

## **CAMPYLOBACTER JEJUNI ET CAMPYLOBACTER COLI**

---

### **RÉSUMÉ**

*Campylobacter jejuni* et *C. coli* sont les espèces de *Campylobacter* les plus fréquemment isolées chez l'homme infecté ou malade et peuvent être transmis de l'animal à l'homme directement par contact avec les animaux ou par le biais de consommation ou de manipulation de produits alimentaires d'origine animale.

*C. jejuni* comme *C. coli* colonisent fréquemment le tractus intestinal de la plupart des mammifères et oiseaux (en particulier les poulets, dindons et canards). La colonisation est en générale persistante, parfois avec excrétion intermittente et d'ordinaire sans signe clinique. La contamination fécale de la viande (particulièrement la viande de volaille) pendant les opérations d'abattage est considérée comme une source majeure d'intoxications alimentaires humaines. La colonisation par *Campylobacter* des jeunes animaux de compagnie ou de rente (chatons, chiots, porcelets, agneaux et veaux), de certains petits mammifères utilisés pour l'expérimentation animale (furets et rats) et de quelques espèces aviaires peut être associée avec une maladie intestinale mais savoir si *Campylobacter* constitue l'agent étiologique n'est pas facile. Chez l'homme les infections extra-intestinales incluant la bactériémie, sont observées et certaines séquelles de l'infection comme les polyneuropathies bien que rares peuvent être graves. La prévalence de telles complications chez l'animal n'est pas connue. *C. jejuni* et *C. coli*, de même que *C. fetus*, peuvent également être isolés d'avortons de bovins ou ovins, sans doute du fait de translocations à travers la muqueuse intestinale ou lors d'infections ascendantes.

**Isolement de l'agent pathogène :** chez les mammifères et chez les oiseaux, le dépistage de la colonisation intestinale repose sur l'isolement du micro-organisme à partir des fèces, d'écouvillons rectaux et/ou des contenus caecaux. Dans le cas d'avortons, *Campylobacter* peut être isolé de l'estomac du fœtus ou d'organes placentaires ou internes. La contamination des produits alimentaires d'origine animale est détectée par l'isolement de *Campylobacter* directement ou après enrichissement sélectif. Les méthodes basées sur l'amplification en chaîne par la polymérase sont décrites pour la détection de *Campylobacter* dans des échantillons fécaux ou intestinaux ou des échantillons de viande après enrichissement.

**Identification de l'agent pathogène :** *Campylobacter jejuni* et *C. coli* sont des bactéries thermotolérantes, à coloration de Gram négative, très mobiles, qui nécessitent pour une croissance optimale des conditions micro-aérophiles à 37-42°C. Des milieux gélosés contenant des antibiotiques sélectifs sont nécessaires pour isoler ces bactéries à partir d'échantillons fécaux ou intestinaux et d'échantillons de viande après enrichissement. Sinon leur grande mobilité peut être mise à profit pour l'isolement par des techniques de filtration. Des méthodes d'enrichissement peuvent être nécessaires pour des micro-organismes qui ont subi des stress environnementaux, tels que des variations de température, une déshydratation, le contact avec l'oxygène de l'air, une carence en nutriments et un choc osmotique, par exemple lors du transport des échantillons. Des techniques d'enrichissement peuvent également être utilisées pour détecter des *campylobacters* présents en faible nombre (par exemple sur des échantillons de viande).

Une confirmation préliminaire des isolats peut être faite par microscopie optique. Les micro-organismes caractéristiques en phase exponentielle de croissance sont de courts bacilles à coloration de Gram négative, en forme de S. Dans des cultures plus âgées, les formes coccoïdes prédominent. En microscopie à contraste de phase, les micro-organismes ont une mobilité rapide caractéristique en vrille. L'identification phénotypique est basée sur des réactions sous différentes

conditions de croissance. Des tests biochimiques et moléculaires peuvent être utilisés pour identifier différentes espèces de *Campylobacter*. En général, *C. jejuni* peut être distingué de tous les autres *campylobacters* par l'hydrolyse de l'hippurate.

Il existe différentes méthodes phénotypiques de typage de *C. jejuni* et *C. coli* dont la sérotypie et la phage-typie, mais la disponibilité des réactifs nécessaires pour ces techniques est limitée. Récemment des méthodes de typage moléculaire ont été développées et sont maintenant largement utilisées pour des études épidémiologiques. Il n'y a pas de relation évidente entre sous-types et pathogénicité.

**Épreuves sérologiques :** les oiseaux et les mammifères colonisés de même que les humains infectés développent une réponse en anticorps circulants vis-à-vis de *C. jejuni/coli*. Il n'existe pas d'épreuves sérologiques validées pour la détection des infections à *Campylobacter*, mais de simples préparations d'antigènes complexes incluant des protéines de surfaces extraites en conditions acides peuvent être employées dans une épreuve immuno-enzymatique (ELISA).

**Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique :** il n'existe pas de vaccin efficace disponible pour la prévention des infections entériques à *Campylobacter* des oiseaux ou des mammifères.

## A. INTRODUCTION

Le genre *Campylobacter* comprend nombre d'espèces (34). Les micro-organismes de ce genre sont typiquement des bactéries à coloration de Gram négative, asporulées, en forme de S ou de spirale (0,2 à 0,8 µm de large et 0,5 à 5 µm de long) avec un seul flagelle polaire à l'une ou aux 2 extrémités, leur conférant une mobilité caractéristique en vrille. Ces bactéries sont micro-aérophiles mais certaines peuvent également pousser en aérobiose ou en anaérobiose. Elles ne fermentent ni n'oxydent les hydrates de carbone. Quelques espèces, en particulier *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*, sont thermotolérantes avec un optimum de croissance à 42°C. Elles peuvent coloniser les muqueuses, d'ordinaire le tractus intestinal de la plupart des espèces testées de mammifères et d'oiseaux. L'espèce *C. jejuni* comprend 2 sous-espèces (*C. jejuni* subsp. *jejuni* et *C. jejuni* subsp. *doylei*) qui peuvent être différenciées en fonction de la réduction du nitrate (la sous-espèce *doylei* ne réduit pas le nitrate). La sous-espèce *jejuni* est bien plus fréquemment isolée que la sous-espèce *doylei*. *Campylobacter jejuni* et *C. coli* sont les 2 espèces pathogéniques d'intérêt majeur car ce sont des agents zoonotiques. Ce chapitre traitera donc essentiellement de ces 2 espèces, sauf mention particulière. *Campylobacter fetus*, l'agent étiologique de la campylobactériose génitale bovine est décrit dans le Chapitre 2.3.2.

