

**Thèse en Cotutelle**  
Pour l'obtention du grade de Docteur délivré par  
**L'Université de Lille**  
**(Ecole Doctorale Biologie Santé)**  
Spécialité : **Parasitologie (Médecine)**  
**et**  
**L'Université Libanaise**  
**(Ecole Doctorale Sciences et Technologie)**  
Spécialité : **Microbiologie alimentaire et médicale**

Présentée et soutenue publiquement par  
**Stéphanie Greige**  
Le 19 décembre 2018

**Prévalence, diversité génétique et risque de transmission  
zoonotique des microorganismes *Blastocystis* et *Campylobacter*  
dans les filières avicole et bovine au Liban**

**Membres du jury**

- Rapporteurs :** Pr A. TOTET (Université de Picardie Jules Vernes, Amiens, France)  
Pr M. KALLASSY (Université Saint-Joseph de Beyrouth, Liban)
- Examineurs :** Pr S. MONCHY (Université du Littoral Côte d'Opale, Wimereux, France)  
Dr M. EL CHAAR (Université de Balamand, El Koura, Liban)
- Directeurs de thèse :** Dr E. VISCOGLIOSI (Institut Pasteur de Lille, France)  
Pr M. HAMZE (Université Libanaise, Tripoli, Liban)
- Co-directrices de thèse :** Dr M. CHEMALY (ANSES de Ploufragan-Plouzané, France)  
Dr D. EL SAFADI (Université Libanaise, Tripoli, Liban)

## REMERCIEMENTS

---

Je tiens d'abord à remercier mes directeurs de thèse, **Dr. Eric Viscogliosi** et **Pr. Monzer Hamze**, pour m'avoir accueillie au sein de leurs équipes et pour la confiance qu'ils m'ont accordée en dirigeant cette thèse. Merci à eux de m'avoir guidée, encouragée, conseillée et soutenue pendant ces trois années. Je leur suis également reconnaissante pour le temps conséquent qu'ils m'ont accordé malgré leurs lourdes responsabilités de directeurs de laboratoire et pour le partage de leur compétence et de leur expérience dans le domaine de la microbiologie. Je suis ravie d'avoir travaillé en leur compagnie. Je voudrais aussi exprimer ma sincère gratitude et mon profond respect à ma première co-directrice de thèse, **Dr. Marianne Chemaly**, pour son accueil durant un stage enrichissant, pour ses conseils et pour son soutien sans faille. Merci au **Dr Katell Rivoal** et à toute l'équipe de l'**Unité HQPAP de l'ANSES** de Ploufragan-Plouzané.

Mes remerciements vont également au **Dr. Dima El Safadi**, ma seconde co-directrice de thèse, pour son encadrement au Liban, pour son attention portée à mes travaux, pour ses conseils avisés et son écoute qui ont été prépondérants tout le long de ma thèse. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec elle. De même, merci au **Dr. Marwan Osman** pour le suivi, les conseils et l'aide apportés dans la partie bactériologie de ce travail.

Je remercie tous les membres du jury pour avoir accepté d'examiner mon travail. Merci au **Pr Sébastien Monchy**, à mes rapporteurs, les **Pr Anne Totet** et **Mireille Kallassy**, et à mes examinateurs dont le **Dr Mira El Chaar** pour l'intérêt porté à ma thèse.

Un grand remerciement au directeur du Centre AZM pour la Recherche en Biotechnologie et ses Applications (EDST-UL) de Tripoli au Liban, le **Pr. Mohamad Khalil** et au directeur de l'Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille, le **Pr. Bernard Sablonnière** pour leur disponibilité.

Je souhaite aussi remercier tous les membres de l'**équipe BDPEE de l'Institut Pasteur de Lille** au sein de laquelle j'ai réalisé une grande partie de cette thèse. Merci pour la création d'un environnement de recherche d'une qualité humaine épanouissante et scientifique remarquable. Merci pour tous ces sujets intéressants des repas du midi et des pauses-café durant lesquels on pouvait éclater de rire et parler de tout et de rien. Merci pour tous les moments géniaux et les soirées passés ensemble.

Je tiens à remercier tout particulièrement le **Dr. Martha Baydoun**, la seconde Libanaise de l'équipe, pour son soutien affectif et ses conseils. Merci pour son réconfort dans les moments difficiles. Mes remerciements et ma gratitude vont aussi au **Dr. Sadia Benamrouz** qui sait me faire du bien grâce à sa présence chaleureuse et bienveillante. Tu es le visage familial qui m'apaise. Tu resteras toujours une grande sœur que j'aime beaucoup.

## REMERCIEMENTS

---

L'âge n'est rien d'autre qu'un nombre! **Dr. Dionigia Meloni**, la merveilleuse Sarde, jeune dans le cœur, je suis heureuse d'avoir rencontré une autre méditerranéenne qui me comprend sans même dire un mot. P.S. J'adore ton fils Salva.

**Nausicaa**, je n'oublierai jamais ton énergie qui a été un élément moteur pour moi. Merci **Amandine** pour ton aide durant ma première année de thèse. Merci à toutes les autres personnes de cette équipe qui ont toujours été présentes pour m'aider (**Salma, Gabriela, Magali, Karine...**). Et je n'oublie pas l'**équipe de Gène Diffusion** « GD », (**Christophe, Sophie, Ludivine...**) pour leur disponibilité et leur sympathie.

Un remerciement spécial à tous les amis que j'ai eu le plaisir de côtoyer durant ces trois années à Lille pour leur soutien (**Salam, Ranin, Mzen, Mireille, Rihab...**).

Je tiens aussi à mentionner tout le plaisir que j'ai eu à travailler au sein de l'**équipe LMSE** du centre AZM de Tripoli et je remercie ici tous les membres présents et passés, collègues et amis qui ont contribué au maintien d'une bonne humeur (**Taha, Majd, Mariam, Sara, Iman, Farah, Asmaa, Clara, Nazih...**). Je leur en suis très reconnaissante.

Pour leurs encouragements et leur assistance morale qui m'ont permis de faire cette thèse dans les meilleures conditions, je remercie finalement **mes parents, ma sœur et mon frère** ainsi que le reste de ma famille, qui malgré les inquiétudes, ont toujours été là pour moi et dont l'affection, l'amour, le soutien et l'encouragement constants m'ont été d'un grand réconfort et ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

Veillez m'excuser par avance des oublis éventuels...

Enfin cette thèse n'aurait pu être menée sans le soutien financier de l'**Institut Pasteur de Lille**, du **CNRS**, de l'**Inserm**, de l'**Université de Lille**, de l'**Université Libanaise**, du **programme Hubert Curien PHC CEDRE** et de l'**association AZM et SAADE** qui a financé ma bourse doctorale.

## RESUME

---

Le protozoaire *Blastocystis* et la bactérie *Campylobacter* sont des microorganismes zoonotiques ayant un impact majeur en santé publique. Même si son pouvoir pathogène reste controversé, *Blastocystis* est l'eucaryote unicellulaire le plus fréquemment retrouvé dans les selles humaines alors que *Campylobacter* est considérée comme la cause la plus courante de gastroentérite humaine. Ces microorganismes sont fréquemment présents chez les animaux destinés à l'alimentation comme les volailles ou les bovins et leur transmission peut être liée à la consommation ou à un contact répété avec les manipulateurs de ces animaux. Malgré ce risque potentiel majeur pour l'Homme, très peu de données étaient disponibles concernant la prévalence et les espèces de *Campylobacter* ou sous-types de *Blastocystis* présents dans les filières avicole et bovine au Liban. De plus, le risque de transmission zoonotique par contact direct avec le personnel des abattoirs ou les éleveurs n'avait jamais été évalué. Pour ce qui est des bovins, *Blastocystis* a été identifié par PCR quantitative en temps réel dans plus de 60% des échantillons de selle de vaches laitières analysés au Nord-Liban. Une prédominance du sous-type (ST) 10 et du ST14 a été observée confirmant que les bovins sont les hôtes naturels de ces deux STs. Les ST2, ST1, ST5, ST3 et ST7 ont aussi été identifiés avec de faibles prévalences. Chez les éleveurs comme dans un groupe de patients sans contact avec ces animaux, une prévalence importante dépassant les 50% a été rapportée avec une prédominance du ST3. Cependant, la comparaison des isolats identifiés dans ces cohortes humaine et animale suggère que les bovins joueraient un rôle négligeable en tant que réservoirs zoonotiques de *Blastocystis*. Dans la filière avicole, la prévalence de ce même parasite dépassait les 30% dans les caeca de poulets de chair analysés dans des abattoirs du Nord-Liban. Tous les isolats aviaires caractérisés appartenaient aux ST6 et ST7 confirmant que les oiseaux sont des hôtes naturels de ces deux STs. Chez le personnel d'abattoir comme dans un groupe de patients sans contact avec les volailles, la prévalence de *Blastocystis* dépassait les 50% avec une prédominance du ST3. De plus, l'identification du ST6 aviaire chez le personnel d'un abattoir confirmait le potentiel zoonotique de ce ST. Toujours dans cette filière avicole et en analysant à la fois les mêmes caeca et des carcasses de poulets en fin de chaîne d'abattage, la prévalence de *Campylobacter* était respectivement de 67% et 17,2% dans ces prélèvements. Les deux principales espèces identifiées étaient *C. jejuni* et *C. coli*. Des niveaux élevés de diversité génétique ont été observés parmi les 51 isolats de *C. jejuni* identifiés chez les poulets et répartis en 25 profils distincts. Une prédominance des profils 1, 13, 30 et 38 a été observée alors qu'ils sont aussi fréquemment retrouvés parmi les cas cliniques humains français suggérant que ces animaux représentent un réservoir potentiel de campylobactériose humaine. Une prévalence significativement plus élevée de *Campylobacter*

## RESUME

---

a été rapportée chez le personnel de l'abattoir par rapport à celle observée dans la cohorte de patients sans contact avec la volaille montrant que les poulets de chair contaminés à l'abattoir représentaient une source non négligeable de transmission zoonotique de la bactérie. Les mêmes caeca de poulets ont pu être comparés pour la présence de *Campylobacter* et de *Blastocystis*. Cette comparaison révélait une association statistiquement significative de ces deux microorganismes suggérant que la présence de *Campylobacter* serait favorisée par celle de *Blastocystis* et vice versa. Cette première enquête menée à grande échelle au Liban a permis de fournir des données majeures concernant la prévalence et la circulation de *Blastocystis* et *Campylobacter* dans ce pays et d'évaluer la nécessité de mettre en place des mesures de prévention et de contrôle de ces microorganismes au sein des structures d'élevage ou d'abattage des volailles et des bovins afin de limiter leur transmission.

## ABSTRACT

---

The protozoan *Blastocystis* and the bacterium *Campylobacter* are zoonotic microorganisms with a major impact on public health. Although its pathogenicity remains controversial, *Blastocystis* is the most common single-celled eukaryote found in human stool, while *Campylobacter* is considered the most common cause of human gastroenteritis. These microorganisms are frequently present in food-producing animals such as poultry or cattle and their transmission may be related to consumption or repeated contact with the handlers of these animals. Despite this major potential risk to humans, very little data were available on the prevalence and species of *Campylobacter* or *Blastocystis* subtypes present in the poultry and bovid sectors in Lebanon. In addition, the risk of zoonotic transmission through direct contact with slaughterhouse staff or farmers had never been assessed. Regarding bovinds, *Blastocystis* was identified by PCR in more than 60% of the dairy cattle stool samples analysed in North Lebanon. A predominance of ST10 and ST14 has been observed confirming that cattle are the natural hosts of these two STs. ST2, ST1, ST5, ST3 and ST7 were also identified with lower prevalences. In breeders as well as in a group of patients without contact with these animals, a significant prevalence exceeding 50% has been reported with a predominance of ST3. However, a comparison of the isolates identified in these human and animal cohorts suggests that cattle would play a negligible role as zoonotic reservoirs of *Blastocystis*. In the poultry sector, the prevalence of the same parasite exceeded 30% in broiler caeca analysed in slaughterhouses in North Lebanon. All characterized avian isolates belonged to ST6 and ST7 confirming that birds are natural hosts of these two STs. Among slaughterhouse staff as well as in a group of patients without contact with poultry, the prevalence of *Blastocystis* exceeded 50% with a prevalence of ST3. In addition, the identification of avian ST6 in slaughterhouse staff confirmed the zoonotic potential of this ST. Still in this poultry sector and by analysing both the same caeca samples and chicken carcasses, the prevalence of *Campylobacter* was 67% and 17.2%, respectively, in these specimens. The two main species identified were *C. jejuni* and *C. coli*. High level of genetic diversity was observed among the 51 *C. jejuni* isolates identified in chickens and distributed in 25 distinct profiles. A predominance of profiles 1, 13, 30 and 38 has been observed, although they are also frequently found among French human clinical cases suggesting that these animals represent a potential reservoir of human campylobacteriosis. A significantly higher prevalence of *Campylobacter* was reported among slaughterhouse staff compared to that observed in the cohort of patients without contact with poultry, showing that contaminated broilers at the slaughterhouse were a significant source of zoonotic transmission of the bacteria. The same chicken caeca samples were compared for the presence of

## ABSTRACT

---

*Campylobacter* and *Blastocystis*. This comparison revealed a statistically significant association of these two microorganisms suggesting that the presence of *Campylobacter* would be enhanced by that of *Blastocystis* and vice versa. This first large-scale survey conducted in Lebanon provided major data on the prevalence and circulation of *Blastocystis* and *Campylobacter* in this country and assessed the need to put in place measures to prevent and control these microorganisms in poultry and cattle breeding or slaughter facilities in order to limit their transmission.

## PUBLICATIONS

---

**Mon travail de thèse a été valorisé par les publications suivantes :**

**Greige S**, El Safadi D, Bécu N, Gantois N, Pereira B, Chabé M, Benamrouz-Vanneste S, Certad G, El Hage R, Chemaly M, Hamze M, Viscogliosi E. Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. isolates from poultry in Lebanon and evidence of zoonotic potential. *Parasites and Vectors* 2018; 11:389.

**Greige S**, El Safadi D, Khaled S, Gantois N, Baydoun M, Chemaly M, Benamrouz-Vanneste S, Chabé M, Osman M, Certad G, Hamze M, Viscogliosi E. First report on the prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in dairy cattle in Lebanon and assessment of zoonotic transmission risk. *Acta Tropica* 2018 soumis.

**Greige S**, Rivoal K, Osman M, El Safadi D, Dabboussi F, El Hage R, Viscogliosi E, Hamze M, Chemaly M. Prevalence and genetic diversity of *Campylobacter* spp. in the production chain of broiler chickens in Lebanon and its association with the intestinal protozoan *Blastocystis* sp. *Poultry Science* 2018 soumis.



## COMMUNICATIONS

---

**Mon travail de thèse a pour l'instant donné lieu aux communications suivantes dans des congrès nationaux et internationaux:**

- ✓ 17ème édition de la « **Journée André VERBERT** », au LILLIAD Learning Center Innovation (Cité Scientifique) de Lille le 14 septembre 2017. Prevalence, host specificity and zoonotic potential of *Blastocystis* sp. avian subtypes. **Greige S**, El Safadi D, Hamze M, Viscogliosi E. Poster affiché.
- ✓ 2ème édition du congrès « **Sécurité et Qualité des produits agroalimentaires SQUAD** », à la Chambre du Commerce, d'Industrie et d'Agriculture de Tripoli et du Nord Liban du 12 au 14 Avril 2018. Molecular Epidemiology of *Campylobacter* spp. in intensively reared poultry farms in Lebanon. **Greige S**, Osman M, Dabboussi F, Viscogliosi E, Chemaly M, Hamze M. Présentation Orale.
- ✓ « **Ma thèse en 3 minutes** » à l'amphithéâtre de l'Institut de Biologie de Lille le 22 Mai 2018. Poster présenté.
- ✓ 2ème « **Forum doctoral** » à l'Ecole doctorale des sciences et de la technologie de Beyrouth le 19 Septembre 2018. Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. isolates from poultry and cattle in Lebanon and assessment of zoonotic transmission risk. **Greige S**, El Safadi D, Osman M, El Hage R, Chemaly M, Viscogliosi E, Hamze M. Présentation Orale.

## FORMATIONS

---

### Durant ma thèse, j'ai eu la possibilité de participer aux formations suivantes :

- ✓ Atelier « **Gérer efficacement sa documentation avec Zotero** », Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille, Cité Scientifique, Villeneuve d'Ascq le 30/03/2015 (3h).
- ✓ Atelier « **Maîtrise des outils de recherche et d'accès à la documentation scientifique** » à l'Agence de la Francophonie (AUF)-Tripoli, en partenariat avec l'Association Libanaise pour la Recherche Scientifique (LASeR) du 02 au 06 octobre 2015 (35h).
- ✓ Atelier « **Université entrepreneuriale** » à l'Université Saint-Esprit de Kaslik-Jounieh, organisée par la LAAS (Association Libanaise pour l'Avancement des Sciences) avec le soutien du Bureau Moyen-Orient de l'AUF le 26 Janvier 2016 (une journée).
- ✓ Atelier « **Les troisièmes journées Franco-Libanaises JFL3: La recherche au service de la communauté** » à l'Université Libanaise au Campus Hadath-Beyrouth les 29 et 30 octobre 2015.
- ✓ Atelier « **Journée d'Information et d'Echanges sur *Campylobacter*** » organisée par l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments AFSSA à Ploufragan le 22 novembre 2016.
- ✓ Atelier « **Mise en place, scénarisation et création d'un MOOC** » à l'Agence de la Francophonie (AUF)-Tripoli en partenariat avec l'Association Libanaise pour la Recherche Scientifique (LASeR) du 7 au 9 Décembre 2016 (21h).
- ✓ Atelier « **Journée hors-site Structure Fédérative sur les maladies infectieuses, inflammatoires et immunitaires SF3i** » le 30 mars 2017.
- ✓ Atelier « **Doctoriales : 6 jours pour préparer les doctorants à intégrer l'entreprise** » Hôtel Mercure Lille Métropole, Marcq-en-Barœul organisé par le collège doctoral Lille Nord de France et les Écoles Doctorales du 14 au 19 mai 2017.
- ✓ Atelier « **4th Meeting of the Institut Pasteur de Lille** » à la Cité Des Échanges, Marcq-en-Barœul organisé par le Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL), 19 juin 2018.
- ✓ Atelier « **Journée sur le séquençage à haut débit et les nouvelles technologies** » au Pôle recherche de la faculté de médecine de Lille le 5 mai 2017 (8h).
- ✚ **Co-encadrement d'étudiants avec le Dr Eric Viscogliosi 2015/2016** : Noémie Bécu: étudiante 2<sup>ème</sup> année BTS Biotechnologique Lycée Valentine Labbé, La Madeleine.

# SOMMAIRE

---

<b>Introduction</b>	1
<b>Analyse bibliographique</b>	
<b>I. Quelques données générales sur le protozoaire entérique <i>Blastocystis</i> sp.</b>	4
1. Morphologie et cycle biologique de <i>Blastocystis</i> sp.	4
2. Taxonomie et diversité génétique de <i>Blastocystis</i> sp.	7
3. Détection de <i>Blastocystis</i> sp. dans les échantillons biologiques	10
a. Les méthodes microscopiques et culturales	10
b. Les méthodes moléculaires et le sous-typage	11
4. Prévalence de <i>Blastocystis</i> sp. dans la population humaine	12
5. Distribution des STs de <i>Blastocystis</i> sp. dans la population humaine	14
6. Prévalence de <i>Blastocystis</i> sp. et distribution des STs dans la population animale	16
7. Evaluation du potentiel zoonotique de <i>Blastocystis</i> sp.	19
8. Différents modes de transmission de <i>Blastocystis</i> sp.	20
9. Impact de <i>Blastocystis</i> sp. en santé humaine et animale	22
10. Physiopathologie de <i>Blastocystis</i> sp. et traitement de la blastocystose	23
<b>II. Aspects généraux de <i>Campylobacter</i></b>	26
1. Contexte historique et taxonomie du genre <i>Campylobacter</i>	26
2. Caractéristiques microbiologiques principales de <i>Campylobacter</i>	28
3. Isolement et identification de <i>Campylobacter</i>	28
4. Mécanismes et facteurs de virulence de <i>Campylobacter</i>	30
a. Motilité	30
b. Chimiotaxie	30
c. Adhésion	30
d. Invasion	30
e. Production de toxines	31
f. Capsule	31
g. Fer	31
h. Lipooligosaccharide	31
i. Résistance aux antibiotiques	31
j. Réponse au stress	32
5. Campylobactériose	32
6. Aspects cliniques de la campylobactériose	34

# SOMMAIRE

---

7.	Principales sources de campylobactériose humaine	34
8.	Epidémiologie de <i>Campylobacter</i> dans la production de poulets de chair	35
a.	Colonisation du poulet de chair par <i>Campylobacter</i>	35
b.	Prévalence de <i>Campylobacter</i> dans les lots de poulets de chair	36
c.	Facteurs de risque et sources de contamination par <i>Campylobacter</i> dans les fermes de poulets de chair	38
9.	Caractéristiques génétiques de <i>Campylobacter</i>	39
10.	Epidémiologie moléculaire et méthodes de génotypage de <i>Campylobacter</i>	40
a.	Électrophorèse en champ pulsé	40
b.	Multilocus sequence typing	41
c.	Comparative Genomic Fingerprinting	41
d.	Typage basé sur le séquençage de génomes entiers	42

## Résultats

### **I. Prévalence et distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans la filière avicole au Liban et confirmation de son potentiel zoonotique**

1.	Contribution de l'étudiante à l'étude	44
2.	Résumé de l'étude	44

### **II. Prévalence et distribution des STs de *Blastocystis* sp. chez les vaches laitières au Liban et évaluation de son potentiel zoonotique**

1.	Contribution de l'étudiante à l'étude	68
2.	Résumé de l'étude	68

### **III. Prévalence et diversité génétique de *Campylobacter* spp. dans la chaîne de production de poulets de chair au Liban : évaluation de son potentiel zoonotique et de son association avec le protozoaire entérique *Blastocystis* sp.**

1.	Contribution de l'étudiante à l'étude	90
2.	Résumé de l'étude	90

## Discussion

<b>Prévalence et distribution des sous-types de <i>Blastocystis</i> sp. dans la filière poulets de chair au Nord-Liban</b>	116
--	-----

# SOMMAIRE

---

<b>Prévalence et distribution des sous-types de <i>Blastocystis</i> sp. dans la filière bovine au Nord-Liban</b>	117
<b>Situation de la blastocystose dans la population humaine au Nord-Liban</b>	119
<b>Evaluation du potentiel zoonotique de <i>Blastocystis</i> sp.</b>	122
<b>Situation de <i>Campylobacter</i> spp. dans les populations humaine et animale au Nord-Liban</b>	126
<b>Conclusion</b>	130
<b>Références bibliographiques</b>	133
<b>Annexes</b>	

# *Introduction*

---

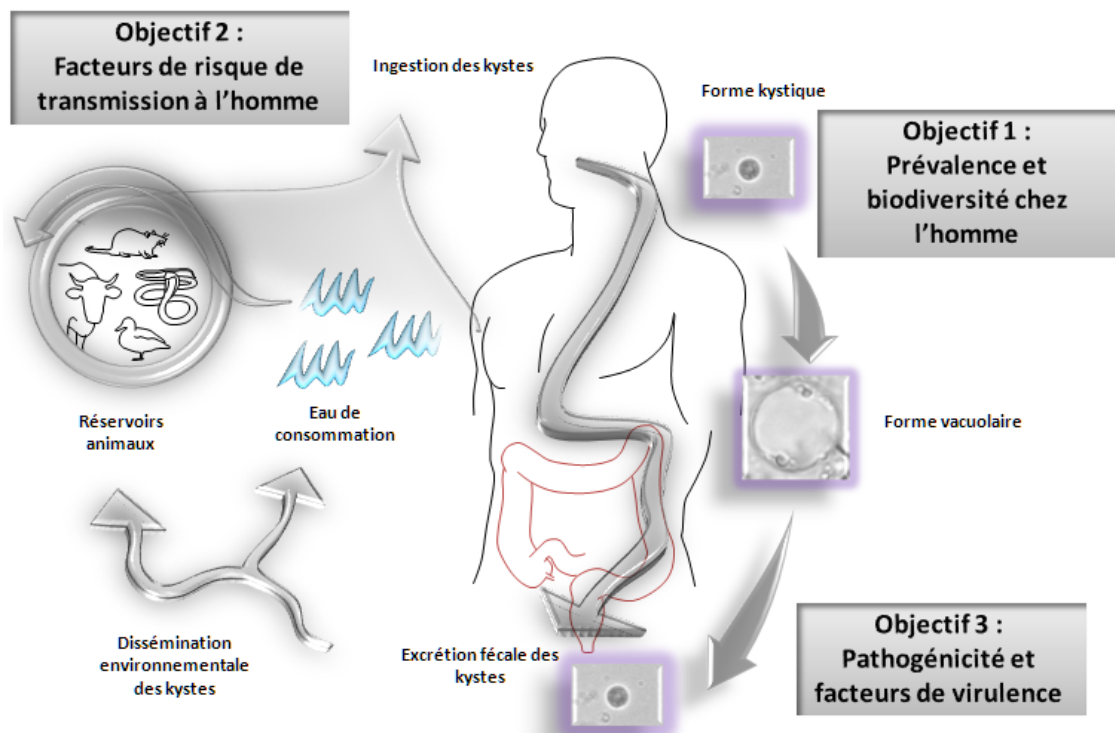
## INTRODUCTION

---

Le parasitisme intestinal d'origine eucaryote représente de nos jours une préoccupation majeure en termes de santé publique dans la population humaine. En effet l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) indique que plus de la moitié de la population mondiale serait affectée par des parasitoses intestinales en lien avec des infections par des protozoaires ou des organismes pluricellulaires tels que les vers (OMS, 2010). Concernant les agents unicellulaires eucaryotes, leur impact reste très difficile à évaluer même si on peut aisément l'estimer à plusieurs centaines de millions de cas par an. Les protozooses intestinales et les diarrhées qui peuvent en découler représentent ainsi l'une des principales causes de mortalité, de morbidité mais aussi de malnutrition dans le monde. Leur prévalence reste naturellement intimement liée au péril fécal et donc aux conditions sanitaires et d'hygiène rencontrées sur le terrain. Ainsi, les pays en voie de développement sont classiquement les plus impactés par ces infections. Cependant, du fait des facilités modernes de déplacement des populations dans des régions géographiques considérées à risque dans le cadre de séjours d'agrément ou professionnels, ce péril fécal s'est accru dans les pays développés. A cela s'ajoute, dans ces mêmes pays, un accroissement de ce péril à travers les flux migratoires actuels de populations essentiellement originaires d'Afrique et du Moyen-Orient et présentant généralement des taux d'infection parasitaire importants.

