

# Étude préliminaire sur la prévalence de *Campylobacter* dans les diarrhées infantiles au nord du Liban

F. Dabboussi,<sup>1,2</sup> S. Alam,<sup>1</sup> H. Mallat,<sup>1,2</sup> S. Hlais<sup>1,2</sup> et M. Hamze<sup>1,2</sup>

## دراسة مبدئية حول معدل انتشار جراثيم العطيفة في إسهال الأطفال في شمال لبنان

فؤاد دبوسي، سمر علم، حسان ملاط، ساني حليس، منذر حمزة

الخلاصة: تُعدُّ أنواع جراثيم جنس العطيفات من الأسباب الرئيسية لأمراض الإسهال بين الناس في شتى أرجاء العالم. وفي لبنان، لم يكن يُعرف المعدل الصحيح لانتشار العدوى بالعطيفات وتوزع أنواعها في إسهال الأطفال. وتستقصي هذه الدراسة التي أجريت عام 2010 معدل انتشار أنواع العطيفات وإمكانية كونها السبب في إسهال الأطفال في شمال لبنان. وقد شملت الدراسة 90 عينة برازية مُجمعت من أطفال يعانون من الإسهال تتراوح أعمارهم بين شهر واحد وعشر سنوات، والذين، وقد راجعوا خمسة مستشفيات، واستخدم الباحثون تقنية التفاعل السلسلي للبوليميراز لكل عينة من أجل تضخيم جميع أنواع جراثيم العطيفات، وتلا ذلك إجراء خمسة تفاعلات لتضخيم كل من العطيفة الصائمية، والعطيفة اللامية المعوية، والعطيفة القولونية، والعطيفة المُثَنَّية، والعطيفة الأوبسالية. ومن بين تلك العينات كانت عشر منها إيجابية لأنواع العطيفات (11.1%): واحدة منها للعطيفة القولونية، وواحدة أخرى للعطيفة الصائمية، واثنان لكلاً العطيفة الصائمية والعطيفة القولونية معاً، وست لم يكن بالإمكان التعرف على مستوى النوع فيها باستخدام الكواشف المتوفرة. ويرى الباحثون إن وجود العطيفات كثيراً ما يترافق مع إسهال الأطفال في شمال لبنان إلا أن العدوى بالعطيفات قد لا تُشخص تشخيصاً كافياً بسبب عدم التحري المنهجي لها في مزارع البراز.

RÉSUMÉ Les espèces du genre *Campylobacter* sont une cause majeure de maladies diarrhéiques humaines dans le monde. Au Liban, la prévalence réelle des infections à *Campylobacter* ainsi que la distribution des espèces dans les diarrhées infantiles ne sont pas connues. Cette étude menée en 2010 a examiné la prévalence de *Campylobacter* et le rôle étiologique qu'il peut jouer dans la diarrhée infantile au nord du Liban. Au total, 90 échantillons de selles d'enfants (âgés de 1 mois à 10 ans) présentant une diarrhée ont été recueillis auprès de cinq hôpitaux. La technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été utilisée pour chaque échantillon pour l'amplification de toutes les espèces de *Campylobacter*, suivie par cinq réactions de PCR pour l'amplification de *C. jejuni*, *C. hyointestinalis*, *C. coli*, *C. fetus* et *C. upsaliensis*. Sur les 90 échantillons, 10 ont été positifs pour *Campylobacter* spp (11,1%) : 1 pour *C. coli*, 1 pour *C. jejuni*, 2 pour *C. jejuni* et *C. coli* à la fois, et 6 n'ont pas pu être identifiés au rang de l'espèce avec les amorces spécifiques. *Campylobacter* peut souvent être associée à la diarrhée infantile au nord du Liban mais l'infection à *Campylobacter* peut être considérablement sous-diagnostiquée étant donné l'absence de recherche systématique de *Campylobacter* dans les coprocultures.