Chez l'homme sensible, l'infection à *C. jejuni/coli* est associée à une entérite aiguë et des douleurs abdominales durant 7 jours ou plus. Bien que la plupart des infections rétrocedent spontanément, des complications peuvent survenir et peuvent comprendre une bactériémie, le syndrome de Guillain-Barré, une arthrite réactive ou un avortement (29).

Les *campylobacters* sont la cause principale de maladies intestinales humaines d'origine bactérienne dans beaucoup de pays industrialisés (32). Plus de 80 % des cas sont causés par *C. jejuni* et 10 % des cas sont causés par *C. coli*. D'autres espèces de *Campylobacter* telles que *C. concisus*, *C. upsaliensis*, *C. lari* et *C. fetus* peuvent également être associées à des diarrhées chez l'homme. La détection de tels *campylobacters* est peu commune dans les pays industrialisés, mais plus commune dans les pays en voie de développement (17). Alors que l'incidence annuelle de l'infection chez l'homme dans les pays industrialisés est évaluée à environ 1 % de la population, le coût social et économique de la maladie est significatif (12). La source primaire des infections à *C. jejuni* ou *C. coli* chez l'homme est supposée être la manipulation ou la consommation de viandes contaminées, en particulier la viande de volaille. Cependant les contacts avec les animaux de compagnie et le bétail, la consommation d'eau contaminée ou de lait cru et les voyages dans les zones à forte prévalence sont aussi considérés comme des facteurs de risque de la maladie humaine (12). Le contrôle de *Campylobacter* dans la chaîne alimentaire est maintenant devenu une cible majeure des agences en charge de la sécurité alimentaire dans le monde.

*Campylobacter jejuni* et *C. coli* sont généralement considérés comme des commensaux du bétail, des animaux de compagnie et des oiseaux. Cependant ils ont aussi été associés à certaines maladies chez diverses espèces. Le fait que *Campylobacter* puisse être l'agent causal de maladie ou qu'il puisse mieux coloniser dans certaines circonstances (par exemple, dans un contenu intestinal aqueux) reste flou. Chez les chats et les chiens, en particulier les animaux jeunes soumis à un stress, *C. jejuni* est associé à une diarrhée (11, 33) et ceci représente une source bien documentée d'infections humaines (32). Les chiens et les chats sont également fréquemment colonisés par *C. upsaliensis* (chiens) et *C. helveticus* (chats) (3). Des cas groupés d'entérites associées à *Campylobacter* ont été rapportés chez certains animaux dont des groupes de primates non humains et même de

petits mammifères élevés en laboratoires. De grands nombres de *Campylobacter* ont été isolés d'animaux d'élevage, incluant des porcelets, des agneaux et des veaux, avec entérite, mais les bactéries sont aussi rencontrées chez les animaux sains. Chez les oiseaux, en particulier les volailles, la maladie est rare, sinon inexistante, en dépit de hauts niveaux de colonisation par *C. jejuni* ou *C. coli*. Des cas groupés d'hépatite aviaire ont été rapportés, mais le rôle pathogène de *Campylobacter* n'y est pas clair. Une exception possible est constituée par les autruches pour lesquelles des morts et des entérites liées à *Campylobacter* sont rencontrées chez les jeunes oiseaux. *Campylobacter* spp. est fréquemment rencontré chez les oiseaux sauvages (7, 36).

*Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. hyointestinalis* et *C. sputorum*, de même que *C. fetus* (Chapitre 2.3.2.) peuvent également être associés à des infections de l'appareil reproducteur (21). Chez les bovins, toutes ces espèces peuvent être associées à des avortements. Chez les ovins, jusqu'à 20 % des avortements dus à *Campylobacter* sont liés à *C. jejuni* ou *C. coli*. De telles infections sont présumées être la conséquence d'une translocation à partir du tractus intestinal ou surviennent par voie ascendante.

## B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

### 1. Identification de l'agent

La procédure actuelle ISO (International Organization for Standardization) de méthode horizontale pour la recherche de *Campylobacter* thermotolérants dans les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale (13) est en cours de révision (14). Une procédure ISO supplémentaire pour la recherche de *Campylobacter* à partir de l'eau est en cours de rédaction (ISO/CD 17995:2002). Cependant aucune de ces méthodes classiques n'est optimale pour l'isolement de *Campylobacter* à partir d'animaux vivants.

Les échantillons à prélever sont des échantillons fécaux ou intestinaux (cæcaux) de volailles (poulets, dindons, poules pondeuses, etc.) ou d'autres mammifères de rente (bovins, moutons et porcs) et d'animaux domestiques (chiens et chats). À l'abattoir, des échantillons de peau ou de viande peuvent être collectés. Dans les cas sporadiques, par exemple chez de jeunes autruches, les campylobacters peuvent être associés à une entérite ou même de la mortalité. Dans de tels cas et pour des avortons, les campylobacters peuvent être isolés à partir des échantillons d'intestins, de foie et de rate prélevés lors des autopsies.

