFLP pour *amplified fragment length polymorphism*) (29) (voir aussi la Section B.1.h).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Isolement et identification de l'agent pathogène (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

a) Prélèvement des échantillons

i) Chez le mâle : sécrétions ou mucus du prépuce et semence

Chez le taureau, le smegma peut être récolté par différentes méthodes : grattage (20), par aspiration (3) ou par lavage du prépuce (4). Le smegma du prépuce est en général collecté par grattage et peut alors être utilisé pour l'isolement de la bactérie, ou il peut être rincé dans un tube avec environ 5 ml de tampon phosphate (PBS) contenant 1 % de formol pour servir au test d'immunofluorescence (IF). Le smegma peut aussi être récolté sur un vagin artificiel après récupération de la semence, par lavage du vagin artificiel avec 20 à 30 ml de (PBS).

Pour le lavage du prépuce, 20 à 30 ml de PBS sont introduits dans le sac préputial. Après un massage vigoureux de 15 à 20 s, le liquide est récupéré dans un flacon

La semence doit être récupérée dans les conditions les plus aseptiques possibles. Les échantillons de smegma doivent être dilués dans du PBS et sont directement ensemencés sur milieu de culture ou sur milieu de transport et d'enrichissement.

ii) Chez la femelle : mucus vaginal et cervico-vaginal

Les prélèvements sont effectués soit par aspiration soit par lavage de la cavité vaginale.

Avant aspiration, la région vulvaire est nettoyée avec un tissu de papier, et une pipette pour insémination artificielle (IA) ou une pipette de Cassou (étui bleu) est insérée dans la cavité vaginale de façon à ce que la partie antérieure atteigne le col de l'utérus (3). Une aspiration légère est réalisée en la déplaçant doucement en avant et en arrière. La pipette est ensuite retirée et le mucus collecté est ensemencé directement sur milieu de culture ou milieu de transport, et un milieu d'enrichissement.

Le mucus cervico-vaginal peut aussi être récupéré par lavage de la cavité vaginale : 20 à 30 ml de PBS sont injectés à l'aide d'un cathéter stérile monté sur seringue d'IA. Le liquide est aspiré et réinjecté

dans la cavité 4 à 5 fois, avant d'être collecté et étalé directement sur un milieu de culture ou ensemencé dans un milieu de transport et un milieu d'enrichissement. Le liquide de lavage de la cavité vaginale peut aussi être récupéré en utilisant un tampon ou une gaze que l'on place dans le vagin pendant 5 à 10 min après avoir injecté du PBS. Les échantillons de mucus vaginal obtenus par aspiration peuvent être dilués dans du PBS ou directement ensemencés sur milieu de culture ou sur milieu de transport et d'enrichissement.

Le mucus vaginal est transféré dans environ 5 ml de PBS contenant 1 % de formol.

iii) *Avortons, placentas*

Le placenta, ainsi que le contenu stomacal, les poumons et le foie du fœtus fournissent les meilleurs prélèvements pour l'isolement de l'agent causal. Les prélèvements sont inoculés directement sur des milieux d'enrichissement et de transport, ou dans du PBS à 1 % de formol pour l'épreuve de l'IF.

b) Transport des échantillons

L'utilisation d'un milieu de transport est indispensable si les prélèvements ne sont pas testés au laboratoire le jour même de la collecte. Pour l'envoi au laboratoire, si l'échantillon n'est pas inoculé dans un milieu de transport, il doit être dans un container réfrigéré (entre 4 et 10 °C) et protégé de la lumière.

Plusieurs milieux de transport et d'enrichissement sont disponibles, tels que les milieux de Clark, de Lander, SBL, de Foley et Clark, de Weybridge et le milieu de Cary blair (7, 11, 15).

Certains des milieux d'enrichissement et de transport précités contiennent de la cycloheximide. En raison du risque potentiel de toxicité de ce produit, l'amphotéricine B peut être une solution alternative.

c) Traitement des échantillons

À leur arrivée au laboratoire les échantillons sont directement ensemencés en milieu de culture ou travaillés plus tard si nécessaire

i) *Prélèvements du tractus génital*

Le liquide de lavage préputial est centrifugé (3 500 *g*) pour concentrer le prélèvement. L'échantillon final (réduit à 250 µl) est ensemencé sur un milieu de culture (directement et/ou après filtration).

Si le mucus vaginal n'est pas trop visqueux, il peut être ensemencé directement ou dilué dans un volume égal de PBS. Si le mucus vaginal est très visqueux, il peut toutefois être nécessaire de le liquéfier en ajoutant un volume égal de solution de cystéine (solution aqueuse de cystéine sous forme d'hydrochlorure, concentrée à 0,25 g/100 ml, à pH 7,2 et stérilisée par filtration). Après 15 à 20 min, le mucus dilué et liquéfié est ensemencé en milieu de culture.

ii) *Avortons et placentas*

Le contenu stomacal des fœtus est directement ensemencé en milieu de culture approprié. Les prélèvements d'organes sont désinfectés en surface à la flamme puis homogénéisés. L'homogénat est ensuite ensemencé en milieu de culture.