## Preliminary study on the prevalence of *Campylobacter* in childhood diarrhoea in north Lebanon

ABSTRACT *Campylobacter* species are a major cause of human diarrhoeal disease worldwide. In Lebanon, the true prevalence of *Campylobacter* infections and the species distribution in childhood diarrhoea are not known. This study in 2010 investigated the prevalence of *Campylobacter* species and its possible etiologic role in childhood diarrhoea in north Lebanon. A total of 90 stool samples from children (aged 1 month to 10 years) presenting with diarrhoea were collected from 5 hospitals. A polymerase chain reaction technique (PCR) was used for each sample for the amplification of all *Campylobacter* species followed by 5 PCR reactions for the amplification of *C. jejuni*, *C. hyointestinalis*, *C. coli*, *C. fetus* and *C. upsaliensis*. Of the 90 samples, 10 were positive for *Campylobacter* species (11.1%): 1 for *C. coli*, 1 for *C. jejuni*, 2 for both *C. jejuni* and *C. coli*, and 6 could not be identified to the species level with the available primers. *Campylobacter* species is frequently associated with childhood diarrhoea in north Lebanon but *Campylobacter* infection may be significantly underdiagnosed because the search for *Campylobacter* is not part of the routine stool culture.

<sup>1</sup>Laboratoire Microbiologie santé et environnement, Centre Azm pour la Recherche en Biotechnologie et ses Applications, École doctorale des Sciences et de Technologie, Université Libanaise, Tripoli (Liban).

<sup>2</sup>Faculté de santé publique, Université Libanaise, Tripoli (Liban) (Correspondance à adresser à M. Hamze : mhamze@monzerhamze.com).

Reçu : 16/02/12 accepté : 26/02/12

## Introduction

Le genre *Campylobacter* comprend nombre d'espèces [1]. 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 deux extrémités, leur conférant une mobilité caractéristique en vrille. Ces bactéries sont micro-aérophiles mais certaines peuvent également pousser en aérobiose ou en anaérobiose. 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 [1].

Les bactéries du genre *Campylobacter* sont la cause principale de maladies intestinales humaines d'origine bactérienne aussi bien dans les pays développés, où son incidence augmente, que dans les pays en développement [2].

Plus de 80 % des cas de campylobactériose 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 [3].

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 [4]. 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.

Les bactéries du genre *Campylobacter* sont très exigeantes, et les agents antimicrobiens incorporés dans les milieux de culture utilisés pour isoler sélectivement *C. jejuni* et *C. coli* ont été capables d'inhiber la croissance d'autres espèces de *Campylobacter*, telles que *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis*, et *C. fetus*. En conséquence, les méthodes microbiologiques ne fournissent pas une mesure réelle de la fréquence et de la diversité des espèces de *Campylobacter*. L'application des méthodes moléculaires telle que la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) peut fournir une description plus précise de la prévalence des espèces de *Campylobacter* [5].

L'objectif de cette étude était d'établir par PCR la prévalence de *Campylobacter* chez les enfants diarrhéiques au nord du Liban d'une part, et d'autre part de déterminer la distribution des différentes espèces impliquées.

## Méthodes

L'étude a eu lieu au Centre AZM pour la Recherche en Biotechnologie et ses Applications entre le 7 avril et le 15 juin 2010. Au total, 90 échantillons de selles d'enfants diarrhéiques ont été collectés auprès de cinq hôpitaux au nord du Liban (Hôpital Nini, Hôpital gouvernemental de Tripoli, Hôpital de Batroun, Hôpital Haykal et Hôpital Mazloum). Les échantillons de selles avaient été conservés à -20 °C.

### Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN à partir des matières fécales humaines a été réalisée en utilisant le kit *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (QIAGEN) selon les instructions fournies par le fabricant. Le *QIAamp DNA Stool Mini Kit* permet la purification rapide de l'ADN à partir de selles humaines fraîches ou congelées. Ce kit est composé d'une solution de lyse. Les impuretés et les

inhibiteurs de la réaction PCR sont éliminés par une résine d'adsorption. Ensuite l'ADN est purifié sur des colonnes *QIAamp Mini Spin*.