La culture de *Campylobacter* est réputée difficile. L'isolement à partir de matériel fécal ou des intestins peut être réalisé :

- en exploitant la mobilité rapide et la petite taille des campylobacters par rapport aux autres bactéries de la flore intestinale, en permettant leur translocation au travers de membranes filtrantes vers une gélose nutritive, ou
- par l'utilisation de géloses contenant des antibiotiques sélectifs, incluant d'ordinaire diverses combinaisons de céfoperazone, amphotéricine B, triméthoprim, vancomycine, etc., et
- l'isolement des *campylobacters* thermotolérants *C. jejuni* et *C. coli* par les méthodes citées ci-dessus, combinées à une culture sélective à la température optimale de croissance de 42°C, qui permet d'inhiber la croissance de bactéries contaminantes.

#### a) Prélèvement des échantillons

##### i) Volailles

Les volailles sont trouvées porteuses majoritairement de *C. jejuni* (65 à 95 %), moins souvent de *C. coli* et rarement d'autres espèces (23). Les niveaux de colonisation des poulets de chair sont liés à leur âge. La plupart des lots sont négatifs jusqu'à l'âge de 2 à 3 semaines. Dès que la colonisation par *Campylobacter* a eu lieu dans un lot de poulets, la transmission est extrêmement rapide du fait de la coprophagie et jusqu'à 100 % des oiseaux d'un lot deviennent infectés en 72 h. Les échantillons d'oiseaux vivants, destinés à la chaîne alimentaire, doivent donc être collectés aussi près que possible de l'abattage (23). La plupart des oiseaux excrètent un grand nombre de micro-organismes (> 10<sup>6</sup> unités formant colonie par g de fèces). Les campylobacters peuvent être isolés de fientes caecales ou intestinales fraîches ou d'écouvillons cloacaux. Pour une détection fiable de *Campylobacter* par culture, des fientes fraîches (sans trace d'urine de préférence) doivent être collectées. Ces échantillons doivent être protégés de la dessiccation. Quand des écouvillons sont utilisés, un milieu de transport (tel que Amies, Cary Blair ou Stuart) doit être utilisé.

##### ii) Bovins, moutons et porcs

Les campylobacters colonisent fréquemment l'intestin du bétail, tels que bovins, moutons et porcs (2, 37, 38). Les bovins et les moutons sont colonisés principalement par *C. jejuni*, *C. coli*, *C. hyointestinalis*, et *C. fetus*, alors que les porcs sont contaminés de façon prédominante par *C. coli*.

Chez les jeunes animaux, les nombres sont plus grands que chez les animaux plus âgés. Chez les animaux plus âgés, les microorganismes peuvent être détectés de manière intermittente dans les fèces, probablement en raison de faibles nombres ou du fait d'une excrétion intermittente. Des échantillons frais doivent être collectés (échantillons rectaux si possible) et doivent être protégés du dessèchement. Quand des écouvillons sont utilisés, un milieu de transport (tel que Amies, Cary Blair ou Stuart) doit être utilisé.

iii) *Chats et chiens*

De manière occasionnelle, chez les jeunes animaux de compagnie, *C. jejuni* est associé à un trouble de la santé, en particulier une entérite. Dans ce cas, le nombre de microorganismes excrétés peut être élevé. Les chiens et les chats sont aussi fréquemment colonisés par *C. upsaliensis* (chiens) et *C. helveticus* (chats) (3). Des prélèvements fécaux devraient être collectés frais et protégés de la dessiccation. Quand des écouvillons sont utilisés, un milieu de transport (tel que Amies, Cary Blair ou Stuart) doit être utilisé.

iv) *Organes internes (cœur, rate, foie ou contenu stomacal)*

Lors de l'autopsie, les organes sont prélevés dans des conditions aseptiques et envoyés au laboratoire le jour même.

v) *Prélèvements d'abattoir*

Chez les volailles, les caecums sont généralement utilisés pour la détection de *Campylobacter*. Ils peuvent être séparés du reste de l'intestin avec des ciseaux stériles, et adressés intacts au laboratoire dans un sac plastique ou une boîte de Petri. Pour déterminer le statut d'un lot en bout de chaîne d'abattage, des échantillons de peau (peau du cou ou du bréchet) peuvent être prélevés ou les eaux de rinçage de carcasse entière peuvent être collectées.

Pour les bovins, moutons ou porcs, des échantillons peuvent être collectés à partir des intestins en ouvrant aseptiquement la paroi intestinale ou en réalisant des écouvillonnages rectaux. Des échantillons de viande peuvent être prélevés et transportés au laboratoire dans des sacs stériles.

Jacobs-Reitsma a publié une étude sur la présence de *Campylobacter* dans les aliments (15).

## b) Transport et traitement des échantillons

i) *Transport*

Les campylobacters sont particulièrement sensibles aux conditions environnementales, en particulier la déshydratation, l'oxygène atmosphérique, la lumière du soleil et les températures élevées. Le transport au laboratoire et les étapes suivantes doivent donc être aussi rapides que possible (de préférence le jour même, sinon dans les 2 jours). Les prélèvements ne doivent pas être transportés sur des écouvillons secs, sinon les campylobacters risquent de sécher et mourir rapidement. Un milieu de transport approprié augmente la probabilité de maintenir les campylobacters présents sur l'écouvillon dans un état cultivable. Les échantillons doivent être protégés de la lumière.

Il n'est pas possible de recommander une température idéale de transport, mais il est clair que la congélation ou les fortes températures peuvent réduire la viabilité. Les fortes températures (> 20°C), les faibles températures (< 0°C) et les fluctuations de température doivent être évitées. Au laboratoire, les échantillons peuvent être maintenus à température ambiante pendant de courtes périodes (pour éviter des chocs thermiques non nécessaires). Quand le délai entre le prélèvement et son traitement est plus long, un stockage à 4°C (± 2°C) est conseillé. Les procédures d'expédition, décrites dans le Chapitre I.1.1., « Méthodes de prélèvement », doivent être suivies.

ii) *Milieus de transport*

*Ecouvillons* : l'utilisation de tubes de transport contenant milieu et écouvillon est recommandée. Ceux-ci sont disponibles dans le commerce. Le milieu dans le tube peut être le milieu d'Amies, un agar clair ou un milieu au charbon. Le rôle du milieu n'est pas de permettre la croissance de *Campylobacter*, mais sa protection contre le dessèchement et les effets toxiques de l'oxygène.