Après avoir lavé les membranes placentaires avec du tampon PBS pour éliminer les principales contaminations de surface, les villosités du chorion sont grattées puis mises à semer en milieu de culture.

d) Isolement de *Campylobacter fetus*

i) *Milieu de culture pour isolement*

De nombreux milieux sont couramment utilisés pour l'isolement bactériologique de la campylobactériose génitale bovine. Il convient de remarquer que plusieurs milieux utilisés pour l'isolement de *Campylobacter* spp. ne conviennent pas pour l'isolement de *C. fetus* du fait des produits anti-microbiens (par ex. les céphalosporines) qui pourraient inhiber sa croissance (24). La plupart des milieux contiennent de la cycloheximide. En raison de sa toxicité potentielle, cet agent anti-fongique peut être remplacé par de l'amphotéricine B. Le milieu sélectif recommandé pour l'isolement de *C. fetus* est le milieu de Skirrow. La base de ce milieu est un milieu au sang (avec 5 à 7 % de sang défibriné [lysé]) et contient des agents sélectifs : sulfate de polymyxine B (2,5 UI/ml), du triméthoprim (5 µg/ml), de la vancomycine (10 µg/ml) et de la cycloheximide (50 µg/ml).

Une autre solution consiste en un milieu au sang (5 à 7 %) non sélectif en association avec une filtration (0,65 µm). Cependant, comparée à la méthode du milieu sélectif, elle peut être moins sensible.

Des contrôles de qualité doivent être réalisés sur chaque lot de milieu en utilisant des souches de référence.

ii) *Conditions d'incubation*

Les boîtes sont mises à incuber à 37 °C dans des conditions de micro-aérobiose, à savoir 5 à 10 % d'oxygène, 5 à 10 % de dioxyde de carbone et préférentiellement 5 à 9 % d'hydrogène, pour une croissance optimale (26). Ces conditions d'incubation en atmosphère micro-aérobie peuvent être obtenues par différentes méthodes. Certains laboratoires utilisent des récipients avec évacuation répétée des gaz et remplacement de l'atmosphère par utilisation de bouteilles de gaz spécifiques. Des kits pour la production de gaz sont disponibles dans le commerce. Des incubateurs spécifiques, permettant de reproduire différentes atmosphères, peuvent également être utilisés.

Les conditions de culture et d'incubation sont systématiquement contrôlées en utilisant des souches contrôles connues de *C. fetus* subsp. *fetus* et *C. fetus* subsp. *venerealis*. De tels témoins doivent être réalisés pour chaque essai de mise en culture.

e) **Identification des espèces de *Campylobacter***

i) *Morphologie des colonies*

Les colonies de *C. fetus* apparaissent normalement en milieu de culture après 2 à 5 jours. Pour éviter le masquage des colonies spécifiques par des bactéries contaminantes, il est recommandé de vérifier tous les jours la culture et de sous cloner les bactéries suspectées d'être *C. fetus*. Après 3 à 5 jours d'incubation, les colonies positives mesurent entre 1 et 3 mm de diamètre. Elles sont légèrement gris rosées, rondes, convexes, lisses et brillantes et à bords réguliers.

ii) *Morphologie au microscope*

Campylobacter est une bactérie mobile mais cette propriété peut disparaître lors de passages en cultures. *Campylobacter* prend souvent la forme d'un fin bacille incurvé de 0,3 à 0,4 µm de large et de 0,5 à 8 µm de long. Des formes courtes (en forme de virgule), moyennes (en forme de S) et longues (hélice à plusieurs spirales) peuvent être observées simultanément à l'état frais. Les bactéries sont systématiquement séparées les unes des autres. Les cultures anciennes peuvent contenir des bactéries de type coccus.

iii) *Tests biochimiques* : voir tableau 1

iv) *Atmosphère* : *Campylobacter* ne pousse pas en conditions aérobies

f) **Identification immunologique de *Campylobacter fetus***

La technique d'immunofluorescence (IF) peut être utilisée pour identifier directement la bactérie ou pour confirmer l'identification d'une souche après isolement. Elle ne permet pas de différencier les différentes sous-espèces.