### Souches bactériennes de référence

Pour le contrôle de l'efficacité de l'extraction de l'ADN à partir des selles ainsi que la réaction d'amplification par PCR, sept souches de référence ont été utilisées (*C. jejuni* ATCC 29428, *C. coli* ATCC 33559, *C. coli* CIP 7080, *C. jejuni* CIP 702, *C. fetus* CIP 5396, *C. upsaliensis* CIP 103681 et *C. hyointestinalis* CIP 104686).

### Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La recherche de *Campylobacter* dans les selles a été réalisée par PCR en utilisant en premier lieu des amorces spécifiques à *Campylobacter* toutes espèces. Ensuite l'identification des isolats au rang des espèces (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. upsaliensis* et *C. hyointestinalis*) a été effectuée en utilisant des amorces spécifiques. La liste des amorces, les gènes cibles, la température d'hybridation ainsi que la taille des amplicons sont présentés dans le tableau 1.

Les réactions de PCR ont été effectuées dans un volume total de 50 µL comprenant 10 µL d'ADN extrait, 0,2 µM de chaque amorce, 200 µM de chacun des quatre désoxynucléotides phosphate, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X de tampon d'amplification (50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl à pH 8,3) et 1,5 unité de l'enzyme *Taq polymerase* recombinant (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur (BIO-RAD C1000) en 40 cycles (30 s de dénaturation à 94 °C, 40 s d'hybridation avec une température variable selon les amorces, 40 s d'élongation à 72 °C) après 5 min de dénaturation à 94 °C. Les produits d'amplification ont été détectés par électrophorèse sur un gel d'agarose à

Tableau 1 Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de *Campylobacter* à partir des selles

Nom des amorces	Séquences des amorces (5' à 3')	Espèce détectée et gène cible	T <sub>m</sub> (°C)	Produit d'amplification	Référence
C412F C1228R	GGATGACACTTTTCGGAGC CAT TGTAGCACGTGTGTC	Toutes espèces 16SrRNA	58	816 bp	[6]
CJmapAN3F CJmapAN3R	TGGTGGTTTTGAAGCAAAGA GCTTGGTGCGGATTGTAAA	<i>C. jejuni</i> mepA	58	413 bp	[7]
HYO1F HYOFET23SR2	ATAATCTAGGTGAGAATCCTAG GGGAGTAAATCTTAATACAAAGTTAGG	<i>C. hyointestinalis</i> 23S rRNA	54	468 bp	[7]
CCceuEN3F CCceuEN3R	AAGCGTTGCAAACTTTATGG CCTTGTGCGCGTTCTTTATT	<i>C. coli</i> ceuE	58	330 bp	[7]
FETNF HYOFET23SR2	CGATAATTGATGTGAGAATCATC GGGAGTAAATCTTAATACAAAGTTAGG	<i>C. fetus</i> 23S rRNA	56	473 bp	[7]
CHCU146F CUI024R	GGGACAACACTTAGAAATGAG CACTTCCGTATCTCTACAGA	<i>C. upsaliensis</i> 16S rRNA	60	878 bp	[6]

T<sub>m</sub> : melting temperature ou température de demi-dénaturation ; bp : base de paires.

2,5 % avec bromure d'éthidium. Pour chaque réaction de PCR, un contrôle positif a été effectué en utilisant les souches de référence. Pour vérifier la spécificité des amorces utilisées pour l'amplification de *Campylobacter*, une réaction de PCR contenant l'ADN d'*Escherichia coli* a été réalisée. Finalement, un contrôle négatif contenant de l'eau au lieu de l'ADN a été utilisé.