Quand seulement de petites quantités de matières fécales ou cæcales peuvent être prélevées et que les tubes de transport ne sont pas disponibles, l'envoi des échantillons en milieu de transport est recommandé. Plusieurs milieux de transport ont été décrits : milieux de Cary-Blair, milieu de Stuart modifié, milieu camp-thioglycolate, eau peptonée alcaline et milieu semi-solide pour test de la mobilité. De bons résultats de ré-isolément ont été obtenus en utilisant le milieu de Cary-Blair (18, 28).

iii) *Traitement des échantillons*

À l'arrivée au laboratoire, les échantillons doivent être traités le plus rapidement possible, de préférence le jour d'arrivée, sinon au moins dans les 3 jours. Pour éviter les variations de température les échantillons ne doivent être réfrigérés que s'ils ne peuvent être traités le jour même, sinon ils doivent être conservés à température ambiante. Quand les échantillons soumis ou conservés au laboratoire sont à 4°C, ils doivent être amenés à température ambiante avant traitement pour éviter les chocs thermiques.

- Pour les prélèvements fécaux/cæcaux ou intestinaux, un pré-traitement n'est pas nécessaire et ils peuvent être ensemencés directement sur milieux sélectifs. Quand la méthode de filtration est utilisée, une suspension (généralement au 1/10<sup>e</sup>) des fèces est faite en solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) et diluée de façon à ce que des gouttes de la suspension puissent être déposées sur la membrane filtrante.
- Les caecums sont ouverts de manière aseptique en coupant le bout avec des ciseaux stériles et le contenu est extrait pour être traité.
- Les contenus stomacaux de fœtus sont inoculés directement sur un milieu de culture adéquat. Les organes internes ou les fragments d'organes sont flambés après application d'alcool (70 %) pour stériliser la surface, puis homogénéisés avant d'être ensemencés sur le milieu de culture.
- Les échantillons de peau sont rassemblés (en règle générale jusqu'à une quantité totale de 25 g) puis transférés dans un milieu d'enrichissement. Les échantillons de viande peuvent être incubés dans un milieu d'enrichissement ou ils peuvent être lavés et le liquide de lavage est ensuite ajouté au milieu d'enrichissement. Si de grands volumes sont utilisés, par exemple pour rincer les carcasses, une solution saline stérile peut être utilisée et ajoutée à un volume égal de milieu d'enrichissement concentré 2 fois.

c) **Isolement de *Campylobacter***

L'isolement de *Campylobacter* à partir d'échantillons fécaux/caecaux ou intestinaux est en règle générale réalisé par ensemencement direct sur milieux sélectifs ou par la méthode de filtration sur milieux gélosés non sélectifs. L'enrichissement est recommandé pour améliorer la sensibilité de culture de micro-organismes potentiellement stressés par l'environnement ou dans le cas de faibles nombres de micro-organismes dans les fèces, par exemple de bovins, moutons ou porcs. Cependant l'enrichissement à partir de ces derniers n'est pas réalisé en routine. La peau et les produits à base de viande nécessitent en général un enrichissement pour la culture d'un nombre généralement faible de *campylobacters* (stressés). Après enrichissement sélectif, une subculture des échantillons est réalisée sur milieux sélectifs solides.

i) *Milieux sélectifs pour isolement*

De nombreux milieux sont d'usage courant pour la culture de *Campylobacter* spp. Une description détaillée des procédures pour la détection de *Campylobacter* et de la variété des milieux existants est donnée par Corry *et al.* (9, 10). Les milieux sélectifs peuvent être divisés en 2 grandes catégories : les milieux contenant du sang et les milieux contenant du charbon. Les composants du sang et le charbon permettent d'éliminer les dérivés oxygénés. La plupart des milieux sont disponibles dans le commerce. La sélectivité des milieux dépend des antibiotiques utilisés. Les céphalosporines (en règle générale la céfoperazone) sont utilisées parfois en combinaison avec d'autres antibiotiques (par exemple vancomycine, triméthoprime). La cycloheximide (actidione) et récemment, plus souvent l'amphotéricine B, sont utilisées pour inhiber les levures et les moisissures (20). La principale différence entre les milieux est leur capacité à inhiber la flore contaminante. Tous les agents sélectifs permettent la croissance de *C. jejuni* et *C. coli*. Il n'existe pas de milieu disponible qui permette de cultiver *C. jejuni* et inhibe *C. coli* ou inversement. En règle générale, les autres espèces de *Campylobacter* (par exemple *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus*, *C. fetus* et *C. hyointestinalis*) sont aussi capables de croître sur la plupart des milieux, en particulier à la température moins sélective de 37°C. Si nécessaire, l'identification de la souche de *Campylobacter* isolée doit être poursuivie jusqu'au niveau de l'espèce.

Exemples de bouillons d'enrichissement sélectifs :

- Bouillon de Bolton
- Bouillon de Preston
- Bouillon d'Exeter
- Bouillon de Park et Sanders
- CCDB (bouillon au charbon, à la céfoperazone et au désoxycholate)

Exemples de milieux solides sélectifs contenant du sang :

- Gélose de Preston
- Gélose de Skirrow
- Gélose de Butzler
- Campy-cefex

Exemples de milieux solides contenant du charbon :

- mCCDA (milieu gélosé modifié au charbon, à la céfoperazone et au désoxycholate), version légèrement modifiée du milieu initialement décrit CCDA) (5, 6)
- Gélose Karmali ou CSM (milieu sélectif au charbon) (17)
- Gélose CAT agar (céfoperazone, amphotéricine et teicoplanine), favorisant la croissance de *C. upsaliensis* (1).

ii) *Inoculation du milieu*

Pour les échantillons qui ne nécessitent pas d'enrichissement, une petite quantité (approximativement 0,1 g) est étalée directement (à l'aide d'une anse) sur un milieu sélectif solide pour faciliter l'obtention de colonies isolées.