i) *Préparation des sérums immuns*

Des souches de *Campylobacter*, de préférence des souches de référence provenant de collections reconnues (*C. fetus* subsp. *venerealis* ou *C. fetus* subsp. *fetus*), sont cultivées séparément sur gélose au sang dans des conditions micro-aérobies à 37 °C pendant 3 jours. Les bactéries sont suspendues dans du PBS, pH 7,2 et lavées 2 fois par centrifugation. Des lapins âgés de 3 mois sont inoculés par voie intramusculaire avec 2 ml d'une suspension contenant 10^{11} bactéries/ml de sous-espèces de *C. fetus* dans du PBS, mélangée à de l'adjuvant incomplet de Freund. L'inoculum est injecté dans 4 sites, à raison de 0,5 ml par site. Des prélèvements sanguins sont réalisés sur les animaux avant inoculation puis toutes les semaines. Quand les titres de sérum atteignent un plateau (détection par un test d'agglutination ou d'immunofluorescence), 0,1 à 1 ml d'une solution de 10^{10} bactéries vivantes/ml est injecté par voie intraveineuse aux lapins. Le sérum est récupéré 7 jours plus tard par saignée des lapins. Les sérums hétérologues sont mélangés. Dans une étude récente, un conjugué préparé à partir d'IgY de poulet a été proposé comme alternative aux sérums de lapin. Des anticorps monoclonaux ont été décrits, qui peuvent être utilisés pour le diagnostic immunologique de *C. fetus* (2).

ii) *Préparation des conjugués*

Les conjugués sont préparés comme décrit par Harlow *et al.* (9). La dilution de travail du conjugué doit être déterminée par titrage en échiquier sur des frottis de culture de *C. fetus* en testant différentes dilutions de contrôle positif et négatif. La concentration de travail correspond au double de la concentration minimale qui produit une fluorescence nette avec les colonies de *C. fetus*.

iii) *Préparation des échantillons*

Les liquides génitaux (smegma préputial, mucus vaginal) ou le contenu de l'estomac du fœtus sont rincés dans environ 5 ml de PBS à 1 % de formol. Deux centrifugations sont réalisées : d'abord les échantillons sont centrifugés à 600 *g* pendant 10 min à 4 °C pour éliminer les débris, puis le surnageant est centrifugé à 8 000 *g* pendant 30 min à 4 °C. Le culot est dissout dans 100 µl de surnageant restant.

iv) *Test d'immunofluorescence (14)*

Les prélèvements (20 µl) sont fixés sur deux lames de microscope. Les lames sont séchées à l'air et fixées à l'acétone à –20 °C pendant 30 min ou à l'éthanol entre 18 et 25 °C pendant 30 min. Les lames sont séchées à l'air et l'antisérum conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine est ajouté à la dilution appropriée. La coloration est réalisée à l'obscurité en chambre humide pendant 30 min à 37 °C. Par la suite, les lames sont lavées 3 fois en tampon PBS (10 min pour chaque lavage). Elles sont ensuite montées en tampon glycérol (90 % [v/v] glycérol : 10 % PBS). Les lamelles sont posées pour éviter le dessèchement et les lames sont examinées sous microscope à fluorescence (lampe ultraviolet) au microscope à épi-fluorescence. Des lames témoins positives et négatives doivent être utilisées à chaque test. Les souches de référence de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* et de *C. fetus* subsp. *fetus* sont utilisées comme témoin positif, et des souches d'autres espèces de *Campylobacter* comme témoin négatif. Les échantillons présentant des bactéries fluorescentes avec la morphologie typique de *C. fetus* sont considérés comme positif.

g) *Identification biochimique des sous-espèces de Campylobacter fetus*

Ces tests (voir Tableau 1) doivent être réalisés à partir de cultures pures.

Tableau 1. Caractéristiques différentielles des espèces de *Campylobacter* qui peuvent être isolées du tractus génital de bovin et d'avortons (d'après le *Manuel de Bergey*, 2^{ème} édition, 2005)

	25 °C	42 °C	Oxydase	Catalase	NaCl 3,5 %	Glycine 1 %	H ₂ S ^(b)	Acide Nalidixique
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	V	–	+	V	–	–	–	V
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	+	V ^(a)	+	+	–	+	–	R
<i>C. jejuni</i>	–	V ^(c)	+	V ^(d)	–	V	–	S ^(e)
<i>C. hyointestinalis</i>	–	+	+	+	–	V	V	R
<i>C. sputorum</i>	–	+	+	V	+	+	+	V

(a) = bien que *C. fetus* n'appartiennent pas aux *Campylobacter* spp. thermophiles, un grand nombre de souches de cette espèce cultive à 42 °C ; (b) = sur milieu gélosé lactosé, saccharosé et glucosé au citrate de fer ammoniacal (triple sugar iron agar medium) ; (c) = *C. jejuni* subsp. *jejuni* est positif, *C. jejuni* subsp. *doylei* est négatif ; (d) = *C. jejuni* subsp. *jejuni* est positif, *C. jejuni* subsp. *doylei* est variable ; (e) = selon le *Manuel de Bergey* les souches sont sensibles, mais des souches résistantes ont été fréquemment décrites ; (+) = réaction positive ou croissance et (–) = réaction négative ou absence de croissance de la souche sur milieu approprié et sous conditions de culture spécifique (voir Section B.1.d ii) ; V = résultats variables ; S = sensible ; R = résistant.