## Résultats

Sur les 90 échantillons de selles testés, l'ADN de *Campylobacter* spp. a été détecté dans 10 échantillons (11,1 %). Les espèces détectées par des amorces spécifiques au rang de l'espèce étaient *C. coli* et *C. jejuni*. Deux échantillons fécaux ont été positifs pour *C. jejuni* et

*C. coli* à la fois. Six échantillons (60 %) qui ont donné un résultat positif en utilisant les amorces spécifiques au genre *Campylobacter* n'ont pas pu être identifiés au rang de l'espèce avec les amorces spécifiques à *C. coli*, *C. jejuni*, *C. fetus*, *C. upsaliensis* et *C. hyointestinalis*. En revanche, l'ADN de *C. fetus*, *C. upsaliensis* et *C. hyointestinalis* n'a été détecté dans aucun des échantillons de selles testés (Tableau 2). Aucun amplicon n'a été obtenu avec le tube PCR contenant l'ADN d'*E. coli*.

## Discussion

Dans la présente étude, on a cherché par PCR la prévalence des bactéries du genre *Campylobacter* à partir de 90 échantillons de selles chez des enfants diarrhéiques au nord du Liban. La

prévalence de *Campylobacter* spp. était de 11,1 %. Une étude antérieure réalisée au Liban en 1998 sur la prévalence de *Campylobacter* chez des patients diarrhéiques a montré une prévalence de 0,7 % (2/281) [7]. Notre étude a montré une prévalence nettement plus importante. Des études réalisées dans des pays en développement ont montré des prévalences similaires à la prévalence obtenue dans notre étude. La prévalence de *Campylobacter* dans les diarrhées humaines était de 17,7 % en Algérie [8], 9,9 % au Brésil [9], 9,0 % en Égypte [10], 8,7 % en Iran [11] et 5,5 % en Jordanie [12]. Une autre étude réalisée à Londres en 1999 a montré que la prévalence de *Campylobacter* était de 13,16 % [13].

Le taux d'infection à *Campylobacter* dans le monde entier est en augmentation, avec un nombre de cas dépassant souvent celui des salmonelloses et des shigelloses. Cette augmentation nécessite une meilleure compréhension de l'épidémiologie de la campylobactériose [14,15].

La PCR est considérée comme une technique sensible pour la détection de *Campylobacter* dans les selles humaines. L'application de la PCR fournit une description rapide et précise de la prévalence de *Campylobacter* associée aux diarrhées

Tableau 2 Répartition des espèces du genre *Campylobacter* dans les échantillons de selles analysées

Nombre des échantillons positifs pour <i>Campylobacter</i> spp. (n = 10)	
<b>Espèces identifiées</b>	4
<i>C. coli</i>	1
<i>C. jejuni</i>	1
<i>C. coli</i> + <i>C. jejuni</i>	2
<i>C. fetus</i>	-
<i>C. upsaliensis</i>	-
<i>C. hyointestinalis</i>	-
<b>Espèces non identifiées</b>	6

humaines [16]. Les inhibiteurs de la PCR d'origine fécale, comme les sels biliaries, des produits de dégradation de l'hémoglobine et des polysaccharides complexes, peuvent être enlevés en utilisant des kits commerciaux comme cela a été fait dans la présente étude. D'autre part, un inconvénient de la méthode de détection par PCR est le manque d'isolats, et donc l'incapacité d'accomplir des tests de sensibilité aux antibiotiques [16].

Parmi les dix échantillons positifs, on a pu identifier les espèces de *Campylobacter* dans quatre échantillons, alors que six échantillons n'ont pas pu être identifiés au rang de l'espèce avec les amorces spécifiques à *C. fetus*, *C. upsaliensis* et *C. hyointestinalis*. Il est probable que ces échantillons contenaient des espèces du genre *Campylobacter* autres que celles testées dans cette étude. En effet, le genre

*Campylobacter* comprend plus de 16 espèces et six sous-espèces [1]. Des espèces atypiques comme *C. concisus* et *C. lari* peuvent être associées à des diarrhées chez l'homme. La détection de tels *Campylobacter* est peu commune dans les pays industrialisés, mais plus commune dans les pays en développement [3].