Les protozoaires entériques les plus connus sont bien entendu *Giardia* et *Entamoeba* qui font l'objet d'un nombre important d'études publiées annuellement. Mais à côté de ces deux microorganismes émergent d'autres unicellulaires intestinaux comme *Blastocystis*, *Cryptosporidium* ou même *Dientamoeba* qui restent actuellement largement négligés par les autorités sanitaires. Aussi l'équipe Biologie et Diversité des Pathogènes Eucaryotes Emergents (BDPEE) du CIIL qui m'a accueillie durant ma thèse focalise ses travaux sur ces deux premiers protozoaires et occupe ainsi une véritable niche au niveau national voire même international du fait du faible nombre de groupes menant des recherches sur *Blastocystis* et *Cryptosporidium*. Afin d'accentuer nos connaissances sur ces deux protozoaires, l'équipe BDPEE qui a la particularité de combiner des « études de terrain » et une « recherche en laboratoire » s'est fixée plusieurs objectifs visant 1) à déterminer la prévalence de *Blastocystis* et *Cryptosporidium* dans la population humaine et la diversité génétique des isolats, 2) à identifier les facteurs de risque animaux et environnementaux de transmission de ces deux parasites à l'homme et 3) à clarifier leur pathogénicité à l'aide de différents modèles d'étude *in vivo* et *in vitro* tout en cherchant à caractériser les molécules et mécanismes impliqués dans leur virulence (**Figure 1**).

# INTRODUCTION



**Figure 1:** Axes de recherche développés par l'équipe BDPEE sur les protozoaires intestinaux dont *Blastocystis* sp. Les travaux réalisés dans le cadre de ma thèse s'intègrent principalement aux axe 1 et axe 2.

Mon projet de thèse s'intégrait parfaitement dans ce schéma directeur de l'équipe et s'est principalement concentré sur l'épidémiologie moléculaire et la circulation de *Blastocystis* sp. au Liban. En effet, même si ce pays est connu pour être très impacté par les infections parasitaires, très peu de données étaient disponibles concernant la prévalence et la diversité génétique de ce parasite dans la population humaine. D'autre part, *Blastocystis* sp. n'avait encore jamais été recherché dans les filières avicole et bovine dans ce pays alors que ces deux secteurs ont tous deux un impact économique majeur. Aussi, pour répondre à nos interrogations, plusieurs cohortes humaines (patients hospitalisés, éleveurs, personnel d'abattoirs) et animales (poulets de chair et vaches laitières) ont été incluses dans mon projet et analysées. Les isolats présents dans ces différentes cohortes ont été caractérisés sur un plan moléculaire et leur comparaison génétique a permis de traquer les sources potentielles de contamination pour l'Homme en lien avec le potentiel zoonotique avéré du parasite. Ce projet a été en partie financé par le Partenariat Hubert Curien (PHC) CEDRE France-Liban et réalisé en collaboration avec le Centre AZM de Tripoli, l'Institut de Recherche Agronomique Libanais (IRAL) et l'ANSES de Ploufragan.



## INTRODUCTION

---

Dans le cadre de ce PHC CEDRE, mon projet de thèse a été complété par l'évaluation de la prévalence et du risque de transmission à l'Homme d'un autre microorganisme zoonotique en l'occurrence la bactérie *Campylobacter* dans la filière poulet de chair déjà examinée précédemment pour la présence de *Blastocystis* sp. Brièvement, cette proteobactérie est d'un intérêt majeur puisqu'elle est considérée comme la cause bactérienne la plus courante de gastroentérite humaine (campylobactériose) à travers le monde. Les espèces du genre *Campylobacter* sont présentes en particulier chez les animaux destinés à l'alimentation comme les volailles et leur transmission se fait par la consommation de viande contaminée. Malgré l'impact majeur de cette zoonose, très peu de données étaient disponibles concernant les espèces présentes et leur prévalence dans cette filière animale au Liban et le risque de transmission zoonotique par contact direct avec le personnel des abattoirs n'avait jamais été évalué. En plus de fournir des données majeures concernant la prévalence et la circulation de *Blastocystis* sp. et *Campylobacter* spp. au Liban, ce travail de thèse a aussi permis d'évaluer la nécessité de mettre en place des mesures de prévention et de contrôle de ces microorganismes au sein des structures d'élevage ou d'abattage des volailles et des bovins afin de limiter leur transmission.

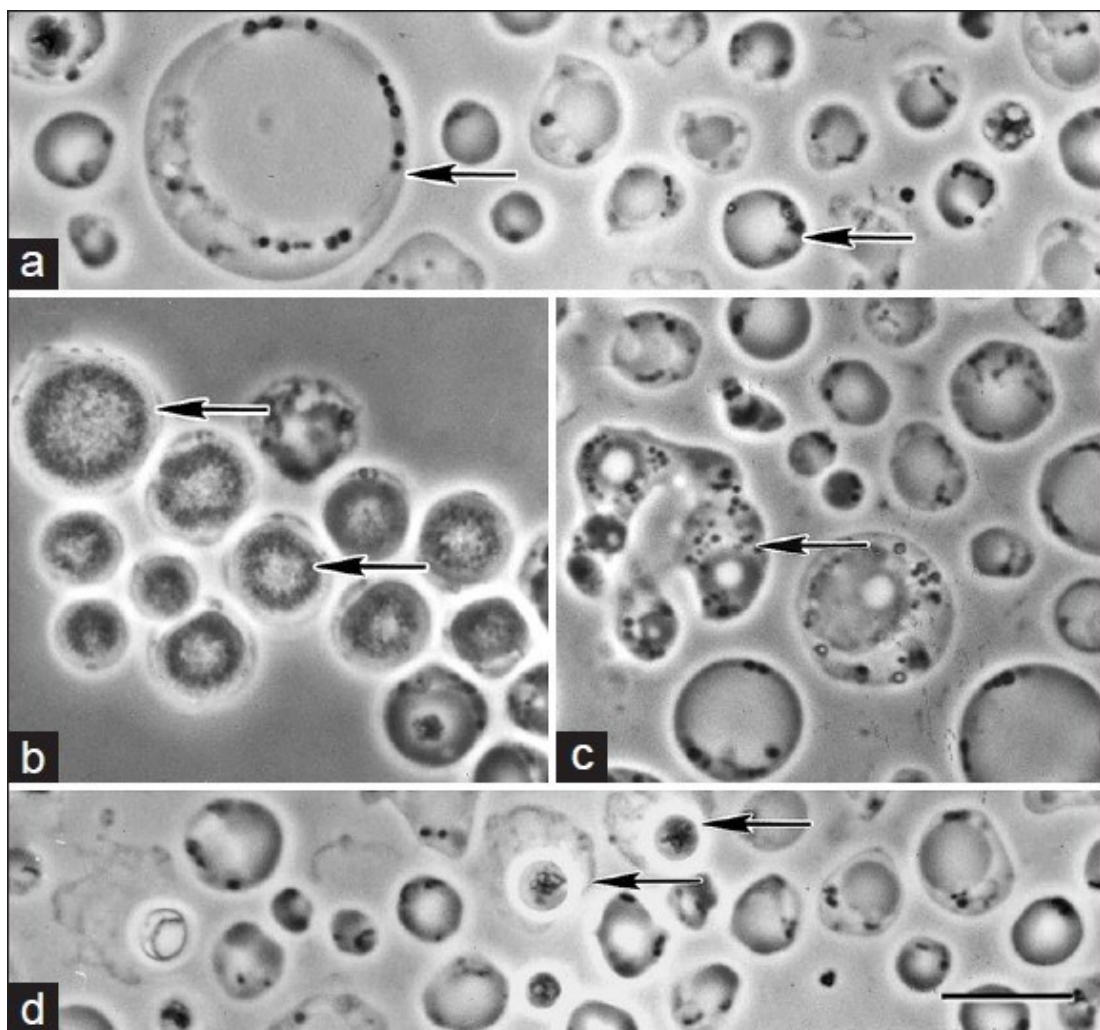
# *Analyse Bibliographique*

---

## I. Quelques données générales sur le protozoaire entérique *Blastocystis* sp.

### 1. Morphologie et cycle biologique de *Blastocystis* sp.

Le polymorphisme de cet unicellulaire eucaryote est l'une de ses principales caractéristiques et a été décrit dans de nombreuses revues (Boreham et Stenzel, 1993 ; Stenzel et Boreham, 1996 ; Tan, 2004 ; Tan, 2008) synthétisant les données d'un nombre important d'études focalisées sur l'observation du parasite en microscopie optique ou électronique dans des selles ou en culture *in vitro* (Tan 2004, 2008). Ainsi, 4 formes majeures ont pu être décrites : les formes vacuolaire, granulaire, amiboïde et kystique (**Figure 2**).



**Figure 2:** Morphologie des formes de *Blastocystis* sp. en microscopie en contraste de phase (Tan, 2008). (a) Formes vacuolaires présentant une grande vacuole centrale et montrant de fortes variations de taille (flèches); (b) Formes granulaires remplies de granules denses (flèches); (c) Forme amiboïde (flèche) avec ses pseudopodes caractéristiques; (d) Formes kystiques (flèches) caractérisées par une petite taille et la présence d'une paroi. Bar = 10 µm.

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

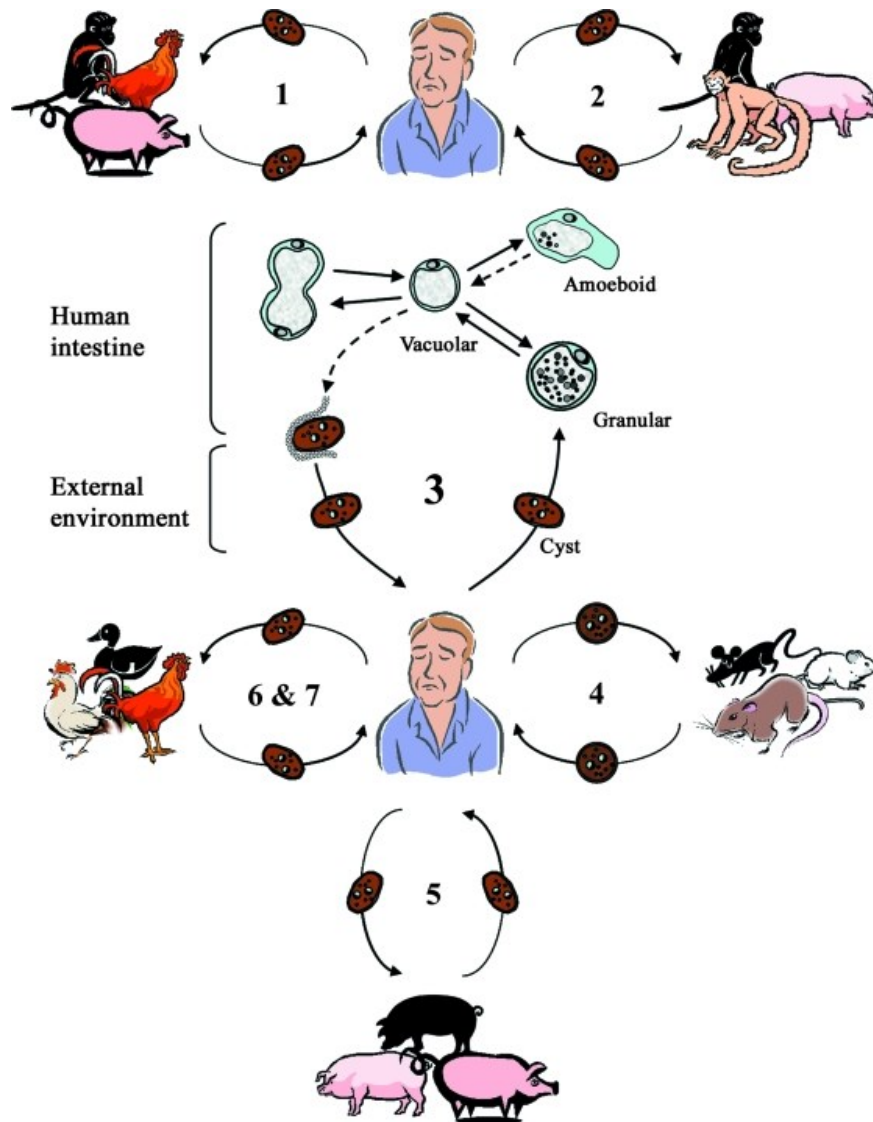
---

Brièvement, la forme vacuolaire peut présenter de fortes variations de taille de 2 à 200  $\mu\text{m}$  selon les isolats pour une taille moyenne comprise entre 4 et 15  $\mu\text{m}$ . C'est la forme virulente trouvée dans le colon et la plus typique du parasite. C'est aussi la plus répandue dans les échantillons de selles comme en culture et la forme observée pour le diagnostic d'une infection à *Blastocystis* sp. Elle est aisément reconnaissable par une grande vacuole centrale qui occupe environ 90% de l'espace cellulaire et qui aurait un rôle de stockage. De ce fait, le cytoplasme contenant les organites comme les mitochondries et un nombre variable de noyaux sont refoulés à la périphérie de la cellule. Pour ce qui est de la forme granulaire, on considère qu'elle diffère de la forme vacuolaire par la seule présence de granules hétérogènes remplissant la vacuole centrale. Elle pourrait donc être une forme vacuolaire à granules plutôt qu'un stade parasitaire distinct. Cependant, cette forme est beaucoup moins fréquemment retrouvée dans les échantillons de selles fraîches et en culture que la forme vacuolaire. La forme amiboïde quant à elle n'a que très rarement été reportée et plutôt dans des cultures ou dans les selles de patients diarrhéiques. Aussi, cette forme a été suggérée pouvant jouer un rôle dans la pathogénicité du parasite (Tan et Suresh, 2006a,b ; Katsarou-Katsari et al., 2008) mais cette hypothèse n'a jamais pu être confirmée. Elle est présente sous une forme irrégulière avec souvent un ou deux grands pseudopodes et des bactéries et des débris bactériens préalablement endocytés. Enfin, la forme kystique est la forme la plus récemment décrite du fait de sa petite taille (2 à 5  $\mu\text{m}$ ) et d'une confusion possible avec des débris fécaux. Cette forme est ovoïde ou sphérique, protégée par une paroi pouvant être composée de plusieurs couches et est presque uniquement identifiée dans les échantillons de selles. Il a en outre été montré que cette forme est résistante aux méthodes classiques de désinfection de l'eau et est capable de survivre dans l'environnement pendant plus d'un mois à température ambiante et au moins deux mois à 4°C (Moe et al., 1996 ; Yoshikawa et al., 2004a). Elle est considérée comme la forme de résistance et de transmission du parasite (Suresh et al., 2005). Ceci a été confirmé par l'utilisation de kystes isolés de selles animales ou humaines pour réaliser diverses infections expérimentales chez des rats, des souris, des cobayes ou des poulets (Iguchi et al., 2007 ; Hussein et al., 2008).

A partir de toutes ces observations, un cycle biologique de *Blastocystis* sp. a été proposé (Tan, 2004 ; Tan, 2008) (**Figure 3**) même si l'actuelle absence d'un modèle animal reproductible ne permet pas d'élucider définitivement ce cycle. Sans rentrer dans les détails, les kystes à paroi épaisse présents dans l'environnement sont ingérés par l'hôte qu'il soit humain ou animal. Ils traversent le tube digestif puis se transforment en formes vacuolaires dans le gros intestin. Ces formes vacuolaires peuvent ensuite se multiplier par fission binaire

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

ou se transformer pour certaines d'entre elles en formes granulaires ou amiboïdes. Enfin, une partie des formes vacuolaires s'enkyste lors de la traversée du côlon conduisant à l'excrétion de kystes dans les fèces qui peuvent disséminer dans l'environnement et ainsi contaminer un nouvel ou le même hôte.

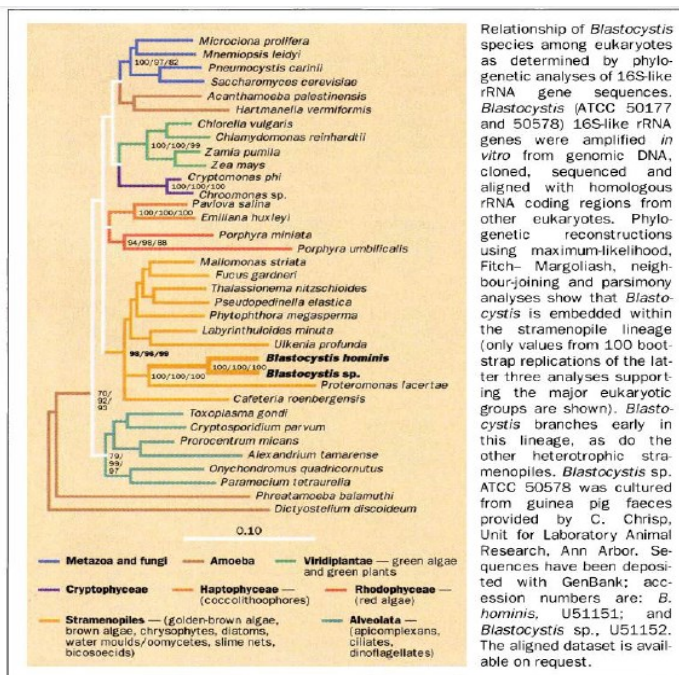


**Figure 3:** Cycle de vie proposé pour *Blastocystis* sp. (Tan, 2008).

En lien avec les données décrites ci-dessus et comme pour la majorité des protozoaires intestinaux, la voie féco-orale est considérée comme le principal mode de transmission de *Blastocystis* sp. et ce par voie essentiellement indirecte via la consommation d'eau ou de nourriture contaminées par des kystes (Tan, 2004 ; Tan, 2008 ; Leelayoova et al., 2008 ; Eroglu et Koltas, 2010).

## 2. Taxonomie et diversité génétique de *Blastocystis* sp.

Depuis sa découverte en 1911 par Alexieff (*Blastocystis enterocola*) et son intégration au groupe des champignons, il a fallu attendre plus de 50 ans et de nombreux errements taxonomiques pour voir ce microorganisme enfin classé parmi les protozoaires sur la base de critères morphologiques ou de sensibilité à certaines drogues (Zierdt et al., 1967 ; Zierdt, 1991). Avec l'essor dans les années 1990 de la biologie moléculaire et de l'utilisation de certains gènes comme marqueurs phylogénétiques, *Blastocystis* a pu trouver sa place dans l'arbre du vivant. Sur la base de la comparaison des séquences du gène codant l'ARN de la petite sous-unité ribosomique (ARNr 18S), ce protozoaire a été classé dans le groupe très hétérogène des Straménopiles (Silberman et al., 1996) qui englobe aussi bien les algues brunes, les diatomées que les oomycètes (parasites de plantes) (Figures 4 et 5). Au sein de ce groupe, *Blastocystis* est d'ailleurs le seul Straménopile capable d'infecter l'Homme suggérant ainsi une évolution probablement récente de ce microorganisme vers le parasitisme.



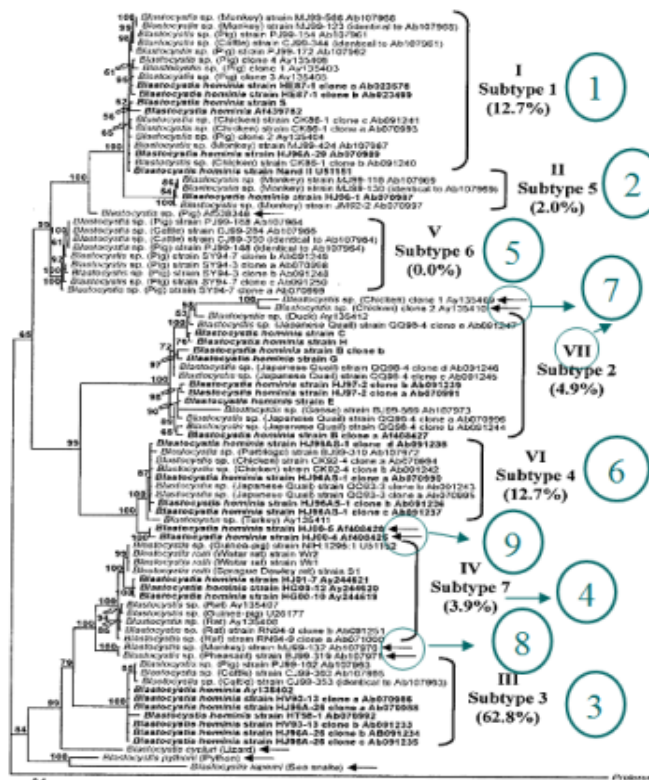
**Figure 4:** Relations de parenté du genre *Blastocystis* avec d'autres eucaryotes basées sur la comparaison des séquences du gène codant l'ARNr 18S (Silberman et al., 1996). Les Straménopiles correspondent aux branches orange de l'arbre.

**Figure 5:** Exemples d'organismes appartenant au groupe des Straménopiles : *Phytophthora infestans* (oomycète) (A) *Thalassiorira pseudonana* (diatomée) (B) et *Laminaria digitata* (algue brune) (C).  
<http://www.bioimages.org.uk> (A)  
<http://www.sbae-industries.com> (B) et  
<http://www.sbroscoff.fr> (C)



# ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

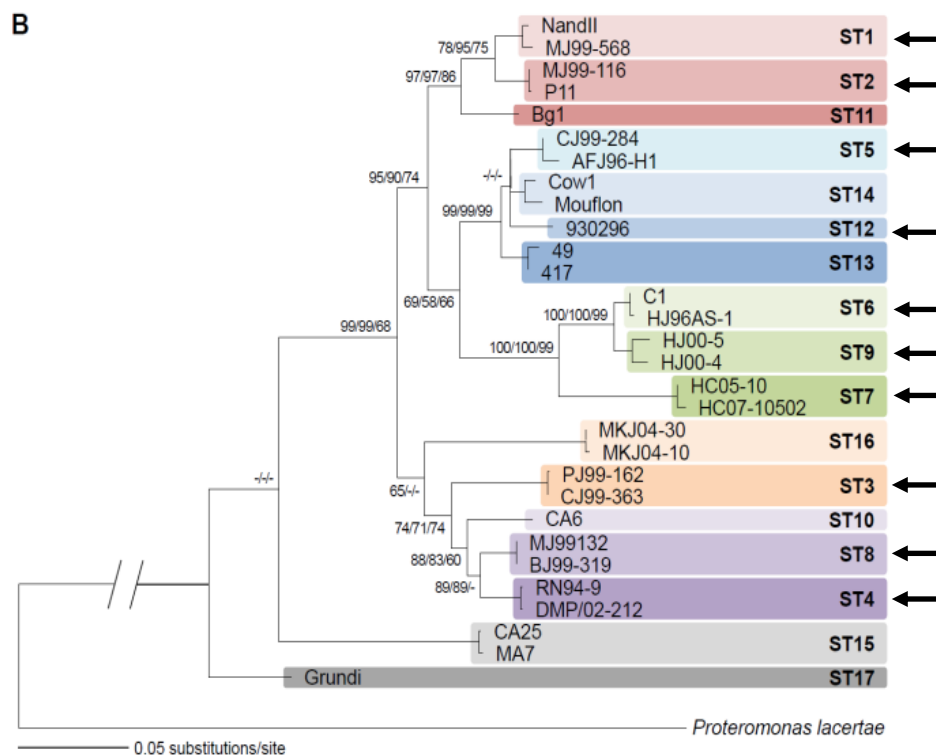
La taxonomie au sein du genre *Blastocystis* est elle aussi longtemps restée incertaine. En effet, ce protozoaire est retrouvé chez de très nombreux groupes d'animaux des mammifères aux oiseaux en passant par les reptiles et les insectes (Boreham et Stenzel, 1993 ; Stenzel et Boreham, 1996 ; Tan, 2004 ; Tan, 2008). Comme aucune différence morphologique significative n'avait pu être mise en évidence entre isolats provenant d'hôtes très variés, plusieurs espèces furent décrites avec une nomination dépendante de l'animal chez lequel elles avaient été observées. En plus de *B. hominis* chez l'Homme ont été proposées par exemple les espèces *B. ratti* chez le rat, *B. galli* chez le poulet, *B. geocheloni* chez la tortue ou *B. pythoni* chez le python (Belova et Kostenko, 1990 ; Singh et al., 1996 ; Chen et al., 1997). Cependant, les premières données moléculaires utilisant des approches de Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Yoshikawa et al., 1998 ; Yoshikawa et al., 2003 ; Tan et al., 2006) ou de Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) basée sur l'amplification des gènes codant l'ARNr 18S (Böhm-Gloning et al., 1997 ; Hoevers et al., 2000) ou l'Elongation Factor 1 $\alpha$  (Ho et al., 2001) montraient une forte hétérogénéité moléculaire entre isolats mais aussi une forte similarité de profils entre certains isolats humains et animaux suggérant ainsi une faible spécificité d'hôte du parasite. Il a cependant fallu attendre le début des années 2000 et les travaux d'Arisue et al., (2003) et de Noël et al., (2003) pour obtenir et comparer les premières séquences du gène codant l'ARNr 18S pour différents isolats humains et animaux. Cette diversité génétique entre isolats de *Blastocystis* fut confirmée et certaines séquences d'isolats provenant d'hôtes différents étaient bien identiques.