i) *Croissance à 25 °C et à 42 °C*

Une suspension bactérienne (~McFarland n°1) est ensemencée sur deux boîtes de milieu au sang. Chaque boîte est incubée dans les conditions atmosphériques spécifiées (voir Section B.1.d ii) à 25 °C et 42°C. Des souches témoins sont testées en parallèle.

ii) *Oxydase et catalase*

Les tests sont réalisés selon les protocoles bactériologiques normalisés. Des souches témoins sont testées en parallèle.

iii) *Croissance en présence de chlorure de sodium*

Une suspension bactérienne est ensemencée dans des milieux au sang contenant 3,5 % de NaCl (15 ml de milieu au sang + 2,04 ml d'une solution 5 M de NaCl), et dans des milieux au sang sans NaCl. L'incubation est faite dans les conditions atmosphériques spécifiées (voir Section B.1.d ii). Des souches témoins sont testées en parallèle.

iv) *Test de croissance en présence de 1 % de glycine*

Une suspension bactérienne (~McFarland n°1) est ensemencée sur un milieu glycine (15 ml de milieu sanguin + exactement 1,65 ml de solution aqueuse de glycine à 10 %, stérilisée par filtration) et sur le même milieu sans glycine. L'incubation est réalisée dans les conditions atmosphériques spécifiées

(voir Section B.1.d ii). Deux souches témoins (*subsp. venerealis* et *fetus*) sont testées en parallèle. Dans la mesure où les souches sont délicates à manipuler, des changements minimes dans le milieu peuvent être importants et l'absence de croissance en présence de glycine doit être considérée uniquement comme une présomption de *C. fetus* subsp. *venerealis*. La reproductibilité du test est faible et des souches à caractère intermédiaire ont été décrites (18).

v) *Test de production de sulfite d'hydrogène en milieu TSI*

Le test au sulfite d'hydrogène (H₂S) est réalisé sur milieu agar lactosé, saccharosé et glucosé au citrate de fer ammoniacal (TSI pour *triple sugar iron agar*) composé de peptone (20 g/litre), d'extrait de viande (3 g/litre), de chlorure de sodium (5 g/litre), de citrate de fer (0,5 g/litre) de thiosulfate de sodium (Na₂S₂O₃) (0,5 g/litre), de lactose (10 g/litre), de sucrose (10 g/litre), de glucose (1 g/litre), de rouge phénol (0,024 g/litre), d'agar (11 g/litre) et d'eau distillée (qsp 1 000 ml). Ce milieu est distribué dans des tubes puis stérilisé à 115 °C pendant 15 min et mis à refroidir inclinés de façon à obtenir une pente. Il peut être préparé à la demande ou être conservé en conditions classiques pendant environ 3 semaines. Une suspension bactérienne (~McFarland n°1) est ensemencée sur la pente et dans la gélose à l'aide d'une anse de platine. Un changement de couleur du rouge au noir indique une production de H₂S. Des souches témoins sont testées en parallèle.

vi) *Test de production de sulfite d'hydrogène en milieu cystéine* (non inclus dans le tableau 1)

Le test H₂S est réalisé en bouillon Brucella contenant 0,02 % de cystéine. La production de H₂S est détectée par une bandelette d'acétate de plomb attachée à l'intérieur du tube. Une suspension bactérienne (~McFarland n°1) est ensemencée dans le milieu. Un noircissement de la bandelette est considéré comme une réaction positive. Des souches témoins sont testées en parallèle.

vii) *Test de sensibilité à la céphalothine et à l'acide nalidixique*

La sensibilité à la céphalothine (CN) et à l'acide nalidixique (AN) est testée par la méthode des disques contenant chacun 30 µg de CN ou AN.