Les amorces utilisées étaient spécifiques de *Campylobacter* car le tube de PCR contenant l'ADN d'*E. coli* avec les amorces de *Campylobacter* spp. n'a pas donné d'amplicons.

## Conclusion

Au Liban, la recherche systématique de *Campylobacter* en coproculture n'est pas obligatoire. Nos résultats doivent encourager les acteurs de la santé au Liban à introduire la recherche de

cette bactérie en routine à côté de la recherche de *Salmonella* et *Shigella* chez les diarrhéiques afin d'éviter des résultats de coproculture faux-négatifs.

Finalement, cette étude montre que le nord du Liban est très touché par les campylobactérioses intestinales avec une prévalence de 11,1 %. Cette prévalence importante est due essentiellement aux problèmes de pollution de l'eau potable et à la consommation de légumes et fruits irrigués par des eaux polluées ainsi qu'à l'absence de mesures d'hygiène alimentaire. 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. 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.

## Références

1. Vandamme P. Taxonomy of the family Campylobacteraceae. In: Nachamkin I, Blaser MJ, eds. *Campylobacter*, 2nd ed. Washington DC, ASM Press, 2000:3–26.
2. Tauxe RV. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: Nachamkin I, Blaser MJ, Tompkins LS, eds. *Campylobacter jejuni: current state and future trends*. Washington DC, ASM Press, 1992:9–19.
3. Lastovica AJ, Skirrow MB. Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. In: Nachamkin I, Blaser MJ, eds. *Campylobacter*, 2nd ed. Washington DC, ASM Press, 2000:89–120.
4. Friedman CR et al. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: Nachamkin I, Blaser MJ, eds. *Campylobacter*, 2nd ed. Washington DC, ASM Press, 2000:121–138.
5. Inglis GD, Kalischuk LD. Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 69:3435–3447.
6. Linton D, Owen RJ, Stanley J. Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five species enteropathogenic for man and animals. *Research in Microbiology*, 1996, 147:707–718.
7. Talhouk RS et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular characterization of *Campylobacter* isolates recovered from humans and poultry in Lebanon. *Journal Medical Libanais*, 1998, 46:310–316.
8. Megraud F et al. Incidence of *Campylobacter* infection in infants in western Algeria and the possible protective role of breast feeding. *Epidemiology and Infection*, 1990, 105:73–78.
9. Mangia AH et al. Aetiology of acute diarrhoea in hospitalized children in Rio de Janeiro City, Brazil. *Journal of Tropical Pediatrics*, 1993, 39:365–367.
10. Rao MR et al. Pathogenicity and convalescent excretion of *Campylobacter* in rural Egyptian children. *American Journal of Epidemiology*, 2001, 154:166–173.
11. Hamidian M et al. fla-typing, RAPD analysis, isolation rate and antimicrobial resistance profile of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* of human origin collected from hospitals in Tehran, Iran. *Annals of Microbiology*, 2011, 61:315–321.
12. Na'was TE, Abo-Shehada MN. A study of the bacterial and parasitic causes of acute diarrhoea in northern Jordan. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research*, 1991, 9:305–309.
13. Lawson AJ et al. Large-scale survey of *Campylobacter* species in human gastroenteritis by PCR and PCR-enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37:3860–3864.
14. Altekruse SF et al. *Campylobacter jejuni*, an emerging food-borne pathogen. *Emerging Infectious Diseases*, 1999, 5:28–35.
15. Coker AO et al. Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerging Infectious Diseases*, 2002, 8: 237–244.
16. Maher M et al. Evaluation of culture methods and a DNA probe-based PCR assay for detection of *Campylobacter* species in clinical specimens of feces. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41:2980–2986.