**Figure 6:** Phylogénie moléculaire des isolats du genre *Blastocystis* basée sur la comparaison des séquences complètes du gène codante l'ARNr 18S indiquant l'existence d'au moins 9 sous-types (Noël et al., 2005). Les isolats humains apparaissent en gras. On note que les séquences de certains isolats humains sont identiques à celles d'isolats animaux.

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

Toutes ces observations furent aussi confirmées dans l'étude de Noël et al., (2005) qui présentait la toute première analyse phylogénétique à grande échelle basée sur la comparaison de toutes les séquences du gène codant l'ARNr 18S disponibles dans les bases de données pour le genre *Blastocystis* (**Figure 6**). Ainsi ces auteurs suggéraient l'existence d'au moins 9 sous-types (STs) différents de *Blastocystis* avec plusieurs de ces STs pouvant infecter l'Homme mais aussi plusieurs groupes d'animaux. De cette étude a donc été émise l'hypothèse du potentiel zoonotique de ce parasite. Deux ans plus tard, Stensvold et al., (2007a) confirmaient la création de ces 9 STs tout en proposant d'assigner à chaque isolat sous-typé le nom de *Blastocystis* sp. suivi de son ST. En particulier, le taxon *B. hominis* n'était plus valable et ne devait donc plus être utilisé. Par la suite, plusieurs autres STs ont été identifiés chez différents hôtes (Stensvold et al., 2009 ; Parkar et al., 2010 ; Fayer et al., 2012 ; Alfellani et al., 2013a,b). A ce jour, 17 STs ont été caractérisés chez les mammifères et les oiseaux (Alfellani et al., 2013a) (**Figure 7**) en sachant que d'autres STs potentiels ont déjà été identifiés chez les reptiles et chez les insectes (Yoshikawa et al., 2016 ; Cian et al., 2017).



**Figure 7 :** Phylogénie du genre *Blastocystis* établie d'après la comparaison des séquences du gène codant l'ARNr 18S (Cian et al., 2016). Les flèches indiquent les 10 STs identifiés chez l'Homme.



### **3. Détection de *Blastocystis* sp. dans les échantillons biologiques**

#### **a. Les méthodes microscopiques et culturales**

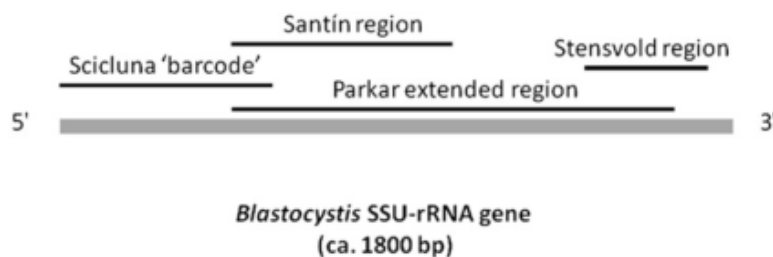
Dans l'énorme majorité des laboratoires hospitaliers, la recherche de *Blastocystis* sp. n'est généralement pas effectuée puisque la pathogénicité de ce protozoaire reste encore incertaine. Cependant, en absence par exemple de tout autre agent causal de diarrhée chez un patient, cette recherche peut être réalisée via un examen macroscopique de selles fraîches puis microscopique consistant en un examen direct au grossissement x400 d'un frottis de selle diluée dans du sérum physiologique. La présence d'au moins 5 parasites par champ à ce grossissement indique la positivité d'un échantillon (Tan, 2004 ; Tan, 2008). Comme souligné précédemment, les formes kystiques sont difficilement identifiables dans les selles au milieu des débris fécaux et autres champignons. De plus, la forme vacuolaire, facilement reconnaissable et outil de diagnostic, n'est pas toujours prédominante puisque l'excrétion de parasites dans les selles peut être irrégulière (Vennila et al., 1999 ; Van Gool et al., 2003) d'où la nécessité de réaliser plusieurs prélèvements à des intervalles de quelques jours chez un même patient. Aussi, comme nous le verrons ci-dessous, cette approche microscopique reste peu sensible par rapport aux méthodes moléculaires et a tendance à sous-estimer la réelle prévalence du parasite. Cependant, l'expertise affirmée d'un technicien dans l'observation permet de réduire cette sous-estimation (Bart et al., 2013). Avant observation, il est aussi possible de réaliser une étape préalable de concentration classique des selles au formol/éther en particulier pour détecter les formes kystiques (Koltas et al., 2014) mais cette étape est à proscrire pour les formes vacuolaires du fait de l'agressivité de ce mélange (Suresh et Smith, 2004 ; Stensvold et al., 2007b). La coloration de frottis au trichrome peut également légèrement améliorer l'identification du parasite (Termmathurapoj et al., 2004 ; Stensvold et al., 2007b). Une seconde méthode non moléculaire consiste en la mise en culture xénique en anaérobiose d'un échantillon de selles dans du milieu de Jones pendant 24 à 72 heures avant observation microscopique (Suresh et Smith, 2004 ; Stensvold et al., 2007b). Cette méthode est certes plus sensible que la simple observation microscopique de frottis mais a aussi plusieurs inconvénients majeurs. Le premier est qu'en cas d'infection mixte c'est-à-dire la présence d'au moins deux STs différents de *Blastocystis* sp. dans un même échantillon, la culture peut favoriser le développement d'un ST par rapport à un autre et fausser ainsi des données d'épidémiologie moléculaire ultérieures (Parkar et al., 2007 ; Roberts et al., 2013). Le second est que ce milieu ne permet pas toujours la culture de tous les isolats (Parkar et al.,

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

2007 ; Tan 2008). Enfin, le troisième est que cette méthode est très lourde et chronophage et peut difficilement être mise en place dans le cadre de larges enquêtes épidémiologiques.

### **b. Les méthodes moléculaires et le sous-typage**

Les premières approches moléculaires de détection ont été développées il y a plus de 20 ans par différents groupes en développant les méthodes de RAPD et de RFLP ciblant le gène codant l'ARNr 18S (Yoshikawa et al., 1996a,b ; Böhm-Gloning et al., 1997 ; Yoshikawa et al., 2004b ; Tan et al., 2006). Même si aujourd'hui elles ne sont quasiment plus utilisées pour différentes raisons non détaillées ici, la méthode de RAPD a cependant permis de déterminer des amorces spécifiques de 7 STs de *Blastocystis* sp. (ST1 à ST7) pouvant être éventuellement utiles pour analyser ponctuellement des cas d'infections mixtes (Yoshikawa et al., 1998). Très rapidement, afin à la fois de pouvoir détecter le parasite puis de le sous-typer par séquençage, plusieurs approches de PCR conventionnelle ont été développées utilisant des amorces spécifiques du genre *Blastocystis* et ciblant des domaines de longueur variable du gène codant l'ARNr 18S (Sciicluna et al., 2006 ; Stensvold et al., 2006 ; Parkar et al., 2010 ; Santin et al., 2011) (**Figure 8**).



**Figure 8:** Représentation schématique du gène codant l'ARNr 18S de *Blastocystis* sp. Les régions de ce gène utilisées par différents auteurs pour l'identification et le sous-typage des isolats de *Blastocystis* sp. sont représentées (Clark et al., 2013).

Plus récemment, et afin de gagner en sensibilité, des outils de PCR quantitative en temps réel (qPCR) ont été développés ciblant un gène inconnu (Jones et al., 2008) ou le gène codant l'ARNr 18S (Poirier et al., 2011 ; Stensvold et al., 2012). Concernant ces deux dernières études, la première, qui est la plus utilisée dans le cadre d'études épidémiologiques (El Safadi et al., 2016 ; Cian et al., 2017 ; Greige et al., 2018), utilise une technologie SYBR green et permet l'amplification d'un fragment d'environ 350 pb pour tous les STs de

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

*Blastocystis* sp. Le produit de PCR obtenu peut alors être séquencé pour vérifier la spécificité de celui-ci puis être comparé aux séquences homologues représentatives des différents STs de *Blastocystis* sp. disponibles dans les bases de données. Un pourcentage d'identité supérieur ou égal à 95% permet l'assignation d'un isolat à un ST donné alors qu'une valeur inférieure à ce seuil peut évoquer un nouveau ST (Stensvold et Clark, 2016). Cette valeur de 95% a été fixée en tenant compte du niveau de polymorphisme génétique observé au sein de certains STs. Si cette valeur est inférieure à 95%, la confirmation d'un nouveau ST est nécessaire par l'obtention de la séquence complète du gène de l'isolat correspondant suivie de son intégration dans une large analyse phylogénétique. La seconde étude de Stensvold et al., (2012) utilise, quant à elle, la technologie TaqMan avec une sonde contrôle interne. Cette approche peut éventuellement permettre de gagner en spécificité mais a l'inconvénient majeur d'empêcher tout séquençage direct du produit d'amplification. Globalement, des études comparatives ont montré que la PCR, qui est maintenant la méthode de référence, était nettement plus sensible que les approches morphologiques de détection (Stensvold et al., 2007b ; Poirier et al., 2011 ; Roberts et al., 2011 ; Santos et Rivera, 2013 ; Osman et al., 2016 ; Stensvold et Clark, 2016). Elle permet en outre de réaliser le sous-typage des isolats par séquençage direct du produit d'amplification. Par contre l'inconvénient majeur reste l'impossibilité de caractériser les éventuelles infections mixtes. En effet, une infection mixte est détectée après séquençage par des doubles traces sur les chromatogrammes de séquence. Pour identifier les STs impliqués, il est alors nécessaire de cloner le produit de PCR obtenu et de procéder au séquençage d'un nombre important de clones (Meloni et al., 2012) ce qui est difficilement réalisable pour des raisons de coût dans le cadre d'études épidémiologiques à grande échelle. Le développement de couples d'amorces spécifiques de chaque ST de *Blastocystis* sp. et utilisables dans une PCR multiplex dans le cadre de ces infections mixtes est actuellement en cours. Cependant, cette PCR multiplex qui cible le gène codant l'ARNr 18S est limitée pour l'instant à 4 (Scanlan et al., 2015) ou 9 (Yoshikawa et Iwamasa, 2016) des 17 STs identifiés et ne fournit bien entendu aucune donnée de séquence.

#### **4. Prévalence de *Blastocystis* sp. dans la population humaine**

Depuis ces vingt à trente dernières années, une recrudescence du nombre d'études épidémiologiques visant à déterminer la prévalence de *Blastocystis* sp. dans les diverses régions du globe a été observée. Nous ne pourrions donc pas, dans cette thèse, résumer toutes ces données qui ont d'ailleurs été en partie synthétisées dans quelques revues (Stenzel et

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

Boreham, 1996 ; Tan, 2008). D'autre part, nous ne donnerons volontairement que les valeurs de prévalence obtenues uniquement par des méthodes moléculaires afin d'avoir une idée globale et précise de l'impact de ce parasite à travers le monde. En effet, les données obtenues par des méthodes microscopiques sont trop dépendantes de différents paramètres comme l'expérience de l'observateur ou la qualité et la conservation des échantillons. Par exemple, la prévalence de *Blastocystis* sp. déterminée par ces méthodes microscopiques est comprise entre 3,9% (Sinniah et al., 2012) et 52,3% (Noor Azian et al., 2007) dans différentes populations arborigènes malaisiennes. Même si les modes de contamination et les réservoirs du parasite peuvent être naturellement variables d'une région à l'autre, un tel écart dans les valeurs observées reste cependant difficilement explicable.

En Asie, dans une région très urbanisée comme Singapour, la prévalence de *Blastocystis* sp. dépasse légèrement les 3% (Wong et al., 2008). Par contre, elle est plus importante (25%) dans une région rurale aux Philippines (Santos et Rivera, 2013), dans un internat de jeunes filles (31,9%) (Thataisong et al., 2013) ou dans différents villages (37,2% et 23%) (Popruk et al., 2015 ; Yowang et al., 2018) de Thaïlande et chez des éleveurs Cambodgiens (55,2%) (Wang et al., 2014). Au Népal, elle est d'environ 25% dans la population globale ou chez les enfants (Yoshikawa et al., 2009 ; Lee et al., 2012). En Chine, le taux d'infection du parasite est compris entre 1,9% et 32,6% selon les régions (Li et al., 2007a,b) et il est de 40,4% en Malaisie (Noradilah et al., 2017). A la limite du continent asiatique, deux études conduites en Turquie montrent des prévalences de 7,4% chez des adultes (Sankur et al., 2017) et de 37,9% chez les enfants (Dogan et al., 2017).

En Afrique, assez peu d'enquêtes ont finalement été publiées malgré l'impact des parasitoses intestinales sur ce continent. Cependant, la prévalence du parasite est globalement très importante probablement en lien avec les conditions sanitaires souvent difficiles rencontrées dans certains pays. Des données sont ainsi disponibles en Lybie (28%) (Alfellani et al., 2013c), en Afrique de l'Ouest comme au Liberia (70%) (Alfellani et al., 2013c) et au Nigeria (49% et 84%) (Alfellani et al., 2013c ; Poulsen et al., 2016) et en Côte d'Ivoire (58,2%) (D'Alfonso et al., 2017) ainsi qu'en Afrique de l'Est comme en Tanzanie (61%) (Forsell et al., 2016). Cette prévalence explose même au Sénégal puisque la prévalence observée est de 100% dans une cohorte d'une centaine d'enfants (El Safadi et al., 2014). C'est d'ailleurs la plus forte prévalence jamais observée à travers le monde pour un parasite intestinal.

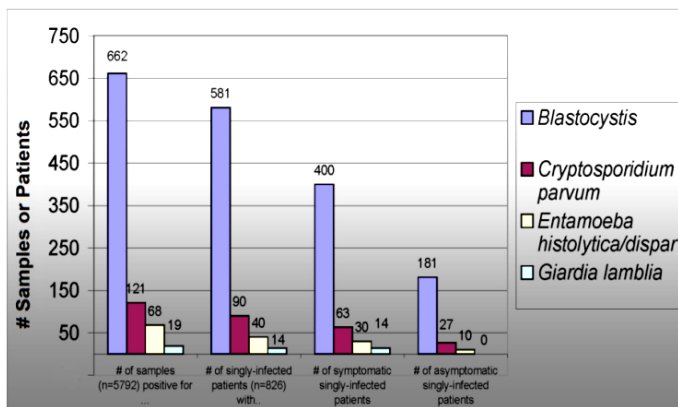
Pour ce qui est du continent nord-américain, des études ont été menées aux USA (7%) (Scanlan et al., 2016) et au Mexique (74%) (Rojas-Veazquez et al., 2018). En Amérique du

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

Sud, et particulièrement en Colombie, les prévalences observées sont de 45% chez des adultes originaires d'une zone rurale (Ramirez et al., 2014) et de 88,7% chez des enfants vivant dans le bassin amazonien (88,7%) (Sanchez et al., 2017). Elles sont de 21% dans une communauté indigène (Malheiros et al., 2011) ou dans des régions rurales (55,8%) (Barbosa et al., 2018) du Brésil. En Océanie, les seules données concernent l'Australie et la région de Sydney (19%) (Roberts et al., 2013) ainsi que le personnel de fermes localisées dans le Queensland (83,3%) (Wang et al., 2014).

Concernant l'Europe, le nombre d'enquêtes menées est finalement là encore assez limité. On peut citer les prévalences observées aux Pays-Bas dans la population globale d'Amsterdam (24,2%) (Bart et al., 2013) ou chez les enfants scolarisés dans une autre région du pays (43%) (Maas et al., 2013), en Irlande (5%) chez des enfants (Scanlan et al., 2018) ainsi qu'au Danemark (24%) (Stensvold et al., 2007b), en Italie (14,9%) (Beghini et al., 2017), à Chypre (27,8%) (Seyer et al., 2017) et en France (18,3%) (Cian et al., 2016) chez des adultes. Enfin, pour ce qui est du Moyen Orient, les seules données obtenues par des méthodes moléculaires concernent l'Arabie Saoudite (10,5%) (Mohamed et al., 2017), les Emirats Arabes Unis (44,4%) (AbuOdeh et al., 2016) et le pays qui nous intéresse tout particulièrement dans cette thèse en l'occurrence le Liban avec une prévalence de 63% chez des enfants scolarisés dans la ville de Tripoli (Osman et al., 2016).

Pris dans leur globalité, tous ces chiffres reflètent une prévalence généralement importante de ce protozoaire quelle que soit la zone géographique étudiée et indiquent que *Blastocystis* est de loin le protozoaire parasite intestinal le plus fréquemment retrouvé dans les selles humaines (Boorom et al., 2008 ; Osman et al., 2016) (**Figure 9**).



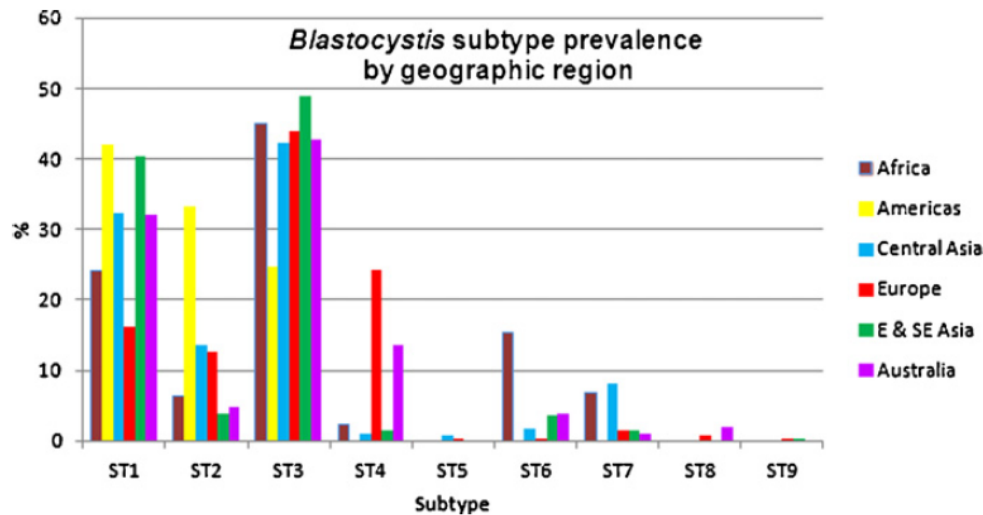
**Figure 9:** Comparaison de la prévalence des protozoaires parasites intestinaux *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia* et *Entamoeba* aux USA (Boorom et al., 2008).

### 5. Distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans la population humaine

La littérature décrivant la fréquence des différents STs dans de nombreux pays est

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

extrêmement dense et a été en partie synthétisée dans différentes revues dont celles de Tan (2008), Clark et al., (2013), Stensvold et Clark (2016) et Cian et al., (2016). Comme indiqué précédemment, 17 STs ont été identifiés jusqu'à présent parmi les isolats de mammifères et d'oiseaux, chacun d'entre eux pouvant représenter une espèce du fait des distances évolutives observées entre STs (**Figure 7**). En outre, 10 de ces 17 STs (ST1 à ST9 et ST12) ont été trouvés chez l'Homme avec des fréquences très variables entre STs ou même au sein du même ST d'un continent à l'autre (Alfellani et al., 2013b ; Ramirez et al., 2016) (**Figure 10**).



**Figure 10:** Synthèse de la distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans la population humaine par région géographique (Alfellani et al., 2013b). Ce graphe n'incluait pas les 3 cas d'infection par ST12 mis en évidence plus récemment en Colombie (Ramirez et al., 2016).

Brièvement, on note que les ST1, ST2, ST3 et ST4 représentent à eux quatre plus de 90% des isolats de *Blastocystis* sp. sous-typés et que le ST3 est généralement prédominant. Sans rentrer dans les détails, les enquêtes épidémiologiques publiées depuis cette synthèse confirment ces données. Aussi, même si comme nous le verrons ci-dessous ces STs peuvent être trouvés chez les animaux, leur prévalence importante dans la population humaine peut logiquement s'expliquer par une large transmission inter-humaine. Pour ce qui est des autres STs (ST5 à ST9 et ST12) qui restent, en proportion, minoritaires, ils sont considérés comme des STs d'origine animale (voir ci-dessous) et de ce fait, leur présence dans la population humaine pourrait s'expliquer par une transmission zoonotique.

Il est intéressant de noter que les plus fortes variations géographiques de prévalence concernent le ST4. En effet, ce ST4 est fréquemment trouvé en Europe et rarement ou pas du tout sur les autres continents. Des études postérieures à la synthèse d'Alfellani et al., (2013b)

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

et conduites en Pologne (Kaczmarek et al., 2017), en Suède (Forsell et al., 2017), en Italie (Mattiucci et al., 2015 ; Beghini et al., 2017) ou à Chypre (Sever et al., 2017) confirment bien la présence courante du ST4 sur le continent européen. Comme suggéré par Clark et al., (2013), le ST4 aurait donc émergé récemment sur le continent européen mais l'origine de cette émergence reste encore indéterminée.

Dans le cadre de ma thèse, si on s'intéresse plus particulièrement au Moyen-Orient et à quelques pays limitrophes, la distribution des STs est très similaire avec une prédominance du ST3 suivi du ST1 ou du ST2 sans présence d'aucun autre ST. C'est le cas par exemple en Arabie Saoudite (Mohamed et al., 2017) et aux Emirats Arabes Unis (AbuOdeh et al., 2016) ainsi qu'en Iran (Jalallou et al., 2017 ; Salehi et al., 2017), en Lybie (Abdulsalam et al., 2013) et en Turquie (Alinaghizade et al., 2017 ; Mirjalali et al., 2017). Dans ces mêmes pays, d'autres enquêtes ont pu montrer, en plus de ces 3 STs, majeurs quelques cas sporadiques d'infection par le ST6 et/ou le ST7 en Iran (Rezaei Riabi et al., 2018), en Turquie (Sankur et al., 2017) et en Lybie (Alfellani et al., 2013b). Il en est de même pour le ST4 en Iran (Khademvatan et al., 2017) et en Turquie (Dogan et al., 2017). Pour ce qui est du Liban, les premières données de sous-typage des isolats de *Blastocystis* sp. ont été obtenues dans le cadre d'une enquête menée sur 220 patients suivis dans plusieurs hôpitaux de Tripoli (El Safadi et al., 2013). Parmi les isolats identifiés, 36 d'entre eux ont été sous-typés et montraient une répartition quasi-identique au sein des ST1 (30,6%), ST2 (33,3%) et ST3 (33,3%). Seul un patient s'est avéré être infecté par le ST4 (2,8%). Plus récemment, une cohorte composée de 249 enfants scolarisés dans la même région de Tripoli a été examinée pour la présence du parasite et 138 isolats ont été sous-typés. Seuls les ST1 (25,4%), ST2 (28,3%) et ST3 (46,3%) ont été identifiés avec une large prédominance de ce dernier.