Lors du test, des cultures de 72 h des différentes souches sont mises en suspension dans du PBS à la concentration de 10⁹ bactéries/ml. À partir de cette suspension, 100 µl sont déposés sous forme d'une couche égale sur un milieu de gélose sanguine basique. Les boîtes de gélose sont déshumidifiées avant le dépôt de la culture bactérienne sur la surface. Les disques de sensibilité sont ensuite placés sur les dépôts de bactéries. Les cultures sont incubées à 37 °C dans les conditions atmosphériques spécifiées (voir Section B.1.d ii), et examinées après 48 et 72 h. Une zone d'inhibition d'au moins 3 mm autour du disque indique que la souche testée est sensible à l'antibiotique. Toutes les souches de *C. fetus* subsp. *fetus* et la plupart des souches de *C. fetus* subsp. *venerealis* sont résistantes au AN (16). Toutes les souches de *C. fetus* sont sensibles au CN (16).

h) Identification moléculaire des sous-espèces de *Campylobacter fetus*

Plusieurs méthodes moléculaires pour l'identification des sous-espèces de *C. fetus* ont été décrites, notamment le séquençage du gène 16S (8, 17), la PFGE (17), l'AFLP (29), et la MLST (23). Cependant, la plupart de ces méthodes sont longues à mettre en œuvre, nécessitent du matériel coûteux et de l'expérience. Les laboratoires de diagnostic pourront utiliser plus facilement la PCR. Plusieurs méthodes de PCR sont réputées spécifiques de la sous-espèce en particulier celles mises au point par Hum *et al.* (12), Wang *et al.* (30) et, plus récemment, par Tu *et al.* (22) et Van Bergen *et al.* (25).

La technique de PCR multiplex décrite par Hum *et al.* (12) est la plus couramment citée. Elle permet l'amplification d'un fragment d'ADN spécifique de *C. fetus* (plus petit d'environ 200 pb que le fragment de 960 pb décrit dans la publication d'origine), ainsi qu'un fragment spécifique de *C. fetus* subsp. *venerealis*. Cette technique de PCR multiplex permet donc la différenciation des deux sous-espèces (un produit d'amplification pour *C. fetus* contre deux produits d'amplification pour *C. fetus* subsp. *venerealis*). Les souches de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* biovar *intermedius* n'ont pas été incluses dans l'étude de validation de la PCR de Hum, mais des isolats identifiés comme appartenant au biovar *intermedius* par AFLP, sont classés grâce à la PCR de Hum soit comme *C. fetus* subsp. *fetus* soit comme *C. fetus* subsp. *venerealis* (23). La comparaison de la méthode PCR avec l'AFLP et la MLST (23) ou avec le test à la glycine (31) confirme que la PCR peut donner de faux résultats positifs ou négatifs.

La technique de PCR décrite par Wang *et al.* (30) ne révèle qu'un produit spécifique de *C. fetus* subsp. *fetus*. Ces résultats n'ont été obtenus que sur un nombre très limité de souches. L'évaluation récente de ses performances sur un plus grand nombre d'échantillons a donné des résultats à la fois faux positifs et faux négatifs en ce qui concerne la différenciation des sous-espèces (25).

Les techniques d'amplification au hasard de l'ADN polymorphique (RAPD pour *random amplification of polymorphic DNA*) décrites par Tu *et al.* (22) ont été publiées récemment et n'ont été évaluées que sur un petit nombre de souches de *C. fetus* subsp. *venerealis*. Leurs performances devront être évaluées sur un plus grand nombre de souches.

La technique de PCR décrite récemment par Van Bergen et al. (25) a montré une parfaite concordance avec l'AFLP pour l'identification de *C. fetus* subsp. *venerealis* et est donc considérée comme la meilleure méthode actuellement disponible pour la détection de *C. fetus* subsp. *venerealis*. Cependant, cette technique ne reconnaît pas les souches définies par l'AFLP comme étant *C. fetus* subsp. *venerealis* biovar *intermedius*.

2. Épreuves sérologiques/détection d'anticorps

Un test ELISA est disponible pour détecter les IgA sécrétoires spécifiques dans le mucus vaginal après avortement dû à *C. fetus* subsp. *venerealis*. Ces anticorps sont persistants et leur concentration reste constante plusieurs mois dans le mucus vaginal (13).

Le premier prélèvement doit être réalisé après la période d'involution (en général 1 semaine après l'avortement) quand le mucus vaginal devient clair.

Un test ELISA pour la détection d'une réponse humorale sérique en IgG après vaccination a été décrit.

a) Préparation de l'antigène et adsorption sur plaque

Des cultures de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* sont récupérées dans du PBS à 0,5 % de formol pendant 1 h, centrifugées à 17 000 *g*, lavées 2 fois dans du PBS, puis re-suspendues dans du tampon carbonate 0,05 M à pH 9,6. La densité finale est ajustée à 0,21 à 610 nm ($DO_{610\text{ nm}} = 0,21$). Des plaques de titrage en polystyrène à fond plat, sensibilisées avec 10 µl d'antigène sont mises à incuber à 4 °C pendant la nuit, puis stockées à -20 °C. Avant utilisation, les plaques sont rincées 2 fois à l'eau distillée et légèrement tapotées pour éliminer l'humidité.