Pour les échantillons nécessitant un enrichissement (par exemple des échantillons de peau ou de viande), 25 g de prélèvement sont dilués au 1/10<sup>e</sup> dans le milieu d'enrichissement. Les échantillons de viande ou les carcasses entières de poulet peuvent être rincés avec une solution saline ou du PBS, puis un volume de ce liquide de lavage est ajouté à 9 volumes de milieu d'enrichissement. De plus grands volumes de liquides de lavage peuvent être ajoutés à un volume égal de bouillon d'enrichissement concentré 2 fois. Quand de plus petits échantillons de viande sont utilisés pour l'analyse, ils peuvent être lavés avec le liquide d'enrichissement, qui est ensuite mis en incubation.

Dans un but de recherche, des écouillons fécaux/cæcaux peuvent être enrichis. Ils sont placés dans 10 ml de bouillon d'enrichissement, soit individuellement soit par pool, puis incubés.

iii) *Filtration passive*

La filtration passive évite l'utilisation de milieux sélectifs et est de ce fait très utile pour l'isolement des espèces de *Campylobacter* plus sensibles aux antibiotiques. Cette méthode a été développée par Steele & McDermott (30). Pour la filtration passive, les fèces sont mélangées avec le PBS (dilution au 1/10<sup>e</sup> environ) pour préparer une suspension. Environ 100 µl de cette suspension sont ensuite déposés délicatement sur une membrane avec des pores de 0,45 ou 0,65 µm, qui a été au préalable placée à la surface d'une gélose au sang non sélective. Il faut prendre soin de ne pas laisser l'inoculum déborder des bords du filtre. Une incubation de 30 à 45 min à 37°C ou à température ambiante permet de laisser les bactéries migrer à travers les pores du filtre. Le filtre est ensuite retiré, le fluide qui a traversé le filtre est étalé à l'aide d'un étaleur stérile en verre ou en plastique et la boîte est incubée en atmosphère microaéroophile à 42°C (ou à 37°C pour isoler également les espèces autres que *C. jejuni* et *C. coli*).

iv) *Incubation*

• *Atmosphère*

Des atmosphères microaérophiles avec 5 à 10 % d'oxygène, 5 à 10 % de dioxyde de carbone, (et si possible 5 à 9 % d'hydrogène) sont nécessaires pour une croissance optimale (10, 34). Des conditions adéquates d'atmosphère microaérophiles peuvent être produites par diverses méthodes. Dans certains laboratoires, des évacuations (répétées) du gaz présent dans la jarre suivies d'un remplacement de l'atmosphère par des gaz en bouteille sont utilisées. Des trousse de production de gaz sont disponibles dans le commerce. Des incubateurs à atmosphère variable sont plus adaptés si de grands nombres de cultures doivent être réalisés.

Pour l'enrichissement, une atmosphère particulière n'est pas nécessaire si un petit espace supérieur (< 2 cm) est laissé dans le flacon d'enrichissement, dans la mesure où le bouchon est hermétiquement serré.

• *Température d'incubation*

Les milieux peuvent être incubés à 37°C ou à 42°C, mais il est courant d'incuber à 42°C pour minimiser la croissance des contaminants et favoriser sélectivement la croissance de *C. jejuni/C. coli*. Les agents antifongiques cycloheximide ou amphotéricine sont ajoutés pour empêcher la croissance des levures et moisissures à 37°C (6). Dans certains laboratoires, l'incubation est réalisée à 41,5°C en vue d'harmoniser avec les protocoles d'isolement de *Salmonella* et d'*E. coli* O157 (13, 14). Pour l'enrichissement, des protocoles spécifiques sont parfois utilisés, dans lesquels la température est augmentée au cours de l'incubation afin de permettre la récupération de cellules lésées dans un état subléthal.

• *Durée d'incubation*

Le bouillon d'enrichissement est incubé pendant 24 à 48 h puis est étalé sur un milieu solide sélectif.

La croissance de *Campylobacter jejuni* et *C. coli* est d'ordinaire visible sur milieu solide en 24 à 48 h à 42°C. Le nombre d'échantillons supplémentaires positifs après incubation prolongée étant très bas, une durée d'incubation de 48 h est recommandée pour le diagnostic de routine (6).

v) *Identification sur milieu solide*

Sur le milieu de Skirrow ou d'autres géloses contenant du sang, les colonies caractéristiques de *Campylobacter* sont légèrement roses, rondes, convexes, lisses et brillantes, avec un bord régulier. Sur les milieux contenant du charbon comme le mCCDA, les colonies caractéristiques sont grisâtres, plates et humides avec une tendance à l'étalement, elles peuvent avoir un reflet métallique.

d) **Confirmation**

Une culture pure est nécessaire pour les tests de confirmation, mais une confirmation préliminaire peut être obtenue par examen direct au microscope d'une fraction de la colonie.

Les tests de confirmation de la présence de campylobacters thermotolérants et leur interprétation (14) sont donnés dans le tableau 1. Des témoins positifs et négatifs doivent valider les résultats des tests de confirmation.

**Tableau 1.** Tests de confirmation pour les *Campylobacters thermotolérants*

Test de confirmation	Résultat pour les <i>Campylobacters thermotolérants</i>
Morphologie	Petits bacilles incurvés
Mobilité	Caractéristique (forte mobilité en vrille)
Oxydase	+
Glucose (TSI)	–
Lactose (TSI)	–
Saccharose (TSI)	–
Gaz (TSI)	–
Production d'H <sub>2</sub> S (TSI)	– (traces de noircissement possibles en présence de <i>C. coli</i> )
Culture à 25°C	–

TSI = Gélouse au citrate de fer (III) et aux 3 sucres.