### **6. Prévalence de *Blastocystis* sp. et distribution des STs dans la population animale**

Comme indiqué précédemment, *Blastocystis* sp. colonise le tube digestif d'un très grand nombre d'animaux que ce soit les primates non humains et autres mammifères (carnivores, artiodactyles, perissodactyles, proboscides, rongeurs et chiroptères), les marsupiaux, les oiseaux, les amphibiens, les reptiles, les poissons et les insectes (Boreham et Stenzel, 1993 ; Stenzel et Boreham, 1996 ; Tan, 2004 ; Tan, 2008 ; Yoshikawa et al., 2016 ; Cian et al., 2017). A ce jour, un grand nombre d'études épidémiologiques ont été reportées chez des animaux sauvages, domestiques ou en captivité couplées pour certaines d'entre elles avec l'identification moléculaire des isolats pour un échantillonnage d'espèces plus ou moins

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

diversifié (Stensvold et al., 2009 ; Parkar et al., 2010 ; Alfellani et al., 2013a ; Alfellani et al., 2013c ; Roberts et al., 2013). A ce jour, la plus large étude épidémiologique menée chez les animaux est celle de Cian et al., (2017) dans laquelle *Blastocystis* sp. a été recherché par qPCR dans plus de 160 espèces animales vivant en captivité dans des zoos français. De plus, cette enquête a aussi compilé toutes les données obtenues dans des études précédentes permettant ainsi d'avoir une vision très synthétique de la prévalence du parasite et de la répartition des différents STs dans chaque groupe d'animaux (**Annexe 1**). C'est cette publication et cette synthèse qui serviront de trame à ce chapitre.

Toutes les données obtenues montrent que les primates non humains sont des hôtes fréquents du parasite quelque soient leur mode de vie ou leur origine géographique. Ainsi la prévalence du parasite dépasse largement les 50% dans de nombreuses études réalisées par exemple en Italie (Zanzani et al., 2016), en Equateur (Helenbrook et al., 2015) ou en Tanzanie (Kalousova et al., 2014). Pour ce qui est des STs prédominants chez ces animaux, ce sont les ST1, ST2, ST3 et ST8 (**Annexe 1**). Ces trois premiers STs sont aussi les STs prédominants dans la population humaine et cette concordance pourrait être en relation avec la parenté évolutive du singe et de l'Homme (Cian et al., 2016). Pour ce qui est du ST8, il pourrait être en partie spécifique des primates puisqu'il n'a aussi seulement été retrouvé que chez les marsupiaux (Ramirez et al., 2014).

Le second grand groupe concerne les carnivores et englobe donc bon nombre d'animaux de compagnie (chiens et chats). Au contraire des primates, ce groupe semble être très peu infecté par *Blastocystis* sp. et ne serait donc pas un hôte naturel du parasite en tout cas en ce qui concerne les canidés qui ont concentré la plupart des études (Wang et al., 2013 ; Ruaux et Stang, 2014 ; Osman et al., 2015). Les STs identifiés sont très majoritairement ceux identifiés aussi chez l'Homme et plusieurs groupes d'animaux en l'occurrence les ST1, ST2 et ST3 (**Annexe 1**). Aucun ST ne semble être particulièrement spécifique de ce groupe d'animaux.

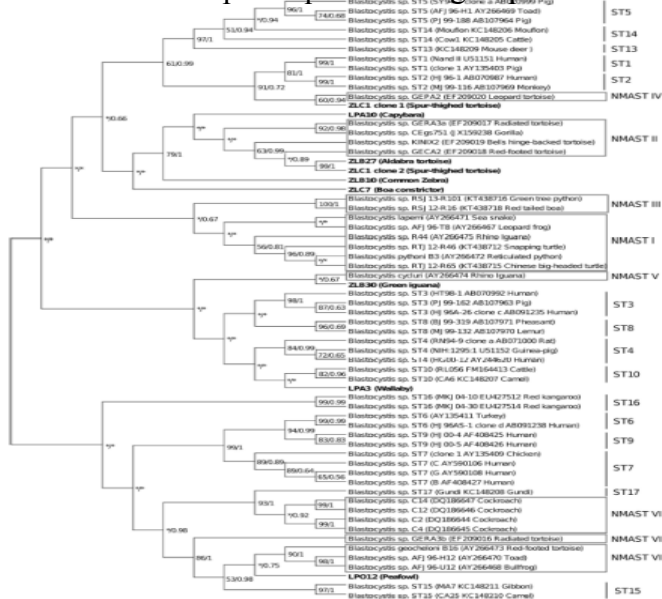
Les deux groupes d'animaux ayant un intérêt majeur vis-à-vis de mon étude sont d'une part, les Artiodactyles et en particulier, les bovins et d'autre part, les oiseaux et principalement, les volailles. Concernant les Artiodactyles, l'énorme majorité des études concernent les familles des Bovidae et des Suidae. Sans rentrer dans les détails, ces deux familles se sont avérées être fréquemment infectées par *Blastocystis* sp. Par exemple, la prévalence du parasite dépasse les 70% dans des cohortes de vaches domestiques au Japon (Abe et al., 2002) et en Colombie (Ramirez et al., 2014) ainsi que dans un élevage intensif de porcs en Australie (Wang et al., 2014). Sur un plan moléculaire, pas moins de 12 STs ont été



# ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

identifiés chez les Artiodactyles avec une prévalence variable (**Annexe 1**). Les STs prédominants sont les ST1 et ST10 chez les Bovidae et les ST1 et ST5 chez les Suidae. Pour ce qui est du ST1, il est difficile de savoir si il est spécifique de ce groupe puisqu'il a été identifié chez l'Homme et de nombreux groupes d'animaux. Par contre, du fait de sa prédominance, le ST5 est considéré comme un ST spécifique des porcs (Wang et al., 2014). Cette spécificité d'hôte a aussi été suggérée pour les ST10 et ST14 chez les bovins (Cian et al., 2017), STs qui d'ailleurs, au contraire du ST5, n'ont encore jamais été retrouvés chez l'Homme.

Pour ce qui est des oiseaux, la majorité des enquêtes portent sur les galliformes incluant les volailles. Ces animaux sont fréquemment infectés par *Blastocystis* sp. (prévalence de 30 à 35%) comme en témoignent les études conduites sur des poulets domestiques collectés dans des marchés ou des fermes au Brésil (Bergamo do Bomfilm et al., 2013), en Indonésie (Yoshikawa et al., 2016) ou en Malaisie (Farah Haziqah et al., 2014). Cependant, malgré la forte prévalence du parasite chez les volailles, très peu d'isolats d'oiseaux ont été sous-typés (**Annexe 1**). Pourtant, les ST6 et ST7 sont largement prédominants dans ce groupe d'animaux d'où l'hypothèse émise que ces deux STs correspondraient à des STs aviaires (Noël et al., 2005 ; Stensvold et al., 2009 ; Cian et al., 2017). Concernant les autres groupes de mammifères comme les perissodactyles, proboscidiés, chiroptères, rongeurs et marsupiaux, le nombre d'isolats sous-typés est beaucoup trop limité pour établir une quelconque tendance dans la prédominance de certains STs même si, par exemple, le ST4 semble prédominant chez les rongeurs. Concernant les reptiles, amphibiens et insectes, là encore les données sont trop restreintes avec de plus la présence suggérée de nouveaux STs appelés NMASTs pour « Non mammalian and avian STs » (**Figure 11**) non retrouvés chez d'autres hôtes et qui pourraient donc être spécifiques de ces groupes d'animaux.



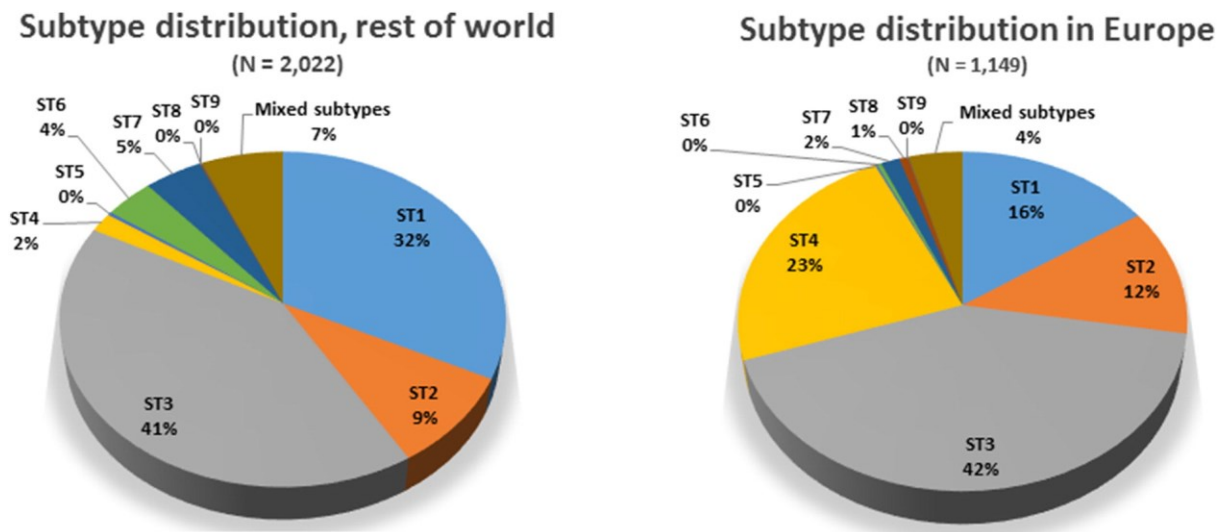
**Figure 11:** Identification de 7 NMASTs composés essentiellement de séquences du gène codant l'ARNr 18S d'isolats de reptiles et d'insectes (Cian et al., 2017).

### 7. Evaluation du potentiel zoonotique de *Blastocystis* sp.

Au regard de l'ubiquité de *Blastocystis* sp. dans le monde animal et de sa forte prévalence dans plusieurs groupes d'animaux pouvant être en contact avec l'Homme, la question du potentiel zoonotique du parasite fut très vite posée. Cependant, pour confirmer toute transmission zoonotique, plusieurs conditions doivent être réunies. La première est que le groupe animal considéré doit être fréquemment infecté par le parasite et qu'il soit bien sûr en contact étroit avec la population humaine pour que le risque de transmission soit réel. La seconde est que ce groupe animal soit colonisé par un ou des STs qui lui sont de préférence spécifiques afin de s'assurer de ce type de transmission. Enfin la troisième est que les séquences des isolats humains et animaux impliqués et appartenant aux mêmes STs soient identiques. Aussi, très peu d'études ont rempli ces différents critères du fait de la difficulté de leur mise en place. On peut cependant citer l'étude de Stensvold et al., (2009) qui a montré que le ST8, généralement très rare chez l'Homme mais fréquent chez les primates non humains, était présent avec une prévalence anormalement élevée chez les gardiens d'un zoo anglais s'occupant des singes et que les séquences des isolats de ST8 humains et animaux présentaient 100% d'identité. Le second exemple lui aussi très démonstratif est celui de l'étude menée par Wang et al., (2014) dans une porcherie en Australie. Les auteurs ont d'abord montré que les porcs présentaient un taux d'infection par *Blastocystis* sp. très important et que seul le ST5 était présent chez les animaux parasités. D'autre part, alors que le ST5 n'est que rarement identifié dans la population humaine, il était fréquemment retrouvé chez le personnel de cette porcherie. En outre, les isolats humains de ST5 présentaient 100% d'identité avec ceux de ST5 des porcs. Ces enquêtes confirmaient donc la transmission zoonotique de *Blastocystis* sp. qui est naturellement favorisée par un contact direct et répété avec les animaux.

Concernant les ST6 et ST7 considérés comme des STs aviaires, il a logiquement été suggéré que leur présence dans la population humaine était liée à une transmission zoonotique (Noël et al., 2005 ; Stensvold et al., 2009 ; Cian et al., 2017). Or, cette transmission zoonotique n'a jamais été réellement confirmée, par exemple, via la comparaison des séquences des isolats humains et de volailles appartenant à ces STs et identifiés dans un même environnement. Pourtant, en dehors de l'Europe, les ST6 et ST7 représentent près de 10% des isolats sous-typés jusqu'à présent reflétant l'impact probablement majeur de ce type de transmission (**Figure 12**). Enfin, les ST10 et ST14 sont, comme décrits précédemment, des STs semblant spécifiques des bovins. Or à ce jour, aucun isolat de ces deux STs n'a été trouvé

dans la population humaine suggérant ainsi un risque de transmission zoonotique du parasite très limité par contact avec ces animaux.



**Figure 12:** Synthèse de la distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans la population humaine non européenne à gauche et européenne à droite (Stensvold et Clark, 2016). A noter la prévalence importante des ST6 et ST7 hors de l'Europe mais aussi la forte prévalence du ST4 en Europe mais pas dans les autres continents.

### **8. Différents modes de transmission de *Blastocystis* sp.**

La transmission zoonotique du parasite aurait, d'après les quelques chiffres cités ci-dessus, un impact non négligeable dans la prévalence de *Blastocystis* sp. dans la population humaine. Cependant, la prépondérance des ST1, ST2, ST3 et éventuellement du ST4 selon les régions dans cette même population suggère une transmission anthroponotique majeure qui peut être directe ou indirecte. Un mode de contamination inter-humain direct par contact avec des patients infectés dans une situation de promiscuité reste très difficile à prouver et de ce fait, peu d'études ont été publiées à ce sujet. Yoshikawa et al., (2000) ont cependant montré que les patients et le personnel de deux établissements de santé partageaient les mêmes STs de *Blastocystis* sp. De même, Thathaisong et al., (2013) indiquaient que la quasi-totalité des jeunes filles vivant dans une même résidence en Thaïlande étaient infectées par le parasite et de plus par le même ST. D'autre part, les analyses statistiques réalisées dans le cadre de plusieurs études épidémiologiques ont montré qu'un contact avec des membres d'une même famille présentant des troubles gastro-intestinaux était un facteur de risque associé à l'infection par *Blastocystis* sp. (Anuar et al., 2013 ; Osman et al., 2016).

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

A côté de cette transmission directe, il est logique de penser que la transmission féco-orale indirecte est plus commune à partir de supports comme l'eau ou les aliments contaminés par des kystes de selles humaines ou animales. Aussi, l'impact de cette transmission dans une région est directement lié aux conditions sanitaires rencontrées et aux règles d'hygiène suivies par les populations. Même si l'eau semble être le vecteur majeur de transmission, pratiquement aucune donnée n'est disponible concernant l'identification d'une éventuelle épidémie de blastocystose d'origine hydrique (Baldursson et Karanis, 2011). *Blastocystis* sp. a été placé en 2006 par l'OMS dans la liste des parasites d'origine hydrique mais il n'est pourtant pas recherché dans le cadre d'épisodes épidémiques. D'autre part, la prévalence du parasite dans certaines régions géographiques est telle que toute épidémie d'ampleur limitée est difficilement détectable. Un cas d'épidémie de blastocystose touchant plus d'un millier de personnes a pourtant été suggéré dans une province chinoise (Wu et al., 2000) mais sans confirmation moléculaire de l'agent impliqué. De même, deux cas d'épidémies familiales de gastroentérite au Maroc (Fréalles et al., 2015) et en Italie (Guglielmetti et al., 1989) relatent une contamination probable de l'eau de consommation par ce parasite. Plus récemment, et toujours en Italie, un cas de blastocystose avec diarrhée a été rapporté avec mise en évidence moléculaire d'une transmission du parasite par la consommation d'une eau non potable dans une ferme (Angelici et al., 2018).

En parallèle, de nombreuses études conduites dans plusieurs pays principalement asiatiques et africains ont permis d'identifier *Blastocystis* sp. avec des fréquences variables mais pouvant être importantes dans différentes sources d'eau de consommation que ce soient des rivières, des réservoirs ou directement l'eau du robinet (Khalifa et al., 2001 ; Leelayoova et al., 2008 ; Eroglu et Koltas, 2010 ; Lee et al., 2012 ; Noradilah et al., 2016 ; Richard et al., 2016 ; Karaman et al., 2017 ; Ribas et al., 2017 ; Koloren et al., 2018), dans des eaux utilisées pour l'irrigation (Moreno et al., 2018), dans des eaux usées (Suresh et al., 2005 ; Banaticla et Rivera, 2011) ou dans des eaux récréatives (Ithoi et al., 2011 ; Branco et al., 2012 ; Koloren et al., 2018). Dans certaines de ces enquêtes, les isolats identifiés ont pu être sous-typés (Li et al., 2007a,b ; Leelayoova et al., 2008 ; Eroglu et Koltas, 2010 ; Lee et al., 2012 ; Noradilah et al., 2016 ; Koloren et al., 2018 ; Moreno et al., 2018) et ces STs se sont avérés identiques à ceux trouvés dans la population humaine voire animale qui consomme cette eau ou qui vit à proximité de ces différentes sources hydriques. Cette circulation du parasite est sans doute favorisée par le fait que les traitements classiques des eaux usées ne sont pas efficaces contre les formes kystiques du parasite. Cela a été démontré par Suresh et al., (2005) qui n'observaient qu'une très faible diminution du nombre de kystes avant et après traitement des

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

eaux usées dans des stations d'épuration en Ecosse et en Malaisie ce qui peut avoir comme conséquence de faciliter la dissémination de *Blastocystis* sp. dans l'environnement. Il est d'autre part à noter que les analyses statistiques réalisées dans le cadre de plusieurs études épidémiologiques ont montré que l'eau de consommation non traitée ou non bouillie était un facteur de risque associé à l'infection par *Blastocystis* sp. (Abdulsalam et al., 2012 ; Anuar et al., 2013 ; Osman et al., 2016).

L'autre source éventuelle de transmission indirecte reste bien sûr la consommation de nourriture contaminée. Pourtant aucune donnée n'est venue à ce jour confirmer cette transmission. Par contre, *Blastocystis* sp. a été récemment identifié dans des sachets de salades vendus dans des supermarchés en Italie (Caradonna et al., 2017). D'autre part, plusieurs études menées en Malaisie (Salim et al., 1999), en Iran (Heydari-Hengami et al., 2018), en Haïti (Llanes et al., 2016), en Gambie (Bradbury et al., 2015), en Egypte (Fathy, 2011), au Brésil (Takizawa et al., 2009) ou au Mexique (Cruz Licea et al., 2003) ont toutes montré que la catégorie professionnelle des vendeurs ou manipulateurs de viande est significativement plus infectée par le parasite que la population générale.

Enfin, un dernier mode de transmission possible du parasite qui n'a pratiquement jamais été évalué est la dissémination possible des kystes par le vent. De manière intéressante, *Blastocystis* sp. a été détecté dans un collecteur d'air dans la ville de Séoul en Corée du Sud (Han et al., 2018).

### **9. Impact de *Blastocystis* sp. en santé humaine et animale**

Le rôle de *Blastocystis* sp. en santé humaine reste encore très discuté et a fait l'objet d'une synthèse détaillée dans la littérature récente (Tan, 2008 ; Stensvold et al., 2009 ; Tan et al., 2010 ; Scanlan, 2012 ; Clark et al., 2013 ; Scanlan et Stensvold, 2013 ; Wawrzyniak et al., 2013 ; Ajjampur et al., 2016 ; Andersen et Stensvold, 2016 ; Cian et al., 2016 ; Stensvold et Clark, 2016 ; Lepczynska et al., 2017). Globalement, la difficulté à cerner son réel impact est liée à son portage important dans la population humaine asymptomatique. De plus, certains individus peuvent être porteurs asymptomatiques du parasite pendant plusieurs années (Scanlan et al., 2014). D'autre part, les symptômes associés à la blastocystose ne sont pas spécifiques à cette infection parasitaire puisque ce sont essentiellement des diarrhées, des douleurs abdominales, des vomissements ou des ballonnements. En outre, dans le cadre d'études épidémiologiques visant à établir une potentielle association entre la présence du parasite et celle de troubles gastro-intestinaux, la recherche d'autres pathogènes entériques

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

bactériens et viraux pouvant être à l'origine des mêmes symptômes n'est généralement pas réalisée rendant toute relation de cause à effet difficilement démontrable. Cependant, plusieurs cas cliniques ont clairement montré que *Blastocystis* sp. était le seul parasite présent chez certains patients symptomatiques et que l'élimination de celui-ci suite à un traitement antiparasitaire entraînait aussi la disparition des troubles digestifs (Janarthanan et al., 2011 ; Tai et al., 2011 ; Fréalle et al., 2015 ; Gil et al., 2016).

Chez les animaux et en balayant toute la littérature sur le sujet, seuls deux cas cliniques de blastocystose avec diarrhée ont, à notre connaissance, été publiés. Il s'agit d'un cas chez un porc-épic au Brésil (Goe et al., 2016) et d'un cas chez un chien aux USA (Chapman et al., 2009). Dans les deux cas, seul *Blastocystis* sp. a été identifié dans les selles et un traitement anti-parasitaire adapté a conduit au rétablissement de l'animal.

En parallèle, et même si cela n'est pas confirmé dans toutes les enquêtes réalisées, *Blastocystis* sp. pourrait être, chez l'Homme, impliqué dans le syndrome de l'intestin irritable qui est une colopathie chronique fonctionnelle très courante en particulier dans les pays industrialisés (Poirier et al., 2012). La présence du parasite pourrait aussi être associée à de l'urticaire comme rapporté dans plusieurs études même si les mécanismes physiopathologiques impliqués restent encore méconnus (Vogelberg et al., 2010 ; Lepczynska et al., 2015). Différentes enquêtes épidémiologiques ont aussi mis en évidence le caractère opportuniste du parasite chez des patients immunodéprimés puisque des taux d'infection plus élevés que dans les populations contrôles ont été relevés chez des patients atteints du VIH dans différents pays (Kurniawan et al., 2009 ; Alemu et al., 2011 ; Rivero-Rodriguez et al., 2013 ; Sanchez-Aguillon et al., 2013 ; Paboriboune et al., 2014). C'est aussi le cas chez des patients atteints de cancer, transplantés ou bien encore dialysés (Batista et al., 2011 ; Karadag et al., 2013 ; Kumarasamy et al., 2014). D'ailleurs, *Blastocystis* sp. a été identifié chez des patients après chimiothérapie alors qu'ils n'étaient pas infectés par le parasite avant leur traitement (Chandramathi et al., 2012).

### **10. Physiopathologie de *Blastocystis* sp. et traitement de la blastocystose**

Pour clarifier la pathogénicité de *Blastocystis* sp., plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont été conduites en complément des approches d'analyse *in silico* des données génomiques obtenues pour différents STs et permettant d'identifier des facteurs de virulence potentiels (Denoeud et al., 2011 ; Wawrzyniak et al., 2015 ; Beghini et al., 2017 ; Eme et al., 2017 ; Gentekaki et al., 2017). Pour ce qui est des études *in vivo*, plusieurs modèles animaux ont été

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

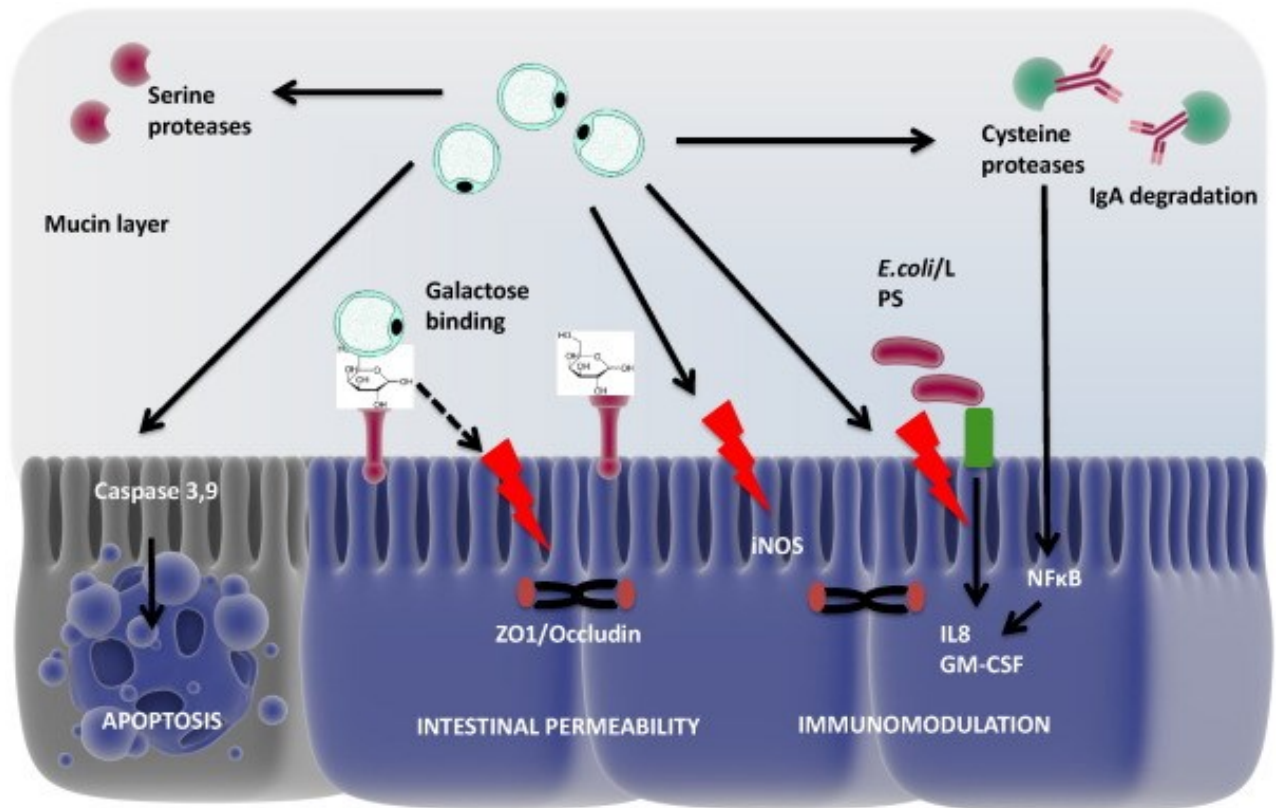
---

utilisés comme les rats, les souris ou les poulets via différentes voies d'inoculation du parasite comme résumé par Ajjampur et Tan (2016). Cependant, à ce jour, aucun modèle animal reproductible de blastocystose n'est disponible. De plus, les résultats déjà obtenus avec ces modèles restent équivoques du fait de la nature des inoculats utilisés. En effet, les animaux sont souvent infectés par des kystes isolés et purifiés de selles humaines ou éventuellement animales (Li et al., 2013 ; Chandramathi et al., 2014). Or, aucun contrôle microbiologique et viral n'est généralement réalisé sur l'inoculat et de ce fait, les symptômes éventuellement observés chez l'animal infecté expérimentalement peuvent ne pas être liés à l'infection par *Blastocystis* sp. De plus, même si dans certaines de ces études, un sous-typage du parasite a été réalisé, celui-ci ne permet pas de s'assurer de l'absence d'une co-infection par plusieurs STs minoritaires additionnels. Aujourd'hui, des cultures axéniques et clonales de certains isolats de STs connus sont disponibles pour ce type d'approche. La difficulté réside en l'impossibilité actuelle de passer *in vitro* de la forme vacuolaire en culture à la forme kystique utilisable en routine pour l'inoculation. D'autre part, aucun anticorps reconnaissant le parasite n'est disponible pour identifier *in situ* le parasite lors de l'infection chez l'animal.