• Protocole

- i) Ajouter le mucus vaginal dilué (100 µl) à chaque puits et incuber la plaque à 37 °C pendant 2 h. Laver les plaques comme précédemment et ajouter 100 µl de sérum de lapin anti IgA bovine. Après 2 h d'incubation à 37 °C, laver les plaques et ajouter dans chaque puits 100 µl de sérum de chèvre anti IgG de lapin, couplé à la peroxydase de raifort. Après 2 h d'incubation à 37 °C, laver les plaques, ajouter 100 µl de substrat (0,8 mg/ml d'acide 5 amino-salicylique, pH 6,0) et activer le substrat par l'ajout immédiat de peroxyde d'hydrogène 1 M, 0,2 % [H_2O_2]). Laisser les plaques à température ambiante pendant 30 min, arrêter la réaction par addition de 50 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) 3 M. L'absorbance est mesurée sur lecteur de plaque ELISA à 450 nm. Chaque échantillon est éprouvé en double et des témoins positif et négatif sont réalisés sur chaque plaque. Les mesures de densité optique (DO) du test sont corrigées par rapport à celles des témoins positif et négatif selon la formule suivante :

$$\text{Résultat} = \frac{DO_{\text{échantillon}} - DO_{\text{témoin négatif}}}{DO_{\text{témoin positif}} - DO_{\text{témoin négatif}}} \times 100$$

Le test est positif si le résultat est supérieur à 40. Les animaux vaccinés ne répondent pas à ce test ELISA IgA car leur mucus ne contient que des anticorps d'isotype IgG.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Deux groupes d'antigènes de *C. fetus* sont reconnus par le système immunitaire : les antigènes flagellaires thermolabiles « H » et les antigènes somatiques thermostables « O ». En outre, un antigène capsulaire « K » doit être présent. L'antigène K est rapidement détruit dans les conditions *in vitro*. Les vaccins doivent nécessairement contenir ces différents antigènes. D'autres préparations vaccinales ont été décrites (5). Un vaccin expérimental contre *C. fetus* subsp. *fetus* induit une immunité contre *C. fetus* subsp. *venerealis* car les souches partagent des antigènes communs (1). Cependant, l'ajout d'une seconde souche de *C. fetus* subsp. *venerealis* dans le produit biologique est largement pratiqué et fortement recommandé. La présence de 4 à 5 glycoprotéines thermosensibles, immunogènes et communes à plusieurs souches de *C. fetus* subsp. *venerealis* et *C. fetus* subsp. *fetus* est essentielle pour un vaccin efficace. Leurs présences doivent être confirmées. La concentration du vaccin (poids sec) doit être d'environ 40 mg de protéine par dose afin d'obtenir un bon niveau de protection.

Dans les troupeaux infectés, tous les bovins d'élevage (taureaux, vaches et génisses) doivent être vaccinés 2 fois avant la saison de monte. Dans la plupart des cas, le vaccin réduit la durée d'infection mais les vaches peuvent rester infectées d'une saison à l'autre. Les taureaux nécessitent aussi 2 doses vaccinales par an, car il est

possible que le vaccin ne soit pas toujours efficace lors d'infection en phase terminale. L'année suivante, les taureaux et les génisses de remplacement doivent être vaccinés, et à partir de la 3^e année, les taureaux sont vaccinés annuellement.

Dans les élevages non infectés, seuls les taureaux sont vaccinés 1 fois par an, avec deux doses à 21 jours d'intervalle (2 semaines avant le début de la saison de monte).

1. Gestion des semences bactériennes

a) Caractéristiques de la semence bactérienne

La semence consiste en une production homogène et importante d'une culture de *C. fetus* subsp. *fetus* ou *C. fetus* subsp. *venerealis*, qui a été caractérisée de manière précise quant à sa pureté et son identité et qui a été conservée en petites fractions aliquotes.

b) Méthode de culture

La croissance initiale de la semence est obtenue en milieu semi-solide. C'est un milieu basique additionné de 0,16 % d'agar. Le milieu de base est composé d'un milieu de croissance Brucella (2,8 %), d'extrait de levure (0,5 %), de succinate de sodium (1,2 %), et de chlorure de calcium (0,001 %). Ce milieu initial est conservé 3 jours à 37 °C dans les conditions atmosphériques spécifiées (voir Section B.1.d.ii.). La culture bactérienne en croissance est transférée dans des tubes supplémentaires contenant le milieu semi-solide et incubée pendant 48 h. La culture bactérienne en croissance qui en résulte est utilisée pour la production de vaccins.

Cette culture est conservée à 4 °C.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

La semence bactérienne doit être indemne d'organismes de contamination. Sa pureté doit être vérifiée par une méthode valide de mise en culture.

Il n'est pas facile de tester l'efficacité du vaccin dans des conditions de laboratoire. L'efficacité est évaluée sur le terrain sur base d'observations épidémiologiques.