- i) *Examen microscopique de la morphologie et de la mobilité* : une colonie suspecte est mise en suspension en solution saline et examinée, de préférence à l'aide d'un microscope à contraste de phase, pour rechercher des petits bacilles minces, spiralés ou incurvés, avec une mobilité en vrille. Des cultures plus âgées montrent des formes *coccoïdes* moins mobiles.
- ii) *Détection de l'oxydase* : prendre une fraction de colonie suspecte et la déposer sur un papier filtre humecté de réactif pour la recherche de l'oxydase. L'apparition d'une couleur violette ou bleu intense dans les dix secondes indique une réaction positive. Si une trousse commerciale pour la recherche de l'oxydase est utilisée, suivre les instructions du fabricant.
- iii) *Fermentation des sucres et production de sulfure d'hydrogène* : une gélose TSI = Gélouse au citrate de fer (III) et aux 3 sucres est inoculée par des stries longitudinales sur la pente et par piqûre profonde jusqu'au fond de la gélose (culot). Incuber en atmosphère microaérophile à 42°C pendant 24 à 48 h. Interpréter les résultats comme indiqués dans le tableau 2.

**Tableau 2.** Interprétation des résultats de gélose TSI = Gélouse au citrate de fer (III) et aux 3 sucres

Apparence	Interprétation
Culot :	
Jaune	Glucose-positif (fermentation du glucose)
Rouge ou inchangé	Glucose-négatif (pas de fermentation du glucose)
Noir	Formation de sulfure d'hydrogène (H <sub>2</sub> S)
Bulles ou fissures	Production de gaz à partir du glucose
Pente :	
Jaune	Lactose et/ou saccharose positifs (1 ou les 2 sucres utilisés(s))
Rouge ou inchangée	Lactose et saccharose négatifs (aucun sucre utilisé)

- iv) *Croissance à 25°C* : inoculer la culture pure sur un milieu non sélectif au sang et incubé à 25°C en atmosphère microaéroophile pendant 48 h.
- v) *Tests d'agglutination au latex* : des tests d'agglutination au latex pour la confirmation des cultures pures de *C. jejuni/C. coli* (et souvent également *C. lari*) sont disponibles dans le commerce.

**e) Identification de *Campylobacter* au niveau de l'espèce**

Parmi les *Campylobacter* spp. poussant à 42°C, les espèces les plus fréquemment rencontrées à partir d'échantillons d'origine animale sont *C. jejuni* et *C. coli*. Cependant d'autres espèces sont plus rarement signalées. D'ordinaire, *C. jejuni* peut être différencié des autres espèces sur la base de l'hydrolyse de l'hippurate car c'est la seule espèce positive pour l'hippurate. L'existence de souches de *C. jejuni* négatives pour le test de l'hippurate a été décrite (31). Le tableau 3 indique quelques caractéristiques phénotypiques des espèces les plus importantes de campylobacters thermotolérants (14). La sensibilité à l'acide nalidixique était une des caractéristiques les plus utilisées, mais elle risque de poser des difficultés d'interprétation du fait de l'augmentation des souches de *C. jejuni* et *C. coli* résistantes à l'acide nalidixique et de l'isolement de génogroupes de *C. lari* sensibles à l'acide nalidixique. Des protocoles d'identification plus détaillés ont été décrits dans la littérature (25, 34). Les résultats du diagnostic d'espèce devraient être confirmés à l'aide de témoins positifs et négatifs définis.

L'identification biochimique peut être complétée ou même remplacée par des méthodes moléculaires. Divers tests basés sur des sondes ADN ou sur l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ont été décrits pour les espèces de *Campylobacter* (25, 34). On *et al.* (26) ont évalué la spécificité de 11 tests basés sur la PCR pour l'identification de *C. jejuni* et *C. coli*.

**Tableau 3.** Caractéristiques phénotypiques de base des principaux *Campylobacter* thermotolérants

Caractéristique	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Hydrolyse de l'hippurate	+	-	-	-
Catalase	+	+	+	- ou faible
Acétate d'indoxyl	+	+	-	+
Céphalothine	R	R	R	S

Légende : + = positif; - = négatif; S = sensible; R = résistant

- i) *Détection de l'hydrolyse de l'hippurate* : suspendre le matériel prélevé à l'aide d'une anse à partir d'une colonie suspecte dans 400 µl d'une solution d'hippurate de sodium à 1 % (attention de ne pas incorporer d'agar). Incuber à 37°C pendant 2 h, puis ajouter lentement 200 µl d'une solution à 3,5 % de ninhydrine sur le côté du tube de manière à former une couche supérieure. Incuber de nouveau à 37°C pendant 10 min et lire la réaction. Réaction positive : violet sombre/bleu. Réaction négative : absence de changement de couleur ou gris. Si des disques commerciaux d'hydrolyse de l'hippurate sont utilisés, suivre les instructions du fabricant.
- ii) *Détection de l'activité catalase* : placer une colonie suspecte sur une lame de verre. Ajouter une goutte d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3 % sur le matériel bactérien. Rechercher immédiatement la production de gaz qui indique une activité catalase. Le test est positif si le dégagement gazeux apparaît dans les 30 s.
- iii) *Détection de l'hydrolyse de l'acétate d'indoxyl* : placer une colonie suspecte sur un disque d'acétate d'indoxyl et ajouter une goutte d'eau distillée stérile. Si l'acétate d'indoxyl est lysé la couleur vire au bleu sombre dans les 5 à 10 min. L'absence de changement de couleur indique l'absence d'hydrolyse. Si des disques commerciaux d'hydrolyse de l'acétate d'indoxyl sont utilisés, suivre les instructions du fabricant.
- iv) *Test de sensibilité à la céphalotine* : la sensibilité à la céphalotine est testée par la méthode de diffusion à partir des disques comme précédemment décrit (14, 27).

**f) Détection moléculaire de *Campylobacter***

Les méthodes basées sur la PCR pour la détection de *Campylobacter* dans les échantillons de fèces d'animaux et de viande après enrichissement ont déjà été décrites dans la littérature (24, 25). L'un de ces essais est utilisé en routine au Danemark pour le dépistage à partir d'écouvillons cloacaux de poulets de chair à l'abattoir (4, 19). Il existe au moins un test PCR commercial pour tester les échantillons de viande après enrichissement.