Au regard de ces limitations, des études *in vitro* ont été menées sur différents types cellulaires et en particulier la lignée Caco-2 de carcinome de colon humain tout en utilisant, à des fins comparatives, des isolats de *Blastocystis* sp. appartenant à différents STs mais aussi des lysats parasitaires voire même des surnageants de culture de parasites. Des résultats significatifs ont été obtenus en particulier par le groupe de K. Tan à Singapour (Puthia et al., 2005 ; Puthia et al., 2006 ; Puthia et al., 2008 ; Mirza et Tan, 2009 ; Wu et al., 2010 ; Mirza et al., 2011a,b ; Wu et al., 2014a,b) et résumés dans une revue récente du même laboratoire (Ajjampur et Tan, 2016) (**Figure 13**).

Brièvement et en simplifiant, il a été montré que le parasite agissait à différents niveaux dans son environnement intestinal. Tout d'abord, il est capable de dégrader la couche de mucine à la surface de l'épithélium puis de se fixer à des résidus galactose. Cette adhésion se fait principalement au niveau des jonctions serrées de l'épithélium. En parallèle, le parasite sécrète principalement des protéases à cystéine identifiées comme étant des facteurs de virulence. En effet, ces protéases sont capables d'induire un réarrangement des protéines composant ces jonctions serrées (protéine ZO1, occludine...) et une réorganisation du cytosquelette d'actine de la cellule hôte entraînant ainsi une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale. Cet effet délétère semble ST dépendant *in vitro* puisque le ST7 est capable d'adhérer à l'épithélium et de dégrader les jonctions serrées ce qui n'est pas le cas du ST4. Les protéases sécrétées sont aussi capables de provoquer l'apoptose des cellules

épithéliales intestinales en activant la voie des caspases de la cellule hôte. De plus, le parasite peut se protéger du système immunitaire de l'hôte à travers ses propriétés immunomodulatrices.



**Figure 13:** Modèle résumant les différents mécanismes impliqués dans le pouvoir pathogène de *Blastocystis sp.* (Ajjampur et Tan, 2016).

Par exemple, *Blastocystis sp.* est capable, toujours à travers la sécrétion de protéases, de dégrader les immunoglobulines A prédominantes à la surface de l'épithélium intestinal et d'induire la production d'interleukines (IL) pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8 et IL-12) par la cellule hôte. De plus, il a été montré que le parasite était résistant au stress nitrosatif induit par les cellules effectrices du système immunitaire de l'hôte. Ces mécanismes conjugués permettraient la survie du parasite, en particulier, lors des premières heures de l'infection puis sa dissémination tout en entraînant un afflux de cellules inflammatoires contribuant à la symptomatologie de cette parasitose.

Comme indiqué ci-dessus, une corrélation entre ST et pouvoir pathogène du parasite a été mise en évidence *in vitro*. Cette corrélation n'a pas été confirmée par les multiples études épidémiologiques ayant cherché à mettre en évidence cette association (Tan, 200 ; Tan et al., 2013 ; Clark et al., 2013, Wawrzyniak et al., 2013). En effet, les résultats de ces études sont



## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

terriblement contradictoires et ce pour de multiples raisons qui ne seront pas développées dans ce mémoire mais qui tiennent surtout à la méthode d'identification du parasite dans les cohortes analysées, l'absence de données sur d'autres entéropathogènes possibles pouvant causer les symptômes et sur la difficulté à caractériser les infections mixtes par plusieurs STs de *Blastocystis* sp..

Récemment, plusieurs autres études se sont intéressées à l'impact éventuel de la colonisation du parasite sur le microbiote bactérien intestinal de l'hôte (Audebert et al., 2016 ; Chabé et al., 2017 ; Nieves-Ramirez et al., 2018 ; Stensvold et van der Giezen, 2018). Les données obtenues montrent que *Blastocystis* sp. est plus fréquemment retrouvé chez les individus présentant les entérotypes 2 et 3 dominés respectivement par *Ruminococcus* et *Prevotella* d'après la nomenclature d'Arumugam et al., (2011) plutôt que chez ceux présentant l'entérotipe 1 dominé par *Bacteroides*. De plus, cette colonisation est associée à une augmentation de la diversité microbienne du microbiote intestinal de l'hôte. Ces données suggèrent alors que l'infection par *Blastocystis* sp. serait associée à un microbiome sain plutôt qu'à une dysbiose comme c'est le cas par exemple pour un autre protozoaire intestinal comme *Giardia*. Cependant, sans rentrer dans les détails, ces observations ne remettent pas en question l'éventuel pouvoir pathogène de *Blastocystis* sp. tout en posant une question cruciale qui est de savoir si une diversité microbienne accrue facilite la colonisation par le parasite ou si le parasite induit cet accroissement de diversité.

Enfin, puisque la pathogénicité de *Blastocystis* sp. reste controversée, il est naturel de s'interroger sur la nécessité de traiter des patients atteints par cette parasitose. En fait, il est conseillé de traiter un patient si celui-ci présente une diarrhée persistante en l'absence de tout autre agent pathogène en dehors de *Blastocystis* sp. (Coyle et al., 2012 ; Roberts et al., 2014). Si c'est le cas, la drogue utilisée en première intention est le métronidazole même si plusieurs cas d'échecs thérapeutiques ont été décrits dans la littérature (Rajamanikam et al., 2018). En cas d'échec peuvent alors être utilisés l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole ou un autre imidazolé comme le secnidazole.

## **II. Aspects généraux de *Campylobacter***

### **1. Contexte historique et taxonomie du genre *Campylobacter***

La première description des bactéries du genre *Campylobacter* date de 1886 par le bactériologiste autrichien Theodore Escherich, qui les a isolées dans le côlon d'un enfant, mort du "*cholera infantum*". À cette époque, *Campylobacter* était mal identifié et considéré

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

comme un *Vibrio* (Escherich, 1886). Le début du XXème siècle a été marqué par l'observation des bactéries microaérophiles de type "*Vibrio-like*" pour la première fois par McFadyean et Stockman (1913), qui ont rapporté l'association de ces organismes avec l'infertilité infectieuse et l'avortement chez les bovins et les moutons. Cette association a été confirmée quelques années plus tard lorsqu'un autre groupe de recherche (Smith et Taylor, 1919) a rapporté des résultats similaires à partir de tissus de bovins ayant avorté et a proposé *Vibrio fetus* comme nom de la bactérie. En 1931, Jones et al., ont identifié un autre groupe de vibrions microaérophiles qui étaient la cause d'épidémies de dysenterie chez les veaux et qu'ils ont appelé *Vibrio jejuni*. En 1944, Doyle a attribué la dysenterie porcine à des organismes similaires qu'il a nommé plus tard *Vibrio coli* (Doyle, 1948).

La première association des vibrions microaérophiles à la maladie diarrhéique chez l'Homme a été décrite par Levy (1946), qui a signalé une épidémie de gastroentérite aiguë chez 151 personnes présentant des vomissements et des crampes abdominales. L'épidémie était associée à des organismes transmis par le lait qui ressemblaient à *V. jejuni*. Cet incident est considéré comme la première épidémie de *Campylobacter* spp. d'origine alimentaire. De même, *V. fetus* a été décrit chez des femmes ayant avorté (Vinzent et al., 1947). C'est en 1963 que le genre *Campylobacter* a été proposé par Sebald et Veron et différencié du genre *Vibrio* sur la base de la croissance microaérobie et du coefficient de Chargaff représenté par un plus faible pourcentage en guanine et cytosine dans leur séquence nucléotidique. *Campylobacter* est dérivé du mot grec "Kampylos" qui signifie courbé et appartient actuellement à la famille des *Campylobacteraceae* qui comprend quatre genres étroitement apparentés (*Campylobacter*, *Arcobacter*, *Dehalospirillum* et *Sulfurospirillum*), famille appartenant elle-même à la classe des epsilon proteobacteria du phylum des protéobactéries (Vandamme et al., 1991). À l'heure actuelle, le genre *Campylobacter* englobe 39 espèces et 16 sous-espèces. (<http://www.bacterio.net/campylobacter.html>; dernière consultation le 16 août 2018). Au sein de ce genre, trois espèces (*C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*) sont connues comme étant thermo-tolérantes et ayant une importance clinique car elles sont les principaux agents responsables de la campylobactériose humaine. *C. jejuni* est responsable de la majorité des entérites à *Campylobacter* d'origine alimentaire suivie de *C. coli* et, dans une moindre mesure, de *C. lari* (Pearson et al., 1996 ; Hazeleger et al., 1998).

## **2. Caractéristiques microbiologiques principales de *Campylobacter***

Les bactéries du genre *Campylobacter* sont des bactéries à Gram négatif avec une forme en spirale ou en "S" dont la taille varie de 0,2 à 0,8 µm de largeur et de 0,5 à 5,0 µm de longueur (Vandamme et al., 1991) et étant non sporogènes. Cependant, dans des conditions défavorables, elles peuvent donner des formes coccoïdes (dégénératives) qui sont des cellules viables, mais non cultivables surtout trouvées dans les cultures plus âgées ou exposées à l'oxygène (Rollins et Colwell, 1986 ; Silva et al., 2011). La plupart des espèces de *Campylobacter* sont mobiles avec des flagelles polaires à l'une ou à leurs deux extrémités d'où le mouvement typique du tire-bouchon, une caractéristique par laquelle leur présence parmi d'autres bactéries peut être détectée par microscopie à contraste de phase (Snelling et al., 2005 ; Vandamme et al., 2010). La plupart sont aussi positives à l'oxydase (à l'exception de *C. gracilis*). Ces bactéries sont non fermentantes et ne peuvent pas cataboliser le glucose en raison de l'absence des gènes de la 6-phosphofructokinase (Parkhill et al., 2000). Sur la base de nos connaissances actuelles, ces bactéries sont uniques parmi les agents pathogènes associés aux maladies d'origine alimentaire en étant microaérophiles (Jeon et al., 2010) et capnophiles (nécessitant une atmosphère enrichie en dioxyde de carbone) (Humphrey et al., 2007).

## **3. Isolement et identification de *Campylobacter***

L'importance de *Campylobacter* dans les maladies diarrhéiques a pu être clarifiée à travers le développement de méthodes de culture et d'identification adéquates. Des conditions spéciales sont en effet requises pour la culture de ces bactéries qui sont microaérophiles et qui se développent de manière optimale dans une atmosphère faible en oxygène (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> et 85% N<sub>2</sub>) (Garénaux et al., 2008 ; Gharst et al., 2013). La méthode couramment utilisée pour la détection de *Campylobacter* spp. dans les échantillons alimentaires est la méthode ISO 10272-1-2017 (ISO, 2017). Un enrichissement préalable est réalisé afin d'isoler *Campylobacter* à partir des échantillons dans lesquels les bactéries peuvent être endommagées ou présentes en petit nombre (Williams et al., 2012). L'enrichissement en bouillon sélectif a été étendu de 24 à 48 h pour permettre une meilleure détection de *Campylobacter* spp. dans les produits légèrement contaminés par cet agent pathogène. Normalement, les bouillons Bolton et Preston, approuvés par l'ISO, sont favorisés car ils se sont avérés efficaces pour isoler *Campylobacter* d'échantillons de volaille (Williams et al., 2009). En raison de la sensibilité à l'oxygène et aux radicaux oxydants de *Campylobacter*, de nombreux milieux

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

sélectifs ont été développés contenant des absorbeurs d'oxygène tels que le sang, le fer ferreux et le pyruvate (Silva et al., 2011). Le milieu sélectif le plus couramment utilisé pour l'isolement direct de *Campylobacter* est la gélose modifiée à base de céfopérazone, de charbon et de désoxycholate de sodium (mCCDA). L'application d'agents sélectifs, principalement des antibiotiques dans les milieux, est recommandée pour inhiber la croissance d'autres bactéries et champignons fécaux. Selon le type de milieu, les colonies de *Campylobacter* peuvent avoir une apparence différente. Habituellement, elles sont de forme ronde, plate et de couleur gris-blanc sur la gélose mCCDA. La température a une influence significative sur la survie de *Campylobacter* dans l'environnement et dans les aliments et la croissance des espèces de la bactérie se fait entre 37 et 42°C. Étant thermo-tolérantes, leur température optimale de croissance est de 41,5°C et ce probablement en raison de leur association avec des espèces aviaires (Alter et Scherer, 2006). Cette croissance peut être limitée par la concentration de chlorure de sodium dans le milieu et par congélation à -15°C. Ces bactéries ne peuvent pas être éliminées par congélation et elles sont extrêmement sensibles à la chaleur et à la dessiccation. De plus, elles sont incapables de survivre à un pH inférieur à 4,9 ou supérieur à 9 (Silva et al., 2011).

Afin d'identifier et séparer les différentes espèces du genre *Campylobacter*, le diagnostic de routine repose sur la culture, la coloration de Gram, des tests biochimiques (oxydase, catalase, nitrate) (Miljkovic-Selimovic et al., 2014), la désorption-ionisation laser assistée par matrices (Muhamadali et al., 2016) sérologiques (agglutination au latex) ou immunologiques et la biologie moléculaire (hybridation *in situ* et PCR) (Begum et al., 2015). Les tests biochimiques utilisés dans des méthodes validées pour l'identification de *Campylobacter* sont résumés dans le **Tableau 1** ci-dessous.

	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Culture à 42°C	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	- ou faible
<i>Hydrolyse de l'hippurate</i>	+	-	-	-
<i>Acide nalidixique (disque à 32 µg)</i>	S	R	R	S
Céphalotine (disque à 32 µg)	R	R	R	S

S= sensible ; R= résistant ; en italique : les deux critères différentiels

**Tableau 1:** Tests biochimiques utilisés pour l'identification des 4 espèces de *Campylobacter* thermotolérantes (Belloc et al., 2004).

#### 4. **Mécanismes et facteurs de virulence de *Campylobacter***

L'existence de mécanismes et de gènes associés à la virulence de *Campylobacter* a été montrée dans plusieurs études (Feodoroff et al., 2010 ; Silva et al., 2011 ; Ellström et al., 2013). Parmi ces facteurs, les principaux sont les suivants :

##### a. **Motilité**

Pour coloniser l'intestin grêle humain et provoquer la maladie, *Campylobacter* doit être mobile (Black et al., 1988). La motilité de *Campylobacter*, générée par la combinaison de l'un ou des deux flagelles polaires et qui fournit un mouvement en tire-bouchon des bactéries, facilite le mouvement à travers des substances visqueuses telle que la couche de mucus à la surface de l'intestin (Ferrero et Lee, 1988 ; Szymanski et al., 1995 ; Guerry, 2007).

##### b. **Chimiotaxie**

Pour que *Campylobacter* puisse avancer dans la direction voulue, les bactéries utilisent la chimiotaxie. Il a été montré que *C. jejuni* présentait une motilité chimiotactique vis-à-vis des acides aminés et d'autres composants du tube digestif du poulet et de la couche de mucus (Hugdahl et al., 1988 ; Chang et Miller, 2006 ; Krause-Gruszczynska et al., 2007 ; Kanungpean et al., 2011).

##### c. **Adhésion**

Lorsque les bactéries ont atteint leur site de colonisation, elles adhèrent aux cellules épithéliales. L'adhésion aux cellules eucaryotes se fait spécifiquement au niveau de la fibronectine composante de la membrane cellulaire (Monteville, 2003).

##### d. **Invasion**

Pour l'invasion des cellules cibles par *Campylobacter*, un certain nombre de facteurs ont été identifiés comme, par exemple, l'antigène d'invasion Cia (Bolton, 2015). Les protéines Cia se sont avérées être sécrétées par la cellule hôte et semblent être cruciales pour la colonisation et l'invasion de *Campylobacter*. Cette sécrétion est médiée par les flagelles qui servent de système de sécrétion de type 3 (T3SS) chez *Campylobacter* lors de l'invasion de l'hôte en raison d'une conformité de ces protéines avec ce système (Konkel et al., 2004 ; Biswas et al., 2007).

### e. Production de toxines

*Campylobacter* produit plusieurs cytotoxines différentes (Schulze et al., 1998) mais seule la toxine « cytolethal distending toxin » (CDT) a été étudiée en détails. Cette toxine qui a aussi été retrouvée chez plusieurs autres bactéries Gram négatif agit sur le cytosquelette de la cellule hôte induisant la mort de celle-ci par blocage de la division cellulaire (Yamasaki et al., 2006 ; Ge et al., 2008 ; Faïs et al., 2016). La CDT est composée de deux protéines de liaison (CdtA et CdtC) responsables de la liaison de la toxine aux cellules cibles et délivre la troisième protéine enzymatiquement active, la CdtB. La CDT bloque les cellules dans la phase G2 et empêche les cellules d'entrer dans la mitose (Pickett et Whitehouse, 1999 ; Bolton, 2015).

### f. Capsule

Les cellules de *C. jejuni* sont entourées d'une capsule constituée de polysaccharides qui est impliquée dans la survie et la colonisation de la bactérie (Roberts, 1996).

### g. Fer

La régulation et le transport du fer se sont avérés importants dans le processus de colonisation du poulet par la bactérie. Il a ainsi été démontré que les mutants de *C. jejuni* dépourvus de gènes d'absorption du fer étaient moins aptes à coloniser ces animaux (Palyada et al., 2004 ; Xu et al., 2010).

### h. Lipooligosaccharide

Le lipooligosaccharide (LOS) de *Campylobacter* est un glycolipide majeur à la surface cellulaire de la bactérie qui présente une grande diversité structurale (Nachamkin et al., 2008) et ne possède pas la chaîne O-polysaccharide rendant les bactéries hydrophobes et sensibles à la solubilisation par la bile (Preston et al., 1996). Le LOS est impliqué dans la capacité de *Campylobacter* à échapper au système immunitaire de l'hôte et à coloniser les cellules hôtes. Il a été suggéré que *Campylobacter* avec un LOS sialylé avait un potentiel d'invasivité plus élevé (Louwen et al., 2008) bien que des résultats contradictoires aient été rapportés à ce sujet (Ellström et al., 2014).

### i. Résistance aux antibiotiques

Les antibiotiques tels que les macrolides et les fluoroquinolones sont couramment utilisés pour traiter les infections à *Campylobacter* chez l'Homme (Sifré et al., 2015).

Toutefois, des cas de résistance à ces drogues ont été rapportés (Cha et al., 2016 ; Olkkola et al., 2016) et plusieurs gènes de résistance ont été identifiés dans le génome de la bactérie (Payot et al., 2006 ; Iovine, 2013 ; Zhou et al., 2016 ; Zhao et al., 2016 ; Olkkola et al., 2016).

### **j. Réponse au stress**

*Campylobacter* est capable d'activer un système interne de réponse au stress. De nombreux gènes ont ainsi été identifiés qui confèrent une résistance à l'aérotolérance et au stress oxydatif (Baillon et al., 1999) en augmentant l'activité du système de défense antioxydant composé d'un large éventail d'enzymes comme notamment la catalase, la cytochrome peroxydase et la superoxyde dismutase en plus du glutathion qui est une protéine antioxydante (Storz et Imlay, 1999 ; Bolton, 2015), entraînant ainsi une adaptation de la bactérie à l'aérobiose (Klančnik et al., 2009).

En outre, *Campylobacter* peut être exposé à des conditions de pH réduites et de famine. Dans ces conditions, ces bactéries entrent dans un état viable mais non cultivable afin de survivre dans ces conditions défavorables pendant de longues périodes (Mihaljevic et al., 2007 ; Bolton, 2015).

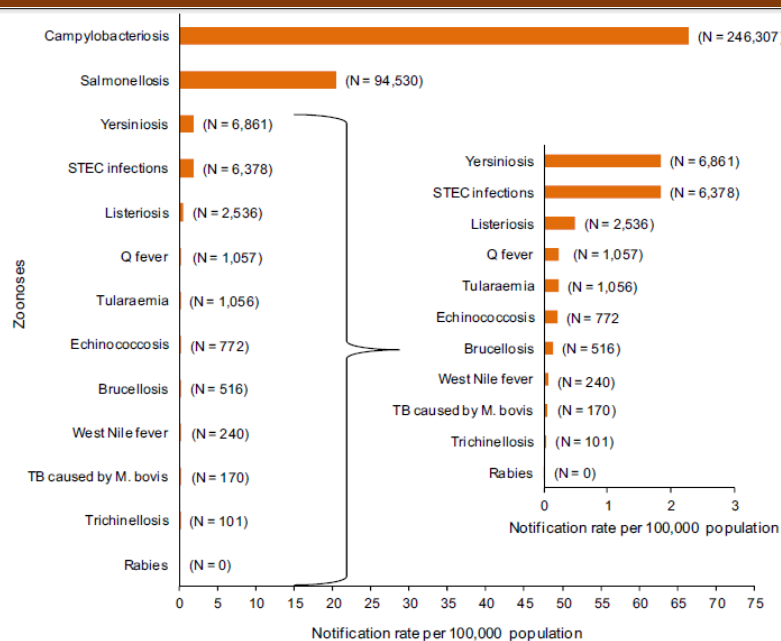
## **5. Campylobactériose**

*Campylobacter* est l'agent pathogène principal causant une gastroentérite bactérienne humaine (Scallan et al., 2011 ; EFSA et ECDC, 2017) puisqu'on estime à environ 96 millions le nombre d'infections annuelles à travers le monde (Kirk et al., 2015).

En Europe, les résultats du rapport de synthèse européen sur les tendances et sources des zoonoses, agents zoonotiques et épidémies d'origine alimentaire de 2016 ont révélé que depuis 2005, *Campylobacter* était le pathogène bactérien gastrointestinal le plus fréquemment signalé chez l'Homme (**Figure 14**) (EFSA et ECDC, 2017). L'incidence réelle de la campylobactériose humaine est estimée à environ neuf millions de cas par an en Europe (EFSA, 2011 ; EFSA et ECDC, 2015).

Aux États-Unis, 1,3 million de cas de campylobactériose surviendraient chaque année, principalement en raison de la consommation de produits à base de volailles contaminées (CDC, 2018).

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE



**Figure 14:** Nombre déclaré et taux de notification des zoonoses humaines confirmées dans l'Union Européenne en 2016 (EFSA et ECDC, 2017).

Cette infection a des répercussions économiques majeures sur le coût des soins de santé. En effet, il existe des coûts directs tels que les consultations médicales, les diagnostics de laboratoire, le traitement médical ou l'hospitalisation et des coûts indirects tels que la perte de productivité au travail due à la maladie et des frais juridiques (Roberts et al., 2003). Dans l'Union Européenne, le coût de la campylobactériose pour les systèmes de santé publique est estimé à environ 2,4 milliards d'euros par an (EFSA, 2011).