2. Méthode de fabrication

La culture bactérienne initiale estensemencée dans un milieu de culture composé d'un milieu de base additionné de 0,025 % de thioglycollate. Ces cultures sont incubées à 37 °C pendant 24 h sous agitation à 80 tours/min. Les liquides sont récupérés et du formol est ajouté à une concentration finale de 0,2 % (0,74 g/litre).

Le vaccin est mélangé à un adjuvant sous forme d'émulsion huileuse pour allonger la période d'immunité.

3. Contrôle en cours de fabrication

L'identité de la bactérie du lot doit être vérifiée par mise en culture et identification, de même que l'absence de germes contaminants.

4. Contrôle des lots

a) Stérilité

Les tests de stérilité et d'absence de contamination par du matériel biologique sont décrits au Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

Le processus d'inactivation doit être total et la méthode de vérification de l'inactivation doit être validée avant son emploi. L'inactivation est vérifiée par l'inoculation de l'équivalent d'une dose de vaccin préparé sur le même milieu et dans les mêmes conditions que celles définies lors du processus de production. Cette culture est incubée pendant 72 h dans les mêmes conditions. Après ce temps il ne doit y avoir aucune évidence de croissance bactérienne. Le produit final doit aussi être indemne de bactéries vivantes et de contaminants fongiques lors de tests de culture appropriés.

Deux cobayes sont inoculés avec 2 ml de produit, soit par voie intramusculaire, soit par voie sous-cutanée. Ils ne doivent pas présenter de réactions, attribuables au vaccin, pendant les 7 jours d'observation qui suivent l'inoculation.

c) Activité

La capacité du vaccin à induire une réponse humorale est testée chez le lapin par mesure de la séroconversion. Les titres de sérum sont mesurés par immunofluorescence ou par un test d'agglutination. Cinq lapins séronégatifs, à la dilution de sérum 1/100, sont vaccinés par voie sous-cutanée avec la moitié de la dose utilisée chez les bovins à raison de 2 injections à 14 jours d'intervalle. Le sérum d'au moins 4 lapins, récolté 14 jours après la seconde injection, doit montrer une augmentation du titre en anticorps d'un facteur 4.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Voir section C.4.b.

b) Activité

Voir section C.4.C.

• **Remerciements**

Certaines parties de ce chapitre ont été inspirées ou reproduites à partir du chapitre sur la campylobactériose génitale bovine du *Manuel terrestre* des éditions préalables. Les auteurs sont reconnaissants au Dr. C. Campero (Argentine) pour les échanges fructueux qu'ils ont pu avoir avec lui.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BOUTERS R., DE KEYSER J., VANDEPLASSCHE M., VAN AERT A., BRONE E. & BONTE P. (1973). *Vibrio fetus* infections in bulls: curative and preventive vaccination. *Br. Vet. J.*, **129**, 52–57.
2. BROOKS B.W., ROBERTSON R.H., LUTZE-WALLACE C.L. & PFAHLER W. (2002). Monoclonal antibodies specific for *Campylobacter fetus* lipopolysaccharides. *Vet. Microbiol.*, **87**, 37–49.
3. CAMPERO C.M., MOORE D.P., ODEON A.C., CIPOLLA A.L. & ODRIOSOLA E. (2003). Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Vet. Res. Commun.*, **27**, 359–369.
4. CLARKE B.L. & DUFTY J.H. (1978). Isolation of *Campylobacter fetus* from bulls. *Aust. Vet. J.*, **54**, 262–263.
5. CLARKE B.L., DUFTY J.H. & MONSBOURGH M.J. (1972). Immunisation against bovine vibriosis. 1. Comparison of the protective properties of bacterins prepared by two methods. *Aust. Vet. J.*, **48**, 376–381 and 382–384.
6. GARCIA M.M., EAGLESOME M.D. & RIGBY C. (1983). Campylobacters important to veterinary medicine. *Vet. Bull.*, **53**, 793–818.
7. GARCIA M.M., STEWART R.B. & RUCKERBAUER G.M. (1984). Quantitative evaluation of a transport-enrichment medium for *Campylobacter fetus*. *Vet. Rec.*, **115**, 434–436.
8. GORKIEWICZ G., FEIERL G., SCHÖBER C., DIEBER F., KÖFER J., ZECHNER R. & ZECHNER E.L. (2003). Species-specific identification of Campylobacters by partial 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 2537–2546.
9. HARLOW E. & LANE D. (1988). Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York, USA.
10. HARVEY S.M. & GREENWOOD J.R. (1983). Relationship among catalase-positive Campylobacters determined by deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridisation. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **33**, 275–284.