**g) Épreuves basées sur une capture antigénique**

Plusieurs épreuves immuno-enzymatiques sont disponibles pour la détection de *Campylobacter* dans les échantillons de selles humaines. Une de ces épreuves a été utilisée pour des échantillons de cæcum de volailles ( $n = 142$ ) avec une sensibilité de 91 % et une spécificité de 64 % (35). Pour la détection de *Campylobacter* dans les prélèvements d'aliment après enrichissement, 2 tests au moins existent sur le marché.

**2. Épreuves sérologiques**

Bien que la colonisation intestinale, symptomatique ou non, soit associée à une réponse en anticorps circulants et au niveau des muqueuses, il n'existe pas d'épreuve sérologique validée développée pour le dépistage des mammifères ou des oiseaux infectés. Cependant de simples préparations d'antigènes complexes peuvent être utilisées dans des essais immuno-enzymatiques (ELISA). Les antigènes les plus communément utilisés pour détecter les réponses en anticorps sont les protéines de surface obtenues par extraction acide (8). Elles comprennent en majorité la flagelline et une série de protéines périphériques de surface appelées protéines PEB. Il faut souligner que les flagelles de *Campylobacter* contiennent des épitopes qui croisent antigéniquement avec d'autres micro-organismes proches tels que les *Helicobacter*s.

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

Il n'existe pas de vaccin développé spécifiquement pour *C. jejuni* ou *C. coli* pour les animaux ou les oiseaux. Cependant un vaccin oral monovalent composé de cellules entières tuées (souche 81176), combiné avec un adjuvant constitué par une toxine modifiée thermolabile de *E. coli*, est en cours de développement pour être utilisé chez l'homme et une approche similaire pourrait être applicable aux oiseaux et aux mammifères ([www.armymedicine.army.mil/usammda/info196.pdf](http://www.armymedicine.army.mil/usammda/info196.pdf)).

Des antisérums dirigés contre *Campylobacter* peuvent être produits par hyperimmunisation de lapins, chèvres etc. (22). Les lapins peuvent être immunisés par voie intramusculaire avec une suspension bactérienne traitée par le formol (0,3 % de formol pendant 30 min puis lavage en PBS) dans un adjuvant adéquat. Les lapins sont soumis à des rappels à 14 jours d'intervalle avec une série d'injections sous-cutanée du même antigène. Pour obtenir des sérums réagissant avec de multiples sérotypes de *C. jejuni/coli*, les animaux doivent être immunisés successivement avec différentes souches, de préférence de différents sérotypes. Il faut souligner que les antisérums produits de cette manière donneront des réactions croisées avec la plupart des espèces de *Campylobacter*, dont *C. hyointestinalis* et *C. fetus* de même que *Helicobacter* spp.

**RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. ASPINALL S.T., WAREING D.R.A., HAYWARD P.G. & HUTCHINSON D.N. (1993). Selective medium for thermophilic campylobacters including *Campylobacter upsaliensis*. *J. Clin. Pathol.*, **46**, 829–831.
2. ATABAY H.I. & CORRY J.E.L. (1998). The isolation and prevalence of campylobacters from dairy cattle using a variety of methods. *J. Appl. Microbiol.*, **84**, 733–740.
3. BAKER J., BARTON M.D. & LANSER J. (1999). *Campylobacter* species in cats and dogs in South Australia. *Aust. Vet. J.*, **77**, 662–666.
4. BANG D.D., PEDERSEN K. & MADSEN M. (2001). Development of a PCR assay suitable for *Campylobacter* spp. mass screening programs in broiler production. *J. Rapid Meth. Automat. Microbiol.*, **9**, 97–113.
5. BOLTON F.J., HUTCHINSON D.N. & COATES D. (1984). Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from faeces. *J. Clin. Microbiol.*, **19**, 169–171.
6. BOLTON F.J., HUTCHINSON D.N. & PARKER G. (1988). Reassessment of selective agars and filtration techniques for isolation of *Campylobacter* species from faeces. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **7**, 155–160.
7. BROMAN T., PALMGREN H., BERGSTRÖM S., SELLIN M., WALDENSTRÖM J., DANIELSSON-THAM M.-L. & OLSEN B. (2002). *Campylobacter jejuni* in black-headed gulls (*Larus ridibundus*): Prevalence, genotypes, and influence on *C. jejuni* epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 4594–4602.