Comme indiqué ci-dessus, les espèces de *Campylobacter* les plus fréquemment associées aux maladies humaines ont été identifiées comme étant *C. jejuni* et *C. coli* (Nachamkin, 2007 ; Lin, 2009 ; Hermans et al., 2012). En fait, il a été observé que *C. jejuni* représentait plus de 80% des cas de campylobactériose humaine dans l'Union Européenne en 2014 suivi de *C. coli*, *C. lari* et *C. upsaliensis* qui correspondent respectivement à 7,13%, 0,13% et 0,07% des isolats. La plupart des infections à *Campylobacter* semblent être sporadiques plutôt qu'associées à une épidémie et, dans la majorité des cas, la source initiale de l'infection ne peut être déterminée (EFSA et ECDC, 2015). Au Liban, la prévalence de l'infection par *Campylobacter* chez l'Homme n'est pas à ce jour estimée, faute de l'absence de recherche systématique de cette bactérie lors de la réalisation des coprocultures dans les laboratoires. Cependant, quelques études ont été menées et Talhouk et al., (1998) ont signalé quelques rares contaminations chez des individus hospitalisés alors que Dabboussi et al., (2012) ont rapporté 11% de cas de campylobactériose chez des enfants diarrhéiques.



### **6. Aspects cliniques de la campylobactériose**

Chez l'Homme, l'infection peut être associée à une entérite aiguë et à une douleur abdominale pouvant durer jusqu'à sept jours ou plus. La dose infectieuse est généralement faible puisque comprise entre 500 et 800 bactéries (Conlan et al., 2011). Une diarrhée peut survenir quelques temps après l'apparition des douleurs abdominales et varier de légère, non inflammatoire et aqueuse à sévère et sanglante. La période d'incubation de *Campylobacter* est comprise entre 18 h et 8 jours (Horn et Lake, 2013). L'évolution de la maladie est susceptible d'être influencée à la fois par l'hôte (âge, état de santé, immunité préexistante) et par des facteurs spécifiques aux agents pathogènes, tels que la virulence de la souche infectante (Altekruse et al., 1999). La maladie est auto-résolutive dans la plupart des cas chez les adultes et chez les individus non immunodéprimés. Cependant, des complications peuvent survenir comme une bactériémie, un syndrome du côlon irritable et une arthrite réactive caractérisée par une conjonctivite, une urétrite ou une arthrite (Havelaar et al., 2000 ; Mangen et al., 2005 ; Gradel et al., 2009). Le syndrome de Guillain-Barré (SGB) est la séquelle chronique la plus fréquemment rapportée (Zautner et al., 2014). Cette complication est une neuropathie démyélinisante (Rajabally et al., 2015) qui se caractérise par une paralysie croissante (Zilbauer et al., 2008). Le syndrome de Miller Fisher est un variant non paralytique du SGB et entraîne une incapacité à bouger les yeux chez les enfants (Mori et al., 2012). L'arthrite réactive est également associée avec un taux d'incidence de 9 pour 1000 cas d'infection à *Campylobacter*. L'arthrite réactive survient principalement dans les articulations, en particulier les genoux et les chevilles (Ajene et al., 2013). Dans des cas limités, *C. jejuni* a été associé à une hémorragie intestinale (Chamovitz et al., 1983), à un syndrome hémolytique et urémique (Shulman et Moel, 1983) et à un syndrome inflammatoire intestinal (Gradel et al., 2009). La campylobactériose humaine peut rarement entraîner des incapacités à long terme ou même le décès (Helms et al., 2003) même chez des sujets immunodéprimés, des personnes très jeunes ou très âgées (Helms et al., 2003 ; Gradel et al., 2009). Cependant, les souches de *Campylobacter* résistantes aux antibiotiques les plus couramment utilisés représentent un défi pour le traitement de la campylobactériose humaine (Moore et al., 2006).

### **7. Principales sources de campylobactériose humaine**

Cette bactérie est répandue dans l'environnement et a été détectée dans divers réservoirs animaux, notamment la volaille, les bovins, les porcs et les chiens (Man, 2011). Par conséquent, ces réservoirs peuvent constituer des sources de contamination des aliments ou de

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

l'eau et, par la suite, représenter un facteur de risque de campylobactériose humaine. *Campylobacter* peut être transmis de ces réservoirs à l'Homme par différentes voies, les plus courantes étant la consommation de poulet, en particulier le poulet insuffisamment cuit ou préparé commercialement ou la manipulation de l'animal. La consommation de lait et de produits laitiers non pasteurisés, un contact avec des animaux domestiques comme les chiens, les chats, les animaux de ferme et des séjours à l'étranger sont aussi des facteurs de risque importants (Eberhart-Phillips et al., 1997 ; Studahl et Andersson, 2000 ; Rodrigues et al., 2001 ; Tenkate et Stafford, 2001 ; Potter et al., 2003 ; Stafford et al., 2007).

### **8. Epidémiologie de *Campylobacter* dans la production de poulets de chair**

La viande de poulet de chair est considérée comme une source majeure de la campylobactériose humaine en raison de la cuisson insuffisante et de la contamination croisée, soit directement par les autres aliments, soit dans la cuisine durant la préparation de la viande de volaille (EFSA, 2010). Les données du rapport de synthèse de l'Union Européenne sur les zoonoses, les agents zoonotiques et les épidémies d'origine alimentaire ont révélé que la moitié des épidémies de *Campylobacter* en 2014 étaient liées à la viande de poulet (EFSA et ECDC, 2015). Selon l'EFSA, la manipulation, la préparation et la consommation de viande de poulet à chair représentent 20 à 30% des cas humains (EFSA, 2010). Comme il est bien établi que la viande de volaille est la source la plus importante de *Campylobacter* dans la chaîne alimentaire (Wilson et al., 2008 ; Sheppard et al., 2009 ; Mullner et al., 2009), il est prédit qu'une réduction de *Campylobacter* chez les poulets réduira le nombre de cas dans la population humaine. Par conséquent, la mise en œuvre de mesures de lutte contre *Campylobacter* au niveau de la production primaire permettrait non seulement de réduire la contamination de la viande de poulet de chair tout au long de la chaîne alimentaire, mais cela réduirait l'exposition humaine aux bactéries par des voies autres que la consommation de viande (EFSA, 2010). Ainsi, ce fait devrait avoir un impact plus important sur la réduction des maladies humaines. En outre, une manipulation sûre de la viande crue, une cuisson rigoureuse et une hygiène stricte de la cuisine devraient prévenir ou réduire le risque posé par la viande de poulet contaminée par *Campylobacter*.

#### **a. Colonisation du poulet de chair par *Campylobacter***

*Campylobacter* peut coloniser la muqueuse intestinale de la plupart des animaux à sang chaud (Newell et Fearnley, 2003). Les espèces aviaires sont les hôtes les plus communs

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

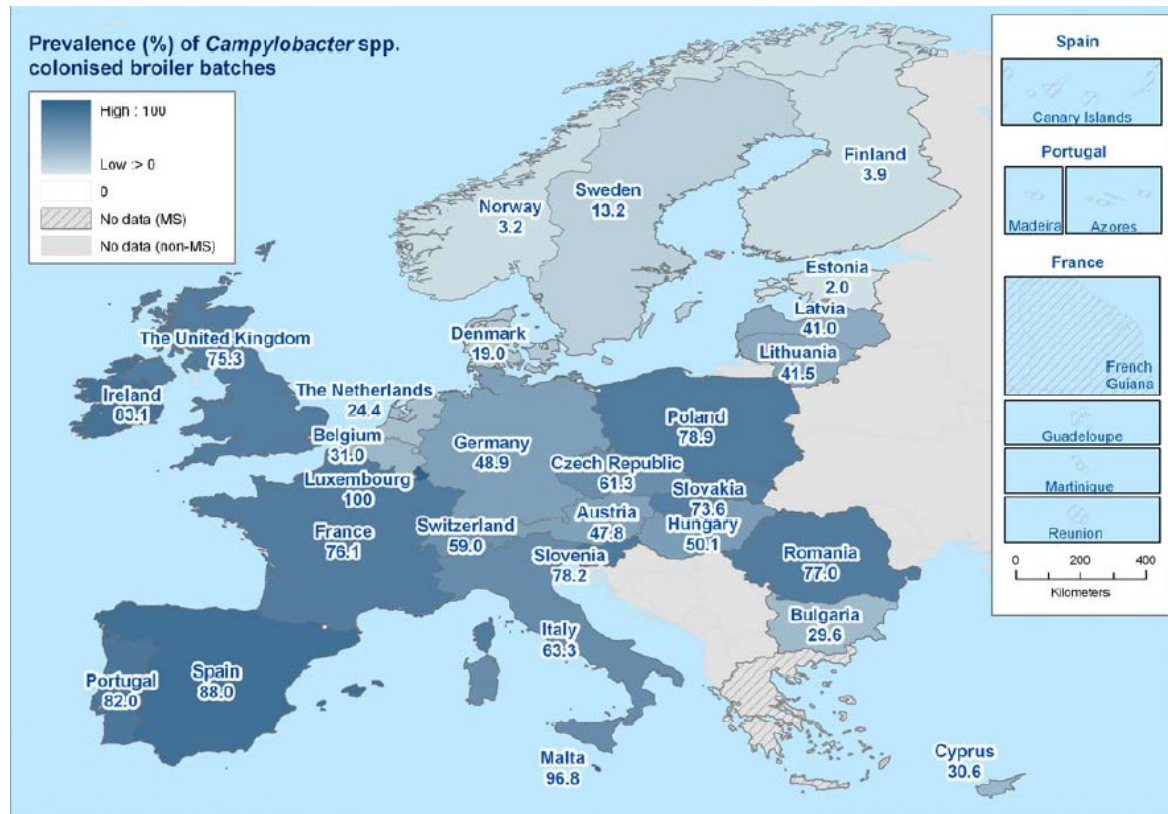
---

pour *Campylobacter* probablement à cause de leur température corporelle plus élevée (Skirrow, 1977). Bien que toutes les espèces de volaille puissent être porteuses de *Campylobacter* (poulets de chair, poules pondeuses, dindes, canards, cailles et autruches) ainsi que les oiseaux sauvages (Waldenström et al., 2002 ; Newell et Fearnley, 2003 ; Dhillon et al., 2006 ; Sahin et al., 2015), le poulet présente plus de risque en raison des grandes quantités consommées (Humphrey et al., 2007). Chez les poulets de chair, *Campylobacter* est un organisme commensal qui établit des infections persistantes et bénignes avec un niveau de colonisation allant jusqu'à  $10^{10}$  unités formant colonies (UFC) par gramme de fèces (Newell et Fearnley, 2003; Dhillon et al., 2006). *Campylobacter* peut être isolé de la plupart des parties intestinales de poulets de chair mais on le trouve principalement dans les cryptes caecales et cloacales, où il n'adhère pas aux cellules épithéliales mais se trouve dans la couche muqueuse (Beery et Hugdahl, 1988 ; Achen et al., 1998). Contrairement à l'infection chez l'Homme, la bactérie n'induit aucune pathologie chez les poulets et colonise l'intestin d'une façon commensale (Dhillon et al., 2006).

### **b. Prévalence de *Campylobacter* dans les lots de poulets de chair**

La prévalence de la bactérie chez les poulets de chair commerciaux varie considérablement en fonction de l'âge des oiseaux (Berndtson et al., 1996a,b ; Evans et Sayers, 2000). En effet, *Campylobacter* est rarement détecté chez les poulets de chair de moins de 2 à 3 semaines dans les conditions de production commerciale. L'infection à *Campylobacter* est généralement détectée après l'âge de trois semaines. Une fois que certains oiseaux sont infectés, *C. jejuni* se propage rapidement à la plupart des oiseaux de l'élevage, qui restent colonisés jusqu'à l'abattage, entraînant par la suite, la contamination des carcasses (Berndtson et al., 1996b ; Gregory et al., 1997 ; Evans et Sayers, 2000).

Les volailles commerciales sont les principaux réservoirs naturels de *C. jejuni* et jusqu'à 100% des poulets de chair à l'âge de l'abattage peuvent héberger la bactérie (Jacobs-Reitsma et al., 1995 ; Jacobs-Reitsma, 1997). Les résultats d'une enquête menée par l'Union Européenne dans les États membres visant à estimer la prévalence de *Campylobacter* dans les lots de poulets de chair ont révélé une prévalence moyenne de 71,2% dans cette zone géographique avec des valeurs allant de 2,0% (Estonie) à 100% (Luxembourg) au sein des pays (**Figure 15**) (EFSA, 2010).



**Figure 15:** Prévalence des lots de poulets de chair colonisés par *Campylobacter* dans l'Union Européenne en 2008 (EFSA, 2010).

En outre, un rapport de 2015 a montré une présence globale de *Campylobacter* dans la viande de poulet fraîche prélevée à l'abattage, à la transformation et à la vente de 38,4% parmi les 6703 unités testées (EFSA et ECDC, 2015). La proportion d'échantillons positifs de *Campylobacter* dans la viande de poulet de chair variait considérablement entre les états membres mais six des onze états évalués ont trouvé plus de 50% d'échantillons positifs. De plus, au niveau de l'abattoir, 44,4% des échantillons étaient positifs pour *Campylobacter*.

Les données d'une étude réalisée dans la région du golfe Arabo-Persique (Bahreïn et Arabie Saoudite) ont évalué la contamination par *Campylobacter* des échantillons provenant d'abattoirs de volailles à 100% avec *C. jejuni* comme principale espèce isolée (Al Amri et al., 2007). Or, 48% des poulets fournis aux supermarchés par les producteurs saoudiens (53%) et qataris (45,9%) se sont révélés contaminés par *Campylobacter* spp. (Abu-Madi et al., 2016). Au Liban, 22,7% des échantillons de caeca et 9,7% des carcasses de poulet étaient positifs pour *Campylobacter* (Talhok et al., 1998). De plus, une étude de 2014 menée dans un élevage de volailles et tout au long de la chaîne d'abattage, a reporté 100% de contamination au niveau des échantillons faecaux et cloacaux, contre 50% dans les échantillons de poitrine de poulet (Hajj Semaan et al., 2014). Plus récemment, 13 des 26 carcasses (50%) et 38 des

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

104 caeca (37%) collectés dans deux abattoirs au Liban à partir de 26 lots de poulets, étaient positifs pour *Campylobacter* avec la totalité des isolats appartenant à l'espèce *C. coli* (Fadlallah et al., 2018). Cependant, aucune de ces dernières études n'a inclus un échantillonnage représentatif de la situation au niveau du pays et ne s'est intéressée à la traçabilité à travers le génotypage des isolats. Elles se sont concentrées sur l'identification des espèces de *Campylobacter* dans un petit nombre d'échantillons provenant de quelques fermes. De plus, l'analyse des selles du personnel en contact avec les poulets n'a jamais été réalisée au Liban. La colonisation des poulets par *Campylobacter* varie selon la saison, avec un plus grand risque de colonisation en été (Gregory et al., 1997 ; Wedderkopp et al., 2000 ; Evans et Sayers, 2000 ; Allain et al., 2014). Bien que *C. jejuni* soit très répandu chez les poulets de chair, certains groupes d'animaux restent exempts de *Campylobacter* tout au long de leur vie (Berndtson et al., 1996a ; Wedderkopp et al., 2000). *Campylobacter* est également très répandu chez les poulets élevés dans des fermes biologiques ou en plein air (Rivoal et al., 1999 ; Heuer et al., 2001), indiquant que différents systèmes de production sont également vulnérables à la colonisation par cet organisme.

### **c. Facteurs de risque et sources de contamination par *Campylobacter* dans les fermes de poulets de chair**

Les facteurs influençant la présence de *Campylobacter* dans les élevages de poulets de chair ont été identifiés dans plusieurs études. Les principaux facteurs associés à un risque accru de colonisation sont le manque de barrières hygiéniques avec les vieilles litières (Newell et al., 2011) et l'eau potable non traitée (Pearson et al., 1993 ; Evans et Sayers, 2000 ; Zimmer et al., 2003) et la présence d'autres animaux domestiques comme les bovins, les porcs et autres volailles à la ferme ou à proximité (Van de Giessen et al., 1996 ; Bouwknecht et al., 2004 ; Zweifel et al., 2008 ; Lyngstad et al., 2008 ; Ellis-Iversen et al., 2009). En outre, d'autres animaux domestiques tels que les chiens et les chats présents dans les fermes sont également considérés comme un facteur de risque d'infection à *Campylobacter* pour les élevages de poulets (Ellis-Iversen et al., 2012 ; Torralbo et al., 2014). D'autre part, les insectes comme les mouches et les coléoptères (Jacobs-Reitsma, 1997 ; Hald et al., 2007 ; Hald et al., 2008 ; Hazeleger et al., 2008 ; Bahrndorff et al., 2013) ou les rongeurs (Gregory et al., 1997 ; McDowell et al., 2008 ; Newell et al., 2011 ; Torralbo et al., 2014) peuvent servir de vecteurs mécaniques pour la transmission de *Campylobacter* aux poulets. La transmission de *Campylobacter* dans un poulailler est aussi possible par contact direct avec un ouvrier agricole lui-même infecté ou indirect à travers ses déplacements de ferme en ferme avec son

véhicule et ses équipements (bottes et vêtements) sans tenir compte de son hygiène personnelle et de la biosécurité (Johnsen et al., 2006 ; Lyngstad et al., 2008 ; Newell et al., 2011). En outre, la présence de plusieurs poulaillers au sein d'une même ferme (Refregier-Petton et al., 2001 ; Bouwknecht et al., 2004 ; Lyngstad et al., 2008) pendant une saison chaude est considérée comme un risque élevé de contamination par *Campylobacter* pour les lots abattus pendant la période estivale (Kapperud et al., 1993 ; Altekruuse et al., 1999 ; Refregier-Petton et al., 2001 ; Bouwknecht et al., 2004 ; Hue et al., 2010 ; Jonsson et al., 2012), indiquant que les déterminants environnementaux et climatiques jouent tous les deux un rôle dans la transmission de la bactérie. Un risque accru d'infection a aussi été associé à un âge d'abattage plus élevé des poulets et au détassage préalable du lot réalisé afin d'en diminuer la densité (EFSA, 2010 ; Hue et al., 2010 ; Hermans et al., 2012 ; Torralbo et al., 2014).

### **9. Caractéristiques génétiques de *Campylobacter***

En 2000, l'achèvement du séquençage du génome de *C. jejuni* NCTC11168 a représenté un progrès significatif dans la recherche sur *Campylobacter*. Une caractéristique surprenante de ce génome était l'absence presque complète de séquences d'ADN répétitives. En fait, seules quatre séquences répétées ont été identifiées dans tout le génome qui sont de plus hypervariables. La taille de ce génome est de 1,6 mégabases avec 1654 séquences codantes prédites. Ces dernières couvrent 94,3% du génome, ce qui en fait le génome bactérien le plus dense séquencé à ce jour (Parkhill et al., 2000). Sept ans plus tard, Gundogdu et al., (2007) ont ré-annoté et ré-analysé le génome de *C. jejuni* NCTC11168 en utilisant des nouveaux outils et des techniques d'annotation non utilisées lors de l'annotation originale. Des mises à jour majeures ont été apportées concernant les gènes impliqués dans la biosynthèse de structures de surface importantes de la bactérie telles que le lipooligosaccharide, la capsule et le flagelle. Le génome d'une autre souche de *C. jejuni*, la souche 81-176, a été séquencé et la présence de deux plasmides a été démontrée. L'un de ces plasmides nommé *pTet* code la résistance à la tétracycline et alors que le second nommé *pVir* est impliqué dans l'invasion. L'absence de ce dernier plasmide dans d'autres souches de *C. jejuni*, notamment la souche génomique NCTC 11168, ont conduit à penser qu'il pourrait y avoir des différences dans les mécanismes impliqués dans la pathogénicité entre les souches de *C. jejuni* (Bacon et al., 2000 ; Bacon et al., 2002). On sait que les bactéries ont développé différents mécanismes pour capter des morceaux d'ADN de l'environnement et les incorporer à leurs génomes. *Campylobacter* est une de ces bactéries compétentes, avec des fréquences de transformation

d'ADN homologue approximative de  $10^{-4}$  chez *C. jejuni* et  $10^{-3}$  chez *C. coli* (Wang et Taylor, 1990). La recombinaison intra-spécifique ainsi que la grande diversité des profils alléliques s'est avérée fréquente chez *C. jejuni* (Suerbaum et al., 2001). Cette recombinaison est une force évolutive chez *Campylobacter*, conduisant à l'émergence de nouvelles lignées et même à une introgression à l'échelle du génome entre les deux espèces *C. jejuni* et *C. coli* (Sheppard et Maiden, 2015).

### **10. Épidémiologie moléculaire et méthodes de génotypage de *Campylobacter***

Pour comprendre l'importance relative des différents hôtes et des voies de transmission de *C. jejuni* à l'Homme, l'épidémiologie moléculaire et l'utilisation de méthodes de génotypage appropriées sont essentielles. Les méthodes de génotypage de *C. jejuni* les plus couramment utilisées reposent généralement sur la comparaison des profils de fragments d'ADN ou du contenu de la séquence d'ADN entre différents isolats, facilitant la discrimination des isolats étroitement liés et la détection des épidémies (Llarena et al., 2017).

#### **a. Électrophorèse en champ pulsé**

L'électrophorèse en champ pulsé ou PFGE a été considérée comme un "Gold Standard" pour soutenir la caractérisation des isolats dans les études épidémiologiques des organismes pathogènes, dont *C. jejuni* (Yan et al., 1991; On et al., 1998). Cette méthode validée dans les années 1990 est hautement discriminatoire et utilise des enzymes de restriction qui digèrent spécifiquement l'ADN génomique en fragments, qui sont ensuite soumis à une électrophorèse sur gel et séparés en fonction de leur taille. Les profils de PFGE variables permettent la séparation des différentes souches de *C. jejuni* (Tenover et al., 1995). La PFGE a été largement appliquée dans les études d'épidémiologie moléculaire de *C. jejuni* pour comparer les génotypes d'isolats provenant de différentes sources et pour identifier des isolats similaires (Revez et al., 2014a,b ; Hanninen et al., 2003 ; Karenlampi et al., 2003 ; Llarena et al., 2015). Le pouvoir discriminant de PFGE dépend de l'enzyme de restriction utilisée. Ainsi, en comparant les profils PFGE d'isolats détectés de différentes sources suspectes et de patients, il a été possible d'identifier la source d'infection dans des épidémies de *C. jejuni* (Revez et al., 2014a,b ; Hanninen et al., 2003 ; Pitkänen et al., 2008).

### **b. Multilocus sequence typing**

Dès le début des années 2000, la plupart des études réalisées sur les génotypes de *C. jejuni* provenant de diverses sources et des cas humains dans différents pays étaient basées sur la Multilocus Sequence Typing ou MLST (Dingle et al., 2001). La MLST a été fréquemment utilisée en épidémiologie moléculaire et dans les études de génétique des populations de *C. jejuni* (Colles et Maiden, 2012 ; Taboada et al., 2013). Dans la MLST, les allèles de sept gènes de ménage (*aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt* et *unc*) sont séquencés. Les séquences alléliques obtenues sont numérotées et attribuées aux types de séquences (ST) et aux complexes clonaux (CC). Les types de séquence sont assignés aux lignées communes, les CC, s'ils partagent des allèles identiques pour au moins quatre des loci avec le fondateur ST (Dingle et al., 2001). Le principal avantage de la MLST, par rapport à la PFGE, est une nomenclature commune des types MLST et une base de données en ligne organisée qui permet de comparer les résultats entre les différents pays et les études antérieures. Ainsi, un total de 9317 profils MLST, comprenant à la fois *C. jejuni* et *C. coli*, sont répertoriés en Août 2018 dans la base de données pubMLST ([pubMLST.org/campylobacter](http://pubMLST.org/campylobacter)), mettant en évidence la forte diversité génétique de *C. jejuni* et de *C. coli*. Les deux complexes clonaux les plus courants, ST-21 CC et ST-45 CC, ont été détectés dans de nombreuses sources en différentes parties du monde (Dingle et al., 2001 ; Sails et al., 2003 ; Karenlampi et al., 2007 ; Levesque et al., 2008 ; Mullner et al., 2010 ; Gripp et al., 2011 ; Thépault et al., 2018a). Ces lignées généralistes largement répandues se sont adaptées à de nombreux hôtes animaux et à l'Homme.

### **c. Comparative Genomic Fingerprinting**

Une nouvelle méthode de typage des isolats de *C. jejuni* appelée Comparative Genomic Fingerprinting (CGF) a été récemment développée au Canada. Cette méthode moléculaire détecte la présence / absence de 40 gènes spécifiques qui ciblent la variabilité génétique dans le contenu du génome (CGF40). Cette méthode s'est avérée hautement concordante avec la MLST tout en ayant un pouvoir discriminatoire beaucoup plus grand (Taboada et al., 2012). De plus, étant donné qu'il s'agit d'une méthode à faible coût et à haute résolution, la CGF peut être déployée dans un contexte de surveillance (Taboada et al., 2013). Par conséquent, cette méthode pourrait constituer une alternative intéressante à la méthode MLST, en particulier dans le cadre de la détection plus fine de la variabilité génétique entre isolats étroitement apparentés.



## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

La présence ou l'absence de ces 40 gènes est déterminée par 8 PCR multiplex. Ces résultats sont exprimés sous forme binaire traduisant la présence (1) ou l'absence (0) de ces gènes. A l'aide du logiciel BioNumerics, un script permet ensuite d'attribuer un numéro de profil aux souches présentant le même profil génétique. Puis, un dendrogramme est construit en utilisant le coefficient de distance Simple Matching et la méthode UPGMA (Unweighted-Pair Group Method using Average linkages). Le seuil d'identité utilisé pour créer les groupes est indiqué après le nom de la technique. Par exemple, CGF40-100 correspond à l'utilisation d'un seuil de 100% d'identité pour créer les groupes. Une fois les profils créés, les séries de données peuvent être comparées en utilisant l'indice de diversité de Simpson. Cet indice permet de déterminer le pouvoir discriminant d'une technique. Il exprime ainsi la probabilité pour que deux isolats sélectionnés au hasard parmi une population appartiennent à deux types différents. Plus sa valeur est proche de 1, plus la technique a un pouvoir discriminant important (Hunter et Gaston, 1988). De plus, cet indice peut également être utilisé pour étudier la diversité génétique dans une population d'isolats bactériens (Deckert et al., 2014). Les résultats d'une étude menée au Japon ont suggéré que le test CGF40 est un outil utile pour la détermination de la parenté génétique des isolats de *C. jejuni* en combinaison avec la PFGE (Furukawa et al., 2017 ; Miljkovic-Selimovic et al., 2017). De même, au Canada l'analyse des profils CGF40 a montré une nette différenciation entre les isolats de *C. jejuni* du bétail et ceux des mammifères (Viswanathan et al., 2017). D'autre part, cette méthode de génotypage des isolats a mis en évidence la faible diversité génétique de *C. jejuni* chez les bovins (Thépault et al., 2018c).

### **d. Typage basé sur le séquençage de génomes entiers**

Les données de séquençage de génomes entiers ou « Whole genome sequencing » (WGS) sont celles qui ont le pouvoir discriminant le plus précis pour le typage moléculaire dans les études épidémiologiques puisque les isolats bactériens peuvent être distingués entre eux par les polymorphismes mono nucléotidiques ou SNPs (Taboada et al., 2013). Cette méthode peut être utilisée pour décrire les caractéristiques génomiques de certains isolats et pour comparer les génomes complets des isolats individuels afin, par exemple, d'identifier les clones bactériens impliqués dans des épidémies (Revez et al., 2014a,b ; Cody et al., 2013 ; Llarena et al., 2017). Bien que la plupart des cas de campylobactériose humaine soient sporadiques, la génomique comparative des isolats étroitement apparentés pourrait révéler des épidémies diffuses parmi une plus grande population d'isolats sporadiques. Des études

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

antérieures ont utilisé les données de WGS pour déterminer les différences de génome entre les isolats provenant de la même épidémie. Dans deux études finlandaises, les comparaisons WGS ont révélé trois SNPs entre les isolats de *C. jejuni* associés à une épidémie transmise par le lait (Revez et al., 2014a) et trois SNPs également entre des isolats humains et aquatiques provenant d'une épidémie d'origine hydrique (Revez et al., 2014b). Dans une autre étude, 0 à 15 variants à un seul nucléotide ont été détectés parmi quatre isolats de *C. jejuni* provenant d'une épidémie d'origine hydrique au Canada (Clark et al., 2016). Auparavant, le WGS était une méthode très précise utilisée uniquement en recherche scientifique. De nos jours, les données WGS sont de plus en plus applicables aux pratiques cliniques en matière de diagnostic de routine (Cody et al., 2013 ; Loman et Pallen, 2015).

# *Résultats*

---

## **I. Prévalence et distribution des sous-types de *Blastocystis* sp. dans la filière avicole au Liban et confirmation de son potentiel zoonotique**

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans la revue « Parasites and Vectors »

**Greige S**, El Safadi D, Bécu N, Gantois N, Pereira B, Chabé M, Benamrouz-Vanneste S, Certad G, El Hage R, Chemaly M, Hamze M, Viscogliosi E. Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. isolates from poultry in Lebanon and evidence of zoonotic potential. *Parasites and Vectors* 2018; 11:389.

### **1. Contribution de l'étudiante à l'étude**

- Collecte des échantillons humains et animaux sur le terrain et des données cliniques des individus
- Management et organisation de la collection d'échantillons
- Réalisation des expériences de biologie moléculaire et analyse des séquences
- Interprétation des données obtenues
- Rédaction de l'article

### **2. Résumé de l'étude**

*Blastocystis* sp. est aujourd'hui le protozoaire entérique le plus fréquemment trouvé dans les selles humaines. De plus, il colonise une grande variété d'hôtes animaux dont les oiseaux et présente une grande diversité génétique avec l'identification de 17 STs dont la plupart présentent une faible spécificité d'hôte. Les ST6 et ST7 ont été, en particulier, identifiés chez les oiseaux et il a été suggéré, dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques incluant un nombre limité d'échantillons de ces animaux, que ces deux STs pouvaient correspondre à des STs aviaires. D'autre part, ces deux STs représentent aussi une proportion non négligeable des infections humaines dont l'origine zoonotique n'a jamais été clairement confirmée. En outre, malgré l'importance économique majeure de la filière avicole au Liban, aucune donnée n'était disponible concernant la prévalence de *Blastocystis* sp. chez les poulets de chair.

De ce fait, le parasite a été recherché par PCR quantitative en temps réel ciblant le gène codant l'ARNr 18S dans 223 échantillons de caeca de poulets élevés dans 74 fermes situées dans les régions du Liban-Nord et Mont-Liban. Les prélèvements ont été réalisés lors de l'abattage des animaux dans trois des principaux abattoirs de ces gouvernorats. En parallèle, 50 échantillons de selles ont été collectés pour analyse au sein du personnel de l'un de ces abattoirs en contact direct avec ces animaux et 50 autres dans un groupe contrôle composé de patients hospitalisés dans la même zone géographique et n'ayant rapporté aucun contact avec des volailles.

La prévalence globale de *Blastocystis* sp. dans les échantillons de poulet était d'environ 32% (71/223) et près de 65% (48/74) des fermes analysées étaient infectées par le parasite. Tous les isolats aviaires identifiés furent sous-typés et appartenaient aux ST6 et ST7, avec une nette prédominance du ST6 (77,5%). Pour ce qui est des membres du personnel de l'abattoir, 56% d'entre eux étaient positifs pour *Blastocystis* sp. Cette prévalence importante était très similaire à celle observée pour le groupe de patients hospitalisés (54%). ST3 était prédominant dans les deux cohortes humaines suivi du ST1 et du ST2 pour le personnel de l'abattoir ou du ST2 et du ST1 pour les patients hospitalisés. De plus, le ST6 a également été identifié chez deux personnes travaillant dans l'abattoir alors qu'il n'a pas été trouvé chez les patients hospitalisés. Une parfaite identité de séquence a été observée entre les isolats de ST6 de poulets et d'humains provenant du même abattoir.

En conclusion, ces données ont révélé une prévalence élevée de *Blastocystis* sp. dans les échantillons de poulet et ont confirmé que les ST6 et ST7 représentaient des STs adaptés aux oiseaux. Parmi les deux cohortes humaines analysées, le taux d'infection par *Blastocystis* sp. dépassait les 50% avec une prédominance du ST3. L'identification du ST6 chez des membres du personnel de l'abattoir confirmait la transmission zoonotique de ce ST du fait très probablement d'un contact direct et répété avec les poulets.

## **Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. isolates from poultry in Lebanon and evidence of zoonotic potential**

**Stéphanie Greige**<sup>1,2¶</sup>

E-mail : stephaniegreige186@gmail.com

**Dima El Safadi**<sup>2</sup>

E-mail : dima.elsafadi@hotmail.com

**Noémie Bécu**<sup>1</sup>

E-mail : noemie.becu@gmail.com

**Nausicaa Gantois**<sup>1</sup>

E-mail : nausicaa.gantois@pasteur-lille.fr

**Bruno Pereira**<sup>3</sup>

E-mail : bpereira@chu-clermontferrand.fr

**Magali Chabé**<sup>1</sup>

E-mail : magali.chabe@univ-lille2.fr

**Sadia Benamrouz-Vanneste**<sup>1,4</sup>

E-mail : sadia.benamrouz@univ-catholille.fr

**Gabriela Certad**<sup>1,5</sup>

E-mail : gabriela.Certad@pasteur-lille.fr

**Rima El Hage**<sup>6</sup>

E-mail : relhage@lari.gov.lb

**Marianne Chemaly**<sup>7</sup>

E-mail : marianne.CHEMALY@anses.fr

**Monzer Hamze**<sup>2</sup>

E-mail : mhamze@monzerhamze.com

**Eric Viscogliosi**<sup>1\*</sup>

\* Corresponding author

eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr

<sup>1</sup> Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR 8204 – CIIL – Centre d’Infection et d’Immunité de Lille, Lille, France

<sup>2</sup> Laboratoire Microbiologie Santé Environnement (LMSE), Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie, Faculté de Santé Publique, Université Libanaise, Tripoli, Lebanon

<sup>3</sup> CHU Clermont-Ferrand, Unité de Biostatistiques, Direction de la Recherche Clinique (DRCI), Clermont-Ferrand, France

<sup>4</sup> Laboratoire Ecologie et Biodiversité, Faculté de Gestion Economie et Sciences, Institut Catholique de Lille, Lille, France

<sup>5</sup> Département de la Recherche Médicale, Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille, Faculté de Médecine et Maïeutique, Université Catholique de Lille, Lille, France

<sup>6</sup> Institut de Recherche Agronomique Libanais (IRAL), Laboratoire de Microbiologie Alimentaire, Station de Fanar, Jdeideh El-Metn, Lebanon

<sup>7</sup> ANSES, Laboratoire de Ploufragan - Plouzané, Unité Hygiène et qualité des produits avicoles et porcins, Université Bretagne-Loire, Ploufragan, France

\* Correspondence: [eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr](mailto:eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr)

Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR 8204 – CIIL – Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille cedex, France

## Abstract

**Background:** *Blastocystis* sp. is a common protozoan parasite frequently identified in the digestive tract of humans and a large variety of animal hosts worldwide, including birds. It exhibits a large genetic diversity with the identification of 17 subtypes (STs), most of them with low host specificity. ST6 and ST7 were identified in birds and suggested to represent avian STs only in the context of scarce small-scale epidemiological surveys. Moreover, these two STs also account for a significant proportion of human infections whose zoonotic origin has never been clearly confirmed. Therefore, molecular screening of *Blastocystis* sp. was conducted by quantitative real-time PCR for fecal samples from poultry farms and their in-contact humans from slaughterhouses in Lebanon. In parallel, a control group consisting of patients hospitalized in the same geographical area and reporting no contact with poultry was also screened for the presence of the parasite.

**Results:** The overall prevalence of *Blastocystis* sp. was shown to reach around 32% in chicken samples and 65% in the farms screened. All the avian isolates were subtyped and belonged to either ST6 or ST7, with a large predominance of ST6. 56% of slaughterhouse staff members were positive for *Blastocystis* sp. compared with a similar prevalence of 54% in hospitalized patients. ST3 was predominant in both human cohorts followed by either ST1 then ST2 among slaughterhouse staff or by ST2 then ST1 among hospitalized patients. ST6 was also identified in two slaughterhouse workers and not in the group of hospitalized patients. Gene sequence identity was observed between chicken and human ST6 isolates from the same slaughterhouse.

**Conclusions:** Our data revealed a high prevalence of *Blastocystis* sp. in chicken samples and confirmed that ST6 and ST7 represented avian-adapted STs. Among both human cohorts, *Blastocystis* sp. infection was shown to exceed 50% with a predominance of ST3. The identification of ST6 in slaughterhouse staff members confirmed the zoonotic transmission of this ST through repeated and direct contact between chickens and their handlers.

**Keywords:** Avian parasitology, *Blastocystis* sp., Intestinal parasite, Molecular epidemiology, Real-time quantitative PCR, Subtyping, Transmission, Zoonosis

## Background

*Blastocystis* sp. is an anaerobic protozoan colonizing the gastrointestinal tract of a wide range of animal hosts and humans [1-4]. It was identified as the most common single-celled eukaryote found in human stool samples in a majority of epidemiological surveys conducted



worldwide. Indeed, its prevalence has been reported to reach an average of 20% in Europe [5, 6] and to exceed 50% in numerous developing countries as in Africa. Recently, the prevalence of *Blastocystis* sp. was thus shown to be 100% in a rural population of Senegalese children [7]. Such a high prevalence of the parasite observed in developing countries may be explained by poor sanitary conditions and hygiene practices that favor the consumption of food or water contaminated by human or animal feces. Therefore the fecal-oral route is considered the main mode of transmission of *Blastocystis* sp. [8]. Besides, travel to tropical countries has been demonstrated to increase significantly the risk of *Blastocystis* sp. infection [5].

The pathogenicity of *Blastocystis* sp. remained controversial, mainly because of its high prevalence in asymptomatic individuals. However, a wide range of *in vitro* studies have led to the identification of several virulence factors including cysteine proteases and mechanisms potentially involved in the pathogenesis of this parasite [3]. *Blastocystis* sp. infection would thus be associated with a variety of non-specific intestinal disorders, such as diarrhea and abdominal pain [8, 9] and skin rash or urticaria [10]. Moreover, as demonstrated in recent metagenomics studies [11-14], colonization by the parasite has an impact on or is linked to the composition of the human gut microbiota. Indeed, *Blastocystis* sp. infection was shown to be positively correlated with a higher bacterial diversity of fecal microbiota and negatively associated with *Bacteroides*-driven enterotype.

Although human and animal isolates of the parasite are generally difficult to distinguish at the morphological level, a wide genetic diversity has been revealed within the genus *Blastocystis* based on the comparison of small subunit rDNA (SSU rDNA) gene sequences [15, 16]. Indeed, 17 so-called subtypes (STs) have been identified so far among mammalian and avian isolates, each exhibiting sufficient genetic diversity to be classified as separate species [17]. Moreover, ten of them (ST1-ST9 and ST12) have currently been found in humans with varying prevalence [18, 19]. Briefly, approximately 90% of human isolates subtyped so far belong to ST1-ST4, with a majority of carriage attributable to ST3 in numerous countries around the world [2, 18]. Such high prevalence of these four STs can be explained in large part by human-to-human transmission. The others STs (ST5-ST9 and ST12) supposedly of animal origin are more rarely found in the human population and their presence may be linked with low host specificity and zoonotic transmission of *Blastocystis* sp. [20]. For instance, ST5 frequently infects pigs, suggesting that Suidae are likely to be natural hosts of this ST [20, 21]. In addition, in a recent study conducted in piggeries in Australia, a high prevalence of ST5 in both pigs and piggery staff, as well as sequence

identity of ST5 isolates from pigs and piggery workers was highlighted, thus confirming the potential of pigs to act as zoonotic reservoirs [21]. Regarding ST6 and ST7, both STs were considered “avian STs” because of their relative predominance in birds [20]. However, this hypothesis was based on the molecular screening of a still limited number of avian isolates since the largest scale survey to date only included about fifty bird samples collected in Colombia, for which only ST6 was detected [22]. On the other hand, unlike for ST5, no molecular studies have been performed, demonstrating clearly the zoonotic transmission of ST6 or ST7 by screening both avian samples and those of their in-contact humans. Therefore, the zoonotic potential currently proposed for “avian STs” was based solely on the high similarity or even identity of SSU rDNA gene sequences between human and animal isolates, some from different geographical origin [15]. Consequently, a better understanding of the molecular epidemiology and transmission of so-considered “avian STs” of *Blastocystis* sp. is essential, since the parasite has been frequently shown to infect birds in the few epidemiological surveys conducted in commercial farms and markets in some countries [23-25].

The first aim of the present study was thus to determine the prevalence of *Blastocystis* sp. in poultry by screening numerous chicken samples using molecular methods collected at three Lebanese slaughterhouses. The second goal was to genetically characterize all positive samples in order to confirm that birds are natural hosts of the proposed so-called “avian STs”. Finally, the potential risk of zoonotic transmission of the parasite was evaluated through the comparative analysis of the ST distribution and sequences of isolates identified in chicken and in-contact humans working in these slaughterhouses.

## **Methods**

### **Study sites and sample collection**

The study was conducted at three of the major poultry slaughterhouses in Lebanon. The first so-called slaughterhouse A is located in the governorate of North Lebanon while the other two slaughterhouses B and C are further south in the governorate of Mount Lebanon. This epidemiological survey was also conducted at the Hamidi Medical Center in Tripoli, Lebanon. All chickens included in the present study belong to the subspecies *Gallus gallus domesticus* and were raised in farms located near the corresponding slaughterhouses. The animal samples analyzed for the presence of *Blastocystis* sp. were the cecum which represents one of the organs with the highest density of pathogens and contain droppings. For

each farm, 5 ceca from 5 randomly selected chickens aged from 29 to 47 days old belonging to the same batch were collected separately by the slaughterhouse staff in the evisceration area. Each cecum was recovered in a sterile bag, respecting the conditions of asepsis and hygiene. The bags were stored in isothermal containers with ice and transported as quickly as possible to the Department of Microbiology of the AZM Center of Tripoli. The lower end of each of the 5 ceca collected from the same batch were cut using a pair of sterile tweezers and the contents of the 5 ceca were recovered into a sterile cup and pooled for further processing (within 24 h) of what was considered a single sample. Regarding slaughterhouse A, 120 samples were thus collected from 30 different farms (Additional file 1). For each of these farms, 4 samples were obtained throughout 2016 (one sample per season) in order to evaluate a possible seasonal effect on the prevalence of the parasite. In order to obtain epidemiological data from chickens in different geographical areas of Lebanon, 90 samples from 38 farms and 13 samples from 6 farms were obtained during summer, autumn and winter 2016 in slaughterhouses B and C (Additional file 1) respectively, for an overall total of 223 chicken samples screened in this survey. With the aim of evaluating the zoonotic potential of *Blastocystis* sp. isolates identified in poultry, human stool samples were obtained during the same period from 50 individuals in contact with chickens and working in slaughterhouse A, as well as from 50 patients followed up for different pathologies at Hamidi Medical Center in Tripoli and reporting no contact with poultry (control population) (Additional files 2 and 3). For each participating subject, a standardized questionnaire was designed to summarize information of interest, such as age, sex and district residency together with clinical data, especially regarding the presence of digestive symptoms (abdominal pain, bloating, constipation, diarrhea, and vomiting). Seniority in the company and location of the working area were also recorded for each staff member of slaughterhouse A.

### **DNA extraction**

Total genomic DNA was extracted directly from approximately 250 mg of animal and human fecal samples using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommended procedures. DNA was eluted in 200 µl of elution buffer and stored at -20°C at the Department of Microbiology of the AZM Center of Tripoli. DNA samples were then transported to the Pasteur Institute in Lille (France) for molecular screening and subtyping of *Blastocystis* sp.

### **Detection and molecular subtyping of *Blastocystis* sp. isolates**

Briefly, the SSU rDNA gene detection of the parasite was performed by quantitative real-time PCR (qPCR) using 2  $\mu$ l of extracted DNA and the *Blastocystis*-specific primer pair BL18SPPF1 (5'-AGTAGTCATACGCTCGTCTCAAA-3') / BL18SR2PP (5' TCTTCGTTACCCGTTACTGC-3') as described previously [26]. DNA extraction controls (isolation of DNAs without stool and from a *Blastocystis* sp.-negative stool) subsequently used in qPCR assays and positive (DNA obtained from *Blastocystis* sp. ST4 strain WR1 axenic culture maintained in the laboratory) and negative (DNA matrix replaced by water) qPCR controls were performed. qPCR product from each positive sample was purified and sequenced in both strands by Genoscreen (Lille, France). For one human sample collected at Hamidi Medical Center in Tripoli, sequence chromatogram analysis revealed the presence of a double trace, suggesting a mixed infection by different STs. This sample was thus reanalyzed by non-qPCR using the same primer pair as for qPCR. Non-qPCR amplification, as well as purification and cloning of the non-qPCR product, were performed as described previously [20]. Purified non-qPCR product cloned in the T-vector, pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) was amplified in *Escherichia coli* One Shot TOP10 competent cells and minipreparations of plasmid DNA were done using the NucleoSpin Plasmid kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Five positive clones containing inserts of the expected size were selected arbitrarily and sequenced on both strands. The SSU rDNA gene sequences obtained in this study were deposited in GenBank under accession numbers MG905462 to MG905588. The sequences obtained were compared with all *Blastocystis* sp. homologous sequences available from the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) using the nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program. The STs were identified by determining the exact match or closest similarity against all known mammalian and avian *Blastocystis* sp. STs according to the last classification of the parasite [17]. Subsequently, the sequences of *Blastocystis* sp. isolates identified in the present study as belonging to ST6 were aligned with each other using the BioEdit v7.0.1 package (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), and then with all those of the same ST obtained from animal and human isolates in previous studies and available in the databases at the time of the study (Additional file 4).

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using Stata software, version 13 (StataCorp, College Station, TX, USA). All tests were two-sided with a Type I error set at 0.05. Continuous data were expressed as mean  $\pm$  standard-deviation or as median with interquartile range [IQR]

according to statistical distribution and categorical parameters as frequencies and associated percentages. Comparisons concerning quantitative data were performed by the Student t-test or Mann-Whitney test when the assumptions of the t-test were not met. Normality was studied with the Shapiro-Wilk test and homoscedasticity with the Fisher-Snedecor test. Concerning categorical data, chi-squared or Fisher's exact tests were performed. These analyses were complemented, when appropriate, by random-effects models useful to take between- and within-farm variability into account (as a random effect).

## Results

### Prevalence of *Blastocystis* sp. in animal samples

A total of 223 single poultry samples collected from three slaughterhouses located in the North Lebanon and Mount Lebanon governorates were analyzed in the present study (Table 1). Among these samples, 120 were obtained at slaughterhouse A from chickens raised on 30 different farms. Of these 120 samples, 35.8% ( $n=43$ ) were positive for *Blastocystis* sp. by qPCR. In addition, the parasite was identified in at least one seasonal sample in 27 out of the 30 farms (90%) (Additional file 1). More precisely, 14 of these 27 farms were positive for one seasonal sample, 10 for two samples, 3 for three samples and none of the farms for the 4 samples collected over the year. In addition, because a sample was collected for each farm during the four seasons, a seasonal effect could be highlighted, since the observed prevalence of *Blastocystis* sp. in summer (15/30, 50%) was higher than that observed in spring (10/30, 33.3%), autumn (10/30, 33.3%) and winter (8/30, 26.7%), although this difference was not significant ( $p=0.06$ , summer versus others seasons). Among the 90 samples collected at slaughterhouse B, 20 (22.2%) were also positive for *Blastocystis* sp. by qPCR (Table 1). The parasite was thus identified in 16 of 38 farms (42.1%) sampled for at least one of the 3 seasons tested (Additional file 1). Even if samples were not collected in spring and some were missing for a few farms in the three remaining seasons, a slight seasonal variation was also observed, since parasite prevalence in summer (9/33, 27.3%) was higher than that observed in autumn (4/26, 15.4%) and in winter (7/31, 22.6%) ( $p=0.37$ , summer versus autumn and winter). Of the 13 samples remaining at slaughterhouse C, 8 were identified as positive for *Blastocystis* sp. (61.5%) by qPCR (Table 1). Moreover, the parasite was identified in 5 of the 6 corresponding farms (83.3%) sampled in at least one season (Additional file 1). By combining the data obtained for the three slaughterhouses, the

prevalence of *Blastocystis* sp. reached 31.8% (71/223) for chicken samples and 64.9% for farms (48/74) for which at least one seasonal sample was positive.