11. HUM S., BRUNNER J., MCINNES A., MENDOZA G. & STEPHENS J. (1994). Evaluation of cultural methods and selective media for the isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* from cattle. *Aust. Vet. J.*, **71**, 184–186.
12. HUM S., QUINN K., BRUNNER J. & ON S.L.W. (1997). Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Aust. Vet. J.*, **75**, 827–831.
13. HUM S., STEPHENS L.R. & QUINN C. (1991). Diagnosis by ELISA of bovine abortion due to *Campylobacter fetus*. *Aust. Vet. J.*, **68**, 272–275.
14. MELICK P. W., WINTER A.J. & MCENTEE K. (1965). Diagnosis of vibriosis in the bull by use of the fluorescent antibody technic. *Cornell Vet.*, **55**, 280–294.
15. MONKE H.J., LOVE B.C., WITTUM T.E., MONKE D.R. & BYRUM B.A. (2002). Effect of transport enrichment medium, transport time, and growth medium on the detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *J. Vet. Invest.*, **14**, 35–39.
16. ON S.L.W. (1996). Identification methods for Campylobacters, Helicobacters and related organisms. *Clin. Microb. Rev.*, **9**, 405–422.
17. ON S.L.W. & HARRINGTON C.S. (2001). Evaluation of numerical analysis of PFGE-DNA profiles for differentiating *Campylobacter fetus* subspecies by comparison with phenotypic, PCR and 16s rDNA sequencing methods. *J. Appl. Microbiol.*, **90**, 285–293.
18. SALAMA S.M., GARCIA M.M. & TAYLOR D.E. (1992). Differentiation of the subspecies of *Campylobacter fetus* by genomic sizing. *Int. J. Syst. Bact.*, **42**, 446–450.
19. SEBALD M. & VERON M. (1963). Base DNA Content and Classification of *Vibrios*. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, **105**, 897–910.
20. TEDESCO L.F., ERRICO F. & DEL BAGLIVI P.L. (1977). Comparison of three sampling methods for the diagnosis of genital vibriosis in the bull. *Aust. Vet. J.*, **53**, 470–472.
21. THOMPSON S.A. & BLASER M.J. (2000). Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections. In *Campylobacter*, Second Edition, I. Nachamkin & Blaser M.J., ed. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA, 321–347.
22. TU Z.C., EISNER W., KREISWIRTH B.N. & BLASER M.J. (2005). Genetic divergence of *Campylobacter fetus* strains of mammal and reptile origins. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 3334–3340.
23. VAN BERGEN M.A.P., DINGLE K.E., MAIDEN M.C., NEWELL D.G., VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS L., VAN PUTTEN J.P. & WAGENAAR J.A. (2005). Clonal nature of *Campylobacter fetus* as defined by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 5888–5898.
24. VAN BERGEN, M.A.P., LINNANE S., VAN PUTTEN J.P. & WAGENAAR J.A. (2005). Global detection and identification of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **24**, 1017–1026.
25. VAN BERGEN M. A. P., SIMONS G., VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS L., VAN PUTTEN J.P., ROMBOUT J., WESLEY I. & J. WAGENAAR A. (2005). Amplified fragment length polymorphism based identification of genetic markers and novel PCR assay for differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *J. Med. Microbiol.*, **54**, 1217–1224.
26. VANDAMME P. (2000). Taxonomy of the family Campylobacteraceae. In: *Campylobacter*, Second Edition Nachamkin I. & Blaser M.J., eds. ASM Press, Washington DC, USA, 3–26.
27. VANDAMME P., POT B., FALSEN E., KERSTERS K. & DE LEY J. (1990). Intra- and interspecific relationships of veterinary *Campylobacters* revealed by numerical analysis of electrophoretic protein profiles and DNA:DNA hybridizations. *System. Appl. Microbiol.*, **13**, 295–303.
28. VÉRON M. & CHATELAIN R. (1973). Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of the neotype strain for the type species *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **23**, 122–134.

29. WAGENAAR J.A., VAN BERGEN M.A.P., NEWELL D.G., GROGONO-THOMAS R. & DUIM B. (2001). Comparative study using amplified fragment length polymorphism fingerprinting and phenotyping to differentiate *Campylobacter fetus* strains isolated from animals. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 2283–2286.
30. WANG G., CLARK C.G., TAYLOR T.M., PUCKNELL C., BARTON C., PRICE L., WOODWARD D.L. & RODGERS F.G. (2002). Colony multiplex PCR assay for the identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 4744–4747.
31. WILLOUGHBY K., NETTLETON P.F., QUIRIE M., MALEY M.A., FOSTER G., TOSZEGHY M. & NEWELL D.G. (2005). A multiplex polymerase chain reaction to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *Campylobacter fetus* -species *venerealis*: use on UK isolates of *C. fetus* and other *Campylobacter* spp. *J. Appl. Microbiol.*, **99**, 758–766.

*
* *

N.B. : Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour la campylobactériose génitale bovine (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).