8. CAWTHRAW S., AYLING R. & NEWELL D.G. (1994). The isotype, specificity and kinetics of systemic and mucosal antibodies to *Campylobacter jejuni* during experimental oral infections of chickens. *Avian Dis.*, **38**, 341–349.
9. CORRY J.E.L., ATABAY H.I., FORSYTHE S.J. & MANSFIELD L.P. (2003). Culture media for the isolation of campylobacters, helicobacter and arcobacters. *In: Handbook of Culture Media for Food Microbiology*, Second Edition, Corry J.E.L., Curtis G.D.W. & Baird R.M. eds. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 271–315.
10. CORRY J.E.L., POST D.E., COLIN P. & LAISNEY M.J. (1995). Culture media for the isolation of campylobacters. *Int. J. Food Microbiol.*, **26**, 43–76.
11. FOX J.G., MOORE R. & ACKERMAN J.I. (1983). *Campylobacter jejuni*-associated diarrhea in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **183**, 1430–1433.
12. FRIEDMAN C.R., NEIMANN J., WEGENER H.C. & TAUXE R.V. (2000). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. *In: Campylobacter*, Second Edition, Nachamkin I. & M.J. Blaser, eds. ASM Press, Washington DC, USA, 121–138.
13. ISO INTERNATIONAL STANDARD 10272 (1995) +Technical Corrigendum 1 and 2 (1997). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection of thermotolerant *Campylobacter*. International Organisation for Standardisation (ISO), ISO Central Secretariat, 1 rue de Varembé, Case Postale 56, CH - 1211, Geneva 20, Switzerland.
14. ISO/CD 10272-1 AND 10272-2 (2002). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* growing at 41,5 degrees Celsius. Part 1: Detection method; Part 2: Colony count technique. International Organisation for Standardisation (ISO), ISO Central Secretariat, 1 rue de Varembé, Case Postale 56, CH - 1211, Geneva 20, Switzerland.
15. JACOBS-REITSMA W.F. (2000). *Campylobacter* in the food supply. *In: Campylobacter*, Second Edition, Nachamkin I. & M.J. Blaser, eds. ASM Press, Washington DC, USA, 467–481.
16. KARMALI M.A., SIMOR A.E., ROSCOE M., FLEMING P.C., SMITH S.S. & LANE J. (1986). Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. *J. Clin. Microbiol.*, **23**, 456–459.
17. LASTOVICA A.J. & SKIRROW M.B. (2000). Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *In: Campylobacter*, Second Edition, Nachamkin I. & M.J. Blaser, eds. ASM Press, Washington DC, USA, 89–120.
18. LUECHTEFELD N.W., WANG W.L., BLASER M.J. & RELLER L.B. (1981). Evaluation of transport and storage techniques for isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from turkey cecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, **13**, 438–443.
19. LUND M., WEDDERKOPP A., WAINO M., NORDENTOFT S., BANG D.D., PEDERSEN K., & MADSEN M. (2003). Evaluation of PCR for detection of *Campylobacter* in a national broiler surveillance programme in Denmark. *J. Appl. Microbiol.*, **94**, 929–935.
20. MARTIN K.W., MATTICK K.L., HARRISON M. & HUMPHREY T.J. (2002). Evaluation of selective media for *Campylobacter* isolation when cycloheximide is replaced with amphotericin B. *Lett. Appl. Microbiol.*, **34**, 124–129.
21. NEWELL D.G., DUIM B., VAN BERGEN M.A.P., GROGONO-THOMAS R. & WAGENAAR J.A. (2000). Speciation, subspeciation and subtyping of *Campylobacter fetus* associated with infertility within the UK. *Cattle Practice*, **8**, 421–425.
22. NEWELL D.G. & WAGENAAR J.A. (2000). Poultry infections and their control at the farm level. *In: Campylobacter*, Second Edition, Nachamkin I. & M.J. Blaser, eds. ASM Press, Washington DC, USA, 497–509.
23. NEWELL D.G., MCBRIDE H. & PEARSON A.D. (1983). The identification of outer membrane proteins and flagella of *Campylobacter jejuni*. *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 1201–1208.

24. OLSEN J.E., ABO S., HILL W., NOTERMANS S., WERNARS K., GRANUM P.E., POPVIC T., RASMUSSEN H.N. & OLSVIK O. (1995). Probes and polymerase chain reaction for the detection of food-borne bacterial pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* **28**, 1–78.
25. ON S.L.W. (1996). Identification methods for *Campylobacters*, *Helicobacters*, and Related organisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, **9**, 405–422.
26. ON S.L.W. & JORDAN P.J. (2003). Evaluation of 11 PCR assays for species-level identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 330–336.
27. PEFANIS S.M., VENTER C.G. & HERR S. (1989). The use of cephalothin and triphenyltetrazolium chloride impregnated filter paper strips in the identification of *Campylobacter* species. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **56**, 143–144.
28. SJOGREN E., LINDBLOM G.B. & KAIJSER B. (1987). Comparison of different procedures, transport media, and enrichment media for isolation of *Campylobacter* species from healthy laying hens and humans with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, **25**, 1966–1968.
29. SKIRROW M.B. & BLASER M.J. (2000). Clinical aspects of *Campylobacter* infection. In: *Campylobacter*, Second Edition, Nachamkin I. & M.J. Blaser, eds. ASM Press, Washington DC, USA, 69–88.
30. STEELE T.W. & MCDERMOTT S.N. (1984). The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *Pathology*, **16**, 263–265.
31. STEINHAUSEROVA I., CESKOVA J., FOJTIKOVA K. & OBROVSKA I. (2001). Identification of thermophilic *Campylobacter* spp. by phenotypic and molecular methods. *J. Appl. Microbiol.*, **90**, 470–475.
32. TAUXE R.V. (1992). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: *Campylobacter jejuni*: current state and future trends, Nachamkin I., Blaser M.J. & Tompkins L.S., eds. ASM Press, Washington DC, USA, 9–19.
33. TORRE E. (1993). Factors influencing shedding of *Campylobacter jejuni* in dogs without diarrhea. *Am. J. Vet. Res.*, **54**, 260–262.
34. VANDAMME P. (2000). Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*. In: *Campylobacter*, Second Edition, Nachamkin I. & M.J. Blaser, eds. ASM Press, Washington DC, USA, 3–26.
35. WAGENAAR J.A., DE GOFFAU K., ACHTERBERG R., DIJKSTRA J., JACOBS-REITSMA W. & LAMBERS J. (2001). The use of an enzyme immunoassay for the detection of *Campylobacter* in poultry caecal samples. Abstract L15 at 11<sup>th</sup> CHRO (Freiburg), *Int. J. Med. Microbiol.*, **129**, 107–108.
36. WALDENSTROM J., BROMAN T., CARLSSON I., HASSELQUIST D., ACHTERBERG R.P., WAGENAAR J.A. & OLSEN B. (2002). Prevalence of *Campylobacter jejuni*, *C. lari*, and *C. coli* in different ecological guilds and taxa of migrating birds. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 5911–5917.
37. WEJTENS M. (1996). *Campylobacter* in pigs (dissertation). Utrecht University, The Netherlands.
38. WESLEY I.V., WELLS S.J., HARMON K.M., GREEN A., SCHROEDER-TUCKER L., GLOVER M. & SIDDIQUE I. (2000). Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 1994–2000.

\*  
\* \*