**Table 1** Prevalence of *Blastocystis* sp. infection and ST distribution in animal and human cohorts

Infection	Slaughterhouse A Chickens (n=120)	Slaughterhouse B Chickens (n=90)	Slaughterhouse C Chickens (n=13)	Slaughterhouse A Staff members (n=50)	Hospital <sup>a</sup> Patients (n=50)
% positive	35.8% (43)	22.2% (20)	61.5% (8)	56.0% (28)	54.0% (27 <sup>b</sup> )
ST1	0	0	0	7	1
ST2	0	0	0	5	6
ST3	0	0	0	14	21
ST6	38	14	3	2	0
ST7	5	6	5	0	0

<sup>a</sup> Hamidi Medical Center, Tripoli

<sup>b</sup> A mixed infection by 2 STs was identified in a *Blastocystis* sp.-positive patient resulting in the molecular characterization of a total of 28 isolates

### Human cohorts and prevalence of *Blastocystis* sp.

Single stool samples were collected from a total of 100 individuals divided into two groups. The first group included 50 individuals (40 male, 10 female) all working at slaughterhouse A, either in the slaughtering (45 subjects) or in the poultry delivery area (4 subjects) (Additional file 2). The last person in this group was the veterinarian in charge of sanitary controls in this slaughterhouse. The age of the individuals was between 21 and 61 years (mean age of  $36.7 \pm 10.9$  years) and all lived in 4 districts of North Lebanon (Tripoli, Akkar, Koura and Batroun). The work experience of the individuals enrolled in this slaughterhouse was between 3 months and 23 years, with a median of 3 years (IQR = [2; 9]), indicating a potentially long period of contact with and handling of poultry. 28 of these 50 individuals (56.0%) were shown to be infected with *Blastocystis* sp. by qPCR (Table 1). The difference in work experience at slaughterhouse A between *Blastocystis* sp.-infected (3[1.5; 9.5]) and *Blastocystis* sp.-free individuals (3[2; 9]) was not significant ( $p=0.89$ ). The second group (control population) consisted of 50 patients (19 male, 31 female) hospitalized at Hamidi Medical Center in Tripoli for various pathologies and reporting no contact with birds (Additional file 3). The

age of the patients was between 6 and 68 years (mean age of  $33.2 \pm 14.2$  years) and this group included only 3 children aged 6, 10 and 14 years. All of these patients lived in 4 districts of North Lebanon (Tripoli, Akkar, Koura and Batroun). A large majority of them (40/50, 80%) presented one or more gastrointestinal symptoms, including abdominal pain, bloating, constipation, diarrhea and vomiting and only 10 subjects were asymptomatic. Using qPCR, the prevalence of *Blastocystis* sp. in this group was of 54.0% (27/50) (Table 1). Among symptomatic patients, 52.5% were infected by the parasite.

### **Distribution of *Blastocystis* sp. STs in animal and human populations**

The qPCR assay used in the present study targets a partial sequence of the *Blastocystis* sp. SSU rDNA gene. Without the primers, the DNA fragments sequenced in our study were 277 to 299 bp in size, depending on ST. All the partial SSU rDNA gene sequences obtained from animal or human samples showed 99 to 100% identity with homologous sequences available in databases allowing the direct subtyping of the corresponding isolates.

Among the 43 positive chicken samples identified at slaughterhouse A, all corresponded to single infections by either ST6 ( $n=38$ , 88.4%) or ST7 ( $n=5$ , 11.6%) (Table 1). At slaughterhouse B, the *Blastocystis* sp. isolates identified also belonged to ST6 ( $n=14$ , 70.0%) and ST7 ( $n=6$ , 30.0%) (Table 1). Similarly, all 8 animal isolates obtained at slaughterhouse C were identified as belonging to ST6 ( $n=3$ , 32.5%) and ST7 ( $n=5$ , 62.5%) (Table 1). Although the number of chicken samples analyzed in slaughterhouse C was limited, a growing increase in the prevalence of ST7 was observed from the north to the south of the country according to the location of the slaughterhouses along with a decrease of ST6. Despite these geographical variations, ST6 was largely predominant (55/71, 77.5%) in poultry compared to ST7 (16/71, 22.5%) after combining data from the 3 slaughterhouses.

Among the 27 patients identified as sequence-positive for *Blastocystis* sp. by qPCR in the human group enrolled at Hamidi Medical Center in Tripoli, 26 presented single infections by the parasite and the latter subject, a mixed infection with 2 STs according to the sequence trace. With the addition of this mixed infection containing two different STs, a total of 28 isolates was analyzed. As shown in Table 1, ST3 was the most common ST in this group (21/28, 75.0%) followed by ST2 (6/28, 21.4%) and ST1 (1/28, 3.6%). In the case of the group including employees of slaughterhouse A, only single infections were detected in the 28 *Blastocystis* sp.-positive individuals. Therefore a total of 28 isolates were subtyped and the corresponding sequences belonged, in order of prevalence, to ST3 (14/28, 50.0%), ST1 (7/28, 25.0%), ST2 (5/28, 17.9%) and ST6 (2/28, 7.1%) (Table 1). Differences were observed in the

distribution of the different STs between these two human cohorts. For instance, the prevalence of ST1 was significantly higher in the group of slaughterhouse A staff members than in the group of Hamidi Medical Center (25.0% versus 3.6%,  $p=0.05$ ). In addition, ST6 was only present in the group of slaughterhouse A employees in two asymptomatic individuals while it was absent in the group of hospitalized patients without contact with poultry.

All the 57 partial SSU rDNA gene sequences obtained in the present survey that were representative of ST6 were aligned with each other and with the 37 homologous sequences available in databases from animal and human isolates identified worldwide (Additional file 4). The length of the 94 ST6 sequences included in this alignment ranged from 274 to 280 bp and these sequences showed 96.7 to 100% identity between them. In this alignment, the sequence of the Malaysian isolate LWA-9 from chicken (accession number KX234595) was selected as the reference sequence because it was the only one showing an insertion of 3 nucleotides at positions 121, 122 and 123. By comparing all the ST6 sequences, 27 positions were identified as variable in the reference sequence, i.e. positions exhibiting at least one nucleotide difference within at least one of the compared sequences (Figure 1 and Additional file 4). The analysis of all these variable positions allowed the identification of 18 so-called genotypes (1 to 18), 12 of them which currently include a single isolate and with genotype 1 represented by the reference sequence of isolate LWA-9. All ST6 sequences obtained from animal samples (WIC, HAC and SHU isolates at slaughterhouses A, B and C respectively) and human samples (WIS isolates at slaughterhouse A) in Lebanon corresponded to 6 different genotypes, with a predominance of genotype 2 (Additional file 4). Overall, all genotypes identified including more than one isolate (genotypes 2, 3, 7, 8 and 11) grouped together sequences from avian and human isolates. Strikingly, both genotypes 7 and 11 consisted only of sequences obtained from chicken (WIC) and human (WIS) samples at slaughterhouse A (Figure 1 and Additional file 4).

## **Discussion**

To the best of our knowledge, the present survey is the first epidemiological study conducted in Lebanon on the prevalence of *Blastocystis* sp. in the poultry sector, which is of major economic importance in this country with an estimated annual chicken production of 100 million animals. This is also the first large-scale survey performed worldwide to determine the prevalence and ST distribution of *Blastocystis* sp. in poultry using molecular tools.



Among the 223 poultry samples collected and analyzed at three Lebanese slaughterhouses, 71 or 31.8% were identified as harboring *Blastocystis* sp. By taking into account the origin of these samples, the parasite was also shown to be present in around 65% of the 74 farms screened, at least during one season of the year. Moreover, a seasonal impact of the prevalence of *Blastocystis* sp. in poultry samples was demonstrated, since this last was globally higher in summer than in other seasons. This difference may possibly be due to increased consumption in summer of drinking water potentially contaminated with animal fecal material on chicken farms, thus facilitating transmission of the parasite. The high prevalence observed in chicken samples could roughly reflect the overall carriage rate of *Blastocystis* sp. in this animal population in Lebanon. This corroborated the results of previous epidemiological surveys conducted in various countries using direct light microscopy of fecal smears or *in vitro* culture, even though both methods have been shown to be less sensitive than PCR [6, 26]. Indeed, the prevalence of *Blastocystis* sp. also reached around 30 to 35% in chickens sold at municipal markets in Brazil [25], in a cohort of domestic chickens in an Indonesian community [27], and in free-range chickens in various markets, farms and village households in Malaysia [28]. More spectacularly, the parasite was present in approximately 80% of domestic chickens collected in Australia [23] and in around 95% of chickens reared on four Australian commercial farms [24]. This significant prevalence of the parasite in chickens may be related to the high density of animals observed in farms or markets that likely increases the rate of contact and risk of fecal-oral transmission of *Blastocystis* sp. Interestingly, *Blastocystis* sp. was also frequently observed on chicken egg shells in a study conducted in an urban area in Colombia [29].

In the context of our study, a total of 71 *Blastocystis* sp. isolates from poultry identified in the three Lebanese slaughterhouses were subtyped. Remarkably, all of them belonged to either ST6 or ST7, with a large predominance of ST6 (77.5%). No other STs were identified, despite the large number of chicken samples screened in the present study. In previous surveys, it was however shown that other STs could occasionally infect this host group, including ST1, ST2, ST4 and ST5 [20]. The ST distribution together with the high prevalence of the parasite observed herein corroborated and confirmed the previous studies suggesting that birds, and especially chickens, would be natural hosts for *Blastocystis* sp. ST6 and ST7 and correspond to “avian STs” [15, 16, 20, 30]. Previous smaller-scale epidemiological surveys also confirmed the presence of only ST6 in five bird species in Colombia [19] and in a cohort of ostriches in Malaysia [30] and ST7 in a small sampling of domestic chickens [27]. Interestingly, all *Blastocystis* sp.-positive samples from chickens

analyzed in the present study corresponded to single infections by either ST6 or ST7, regardless of the farm of origin and the slaughterhouse. Because of the high prevalence of ST6 and ST7 in this animal cohort, lack of coinfection of chickens by these two STs was unexpected in our survey, although already described in previous small-scale molecular epidemiological studies focusing on birds [19, 27, 31] and could reflect mutual exclusion of both STs in the avian host. However, this hypothesis must be verified, especially through gut metagenomics analysis of *Blastocystis* sp.-infected chickens as applied for humans [13], allowing the identification of potential minority STs not detected by qPCR in fecal samples.

The high prevalence of *Blastocystis* sp. identified in poultry thus induces a potential risk of zoonotic transmission of the parasite, especially in individuals handling these animals as slaughterhouse staff members. In this sense, it has been repeatedly suggested that the above proposed avian-adapted STs could be zoonotic based on the SSU rDNA gene sequence identity between ST6 or ST7 isolates of birds and humans [15, 16, 30]. However, animal and human isolates belonging to the same ST, whose sequences were compared, originated from different geographical areas. Consequently, direct transmission between birds and in-contact humans was not definitively demonstrated, unlike between pigs and piggery staff [21]. It is nevertheless crucial to investigate the circulation of the parasite between avian and human populations since ST6 and ST7 together represented nearly 10% of the human isolates characterized so far outside Europe [4]. To evaluate this risk of zoonotic transmission, molecular analysis was performed on 50 fecal samples from slaughterhouse A staff, as from individuals followed up for various pathologies at Hamidi Medical Center in Tripoli, who reported having no contact with poultry. The prevalence of *Blastocystis* sp. in slaughterhouse A staff was 56% by qPCR, while the one identified at the medical center was very similar (54%). This infection rate was also roughly similar to that observed in a large cohort of schoolchildren in Tripoli (63%) [32]. The negligible difference of prevalence observed between the two human cohorts herein would be in conflict with the hypothesis suggesting that people working closely with animals have a higher risk of acquiring *Blastocystis* sp. infection [33], which incidentally was subsequently confirmed in piggery staff even if, contrary to our study, a control group without direct contact with animals was not included [21]. In both human cohorts included in the present study, ST3 was predominant, with a prevalence of 50% among slaughterhouse staff members and 75% among hospitalized patients. This was followed by ST1 (25%) and ST2 (17.9%) in people working at slaughterhouse A and conversely by ST2 (21.4%) and ST1 (3.6%) in patients followed up at the medical center. Although the individuals in both cohorts all lived in North Lebanon, the

significant difference observed in the prevalence of ST1 and ST2 between these two groups could first be explained by different reservoirs and/or sources of contamination, probably correlated with geographical variations between districts of this governorate. In addition, this could also be correlated with the significantly different percentage of symptomatic individuals observed between the two cohorts, since 80.0% of patients at the medical center had digestive symptoms, versus only 6.0% among members of the slaughterhouse A staff. Indeed, numerous mostly contradictory epidemiological studies have been published concerning the potential association between ST and disease [8, 9] but this hypothesis remains to be confirmed by further investigations.

The ST distribution with predominance of ST3 followed by either ST1 or ST2 was nearly similar to that observed in the two previous molecular studies conducted among school children in Tripoli [32] and in a limited number of patients followed up at six hospitals in North Lebanon [34], as well as in the human population of a large majority of countries all over the world [2, 18, 35]. Interestingly, ST4 was not found in the human cohorts analyzed in the present study. The absence of this ST in the human population or its very low prevalence had already been described in Lebanon and more generally in Middle Eastern countries [32, 34]. This was also the case in America, Africa, and Asia, reinforcing a little more the hypothesis of the recent emergence of this ST in Europe, to which it is mainly confined [2, 4, 35]. Strikingly, a fourth ST, ST6, was identified only in the slaughterhouse A staff group and with a rather low prevalence of 7.1%, corresponding to two cases of asymptomatic infection among the 50 individuals tested, and not in the control group. However, the presence of avian ST6 in the single cohort of in-contact workers with chickens strongly suggested zoonotic transmission of the parasite, especially since this ST has never been identified in previous molecular surveys conducted in Lebanon [32, 34]. To reinforce this hypothesis, all the ST6 SSU rDNA gene sequences available in the databases and covering the domain amplified by qPCR in the present study were extracted and aligned with those obtained in our survey from humans and animals, for a total of 94 sequences. By analyzing the sequence polymorphism between *Blastocystis* sp. ST6 isolates in the compared gene domain, 18 so-called genotypes were identified. The term “genotype” was proposed in the present study to avoid confusion with the term “allele” previously assigned by others [36], based on comparison of sequences from another domain of the same molecular marker [37]. Each of these genotypes included from 1 to 33 isolates, as in the case of the predominant genotype 2. The poultry and human ST6 isolates identified in our study were divided into a total of 6 genotypes, with a significant number belonging to genotype 2 which also included human isolates with different

geographical origins (Poland, Cyprus and Italy). In addition, genotype 8 also grouped numerous bird isolates from Lebanon, the Philippines, Japan, and Colombia, together with Japanese human isolates. This clustering could support a wide dissemination of these two ST6 genotypes in the human and animal populations around the world. Interestingly, genotypes 7 and 11 consisted only of animal and human isolates originating from slaughterhouse A. Indeed, genotype 7 included a human isolate identified from a staff member working in the slaughtering area, while the human isolate belonging to genotype 11 was from a staff member of the delivery service. In both cases, it was thus confirmed that the acquired *Blastocystis* sp. ST6 infection among slaughterhouse staff members was of animal origin through the zoonotic transmission of chicken isolates of both genotypes 7 and 11 to their in-contact workers. Due to the high prevalence of ST6 in chicken samples screened in slaughterhouse A, a higher number of human cases of ST6 infection among slaughterhouse staff members could be reasonably expected, since individuals showed an average work experience of around 6 years in the same working area, signifying long-term and repeated contact with animals. Therefore, this low prevalence of ST6 in slaughterhouse staff members could be definitively explained by the hygiene and protection measures used in this slaughterhouse, thus limiting zoonotic transmission. To confirm this hypothesis, future work should include testing farmers raising chickens, for whose the risk of zoonotic transmission is probably higher due to even more direct exposure with animal feces and likely with more limited protection than in slaughterhouses. This notion of increased risk of zoonotic transmission linked to degree of exposure to animal feces was clearly highlighted in a previous study focusing on pigs widely infected by ST5 [21]. Indeed, ST5 isolates were shown to be frequently transmitted from pigs of Australian commercial piggeries to in-contact workers, probably due to repeated exposure to large amount of pig feces. In contrast, in the same study, Cambodian villagers living in close proximity to their pigs were not infected by ST5, likely due to the less intensive nature of rearing. Besides, zoo environments have also been shown to facilitate *Blastocystis* sp. zoonotic transmission through intimate contact between animals and their zoo-keepers [29, 38, 39]. The best example concerns ST8, which is frequently found in non-human primates but only rarely in the human population [18, 20, 40]. However, its prevalence was unexpectedly high in primate handlers working in a British zoo, strongly suggesting zoonotic transmission of the parasite through contact with primate feces [29].

## **Conclusion**

The present survey represented the first large-scale molecular epidemiological study conducted on poultry, providing new insights into the prevalence and ST distribution of *Blastocystis* sp. in this animal host and highlighting the zoonotic potential of this parasite. Overall, the results of the study demonstrated that poultry were frequently infected by *Blastocystis* sp. and are thus natural hosts of the parasite. Moreover, since only ST6 and ST7 were identified in this animal host, this confirmed that both STs could be considered avian-adapted STs. Interestingly, the zoonotic potential of *Blastocystis* sp. was demonstrated through the identification of ST6 isolates only infecting both poultry and their in-contact slaughterhouse staff members in Lebanon. However, this transmission to humans has proved to be rather limited, as it probably requires direct and repeated contact with the animals. In addition, the high-quality hygiene and sanitary conditions put in place in slaughterhouses are undoubtedly effective at enabling proper care and protection when handling animals and samples. In contrast, the high prevalence of *Blastocystis* sp. observed in commercial chicken farms raises the question of the economic impact of this parasite in the poultry sector and urgently implies the need to implement prevention and control measures to reduce the burden of the parasite.

## **Abbreviations**

ST, subtype; real-time quantitative PCR, qPCR; IQR, interquartile range

## **Declarations**

### **Ethics approval and consent to participate**

The study was approved by the Lebanese Minister of Public Health (reference number 4–39716) and the research ethics committee “Comité Interne d’Ethique de la Recherche Médicale (CIER) du Groupement des Hôpitaux de l’Institut Catholique de Lille (GHICL)” (France) with reference number 2016-04-02. Oral and written informed consents were obtained from all subjects included in the present study after a clear explanation of the research objectives prior to enrolment. Subject data were collected anonymously (with encryption of the identity of individuals). This study was conducted in accordance with the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki). All chicken samples were collected after slaughter under the supervision of the staff of the various

slaughterhouses. No approval from the Institutional Animal Care and Use Committee or ethics committee was necessary, as no experiments involving live chickens were performed.

### **Consent for publication**

Not applicable

### **Availability of data and material**

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the published article and its Additional files.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Funding**

This work was supported by grants from the Programme Orientations Stratégiques of the University of Lille 2, the Partenariat Hubert Curien (PHC) France Lebanon CEDRE 2015 Project no. 32684NM, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut Pasteur of Lille, the Lebanese University and the University Catholic of Lille. SG was supported by a PhD fellowship from the AZM & Saade Association of Lebanon.

### **Authors' contributions**

*EV, MCh, REH and MH conceived and coordinated the study and designed the investigation protocol. SG, DES, REH and MH collected human and animal samples and patient data. SG and DES managed and organized the collection of samples. SG, NB and NG performed molecular experiments and analyzed the qPCR and sequence data. EV, SG, SBV, MCh, GC, MCh, REH and MH interpreted the study data. EV, SG and DES drafted the manuscript. All authors provided comments and approved the final manuscript.*

### **Acknowledgements**

*The authors would like to thank all those who participated in the study, the staff of Hamidi Medical Center in Tripoli and the three poultry slaughterhouses for their assistance in sample collection and processing.*

### **References**

1. Tan KSW. *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. *Vet Parasitol.* 2004;126:121–44.
2. Clark CG, van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR. Recent developments in *Blastocystis* research. *Adv Parasitol.* 2013;82:1-32.
3. Ajjampur SS, Tan KS. Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. - Interpreting results from *in vitro* and *in vivo* studies. *Parasitol Int.* 2016;65:772-79.
4. Stensvold CR, Clark CG. Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitol Int.* 2016;65:763-71.
5. Bart AEM, Wentink-Bonnema EMS, Gilis H, Verhaar N, Wassenaar CJA, van Vugt M, et al. Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infect Dis.* 2013;13:389.
6. El Safadi D, Cian A, Nourrisson C, Pereira B, Morelle C, Bastien P, et al. Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. from a large-scale multi-center study in France. *BMC Infect Dis.* 2016;16:451.
7. El Safadi D, Gaayeb L, Meloni D, Cian A, Poirier P, Wawrzyniak I, et al. Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infect Dis.* 2014;14:164.
8. Tan KSW. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:639–65
9. Tan KSW, Mirza H, Teo JDW, Wu B, MacAry PA. Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Curr Infect Dis Rep.* 2010;12:28-35.
10. Lepczynska M, Chen WC, Dzika E. Mysterious chronic urticarial caused by *Blastocystis* spp.? *Int J Dermatol.* 2015;55:259-66.
11. Andersen LO, Bonde I, Nielsen HB, Stensvold CR. A retrospective metagenomics approach to studying *Blastocystis*. *FEMS Microbiol Ecol.* 2015;91:fiv072.
12. Audebert C, Even G, Cian A, The *Blastocystis* Investigation Group, Loywick A, Merlin S, et al. Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Sci Rep.* 2016;6:25255.
13. Beghini F, Pasolli E, Truong TD, Putignani L, Caccio SM, Segata N. Large-scale comparative metagenomics of *Blastocystis*, a common member of the human gut microbiome. *ISME J.* 2017;11:2848-63.
14. Forsell J, Bengtsson-Palme J, Angelin M, Johansson A, Evengard B, Granlund M. The relation between *Blastocystis* and the intestinal microbiota in Swedish travelers. *BMC Microbiol.* 2017;17:231.

15. Noël C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Ho LC, et al. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J Clin Microbiol.* 2005;43:348-55.
16. Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, Thompson RC, Traub RJ, Viscogliosi E, et al. Terminology for *Blastocystis* subtypes a consensus. *Trends Parasitol.* 2007;23:93-6.
17. Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR, et al. Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist.* 2013;164:497–509.
18. Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ES, Fagbenro-Beyioku AF, Clark CG. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop.* 2013;126:11–8.
19. Ramírez JD, Sánchez A, Hernández C, Florez C, Bernal MC, Giraldo JC, et al. Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. *Infect Genet Evol.* 2016;41:32-5.
20. Cian A, El Safadi D, Osman M, Moriniere R, Gantois N, Benamrouz-Vanneste S, et al. Molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of potential zoonotic risk. *PLOS ONE.* 2017;12:e0169659.
21. Wang W, Owen H, Traub RJ, Cuttell L, Inpankaew T, Bielefeldt-Ohmann H. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia. *Vet Parasitol.* 2014;203:264-9.
22. Ramirez JD, Sanchez LV, Bautista DC, Corredor AF, Florez AC, Stensvold CR. *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infect Genet Evol.* 2014;22:223-8.
23. Stenzel DJ, Cassidy MF, Boreham PFL. Morphology of *Blastocystis* sp. from domestic birds. *Parasitol Res.* 1994;80:131-7.
24. Lee MG, Stenzel DJ. A survey of *Blastocystis* in domestic chickens. *Parasitol Res.* 1999;85:109-17.
25. Bergamo do Bomfilm TC, Machado do Couto MC. Morphological diagnosis and occurrence of *Blastocystis* spp. obtained from the stool samples of domestic bird species commercialized in municipal markets. *J Parasitol Vector Biol.* 2013;5:20-6.
26. Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, El AH, Delbac F, Livrelli V. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis*



- parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol*. 2011;49:975–83.
27. Yoshikawa H, Tokoro M, Nagamoto T, Arayama S, Asih PB, Rozi IE, et al. Molecular survey of *Blastocystis* sp. from humans and associated animals in an Indonesian community with poor hygiene. *Parasitol Int*. 2016;65:780-4.
  28. Farah Haziqah MT, Chandrawathani P, Mohd Zain SN, Suresh Kumar G, Hemalatha C, Premaalatha B. A preliminary study of *Blastocystis* sp. isolated from chicken in Perak and Selangor, *MJVR*. 2014;5:21-5.
  29. Londono-Franco AL, Loaiza-Herrera J, Lora-Suarez FM, Gomez-Martin JE. Frecuencia y fuentes de *Blastocystis* sp. en niños de 0 a 5 años de edad atendidos en hogares infantiles públicos de la zona urbana de Calarca, Colombia. *Biomedica*. 2014;34:218-27.
  30. Stensvold CR, Alfellani MA, Norskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, et al. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int J Parasitol*. 2009;39:473-9.
  31. Chandrasekaran H, Govind SK, Panchadcharam C, Bathmanaban P, Raman K, Thergarajan G. High lipid storage in vacuolar forms of subtype 6 *Blastocystis* sp. in ostrich. *Parasit Vectors*. 2014;7:469.
  32. Osman M, El Safadi D, Cian A, Benamrouz S, Nourrisson C, Poirier P, et al. Prevalence and risk factors for intestinal protozoan infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:e0004496.
  33. Rajah Salim H, Suresh Kumar G, Vellayan S, Mak JW, Khairul Anuar A, Init I, et al. *Blastocystis* in animal handlers. *Parasitol Res*. 1999;85:1032-3.
  34. El Safadi D, Meloni D, Poirier P, Osman M, Cian A, Gaayeb L, et al. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in Lebanon and correlation between subtype 1 and gastrointestinal symptoms. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;88:1203-6.
  35. Stensvold CR. *Blastocystis*: genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. *Trop Parasitol*. 2013;3:26-34.
  36. Stensvold CR, Alfellani M, Clark CG. Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. *Infect Genet Evol*. 2012;12:263-73.
  37. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG. DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist*. 2006;157:77-85.

38. Parkar U, Traub RJ, Kumar S, Mungthin M, Vitali S, Leelayoova S, et al. Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. *Parasitology*. 2007;134:359-67.
39. Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, et al. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Vet Parasitol*. 2010;169:8-17.
40. Alfellani MA, Jacob AS, Perea NO, Krecek RC, Taner-Mulla D, Verweij JJ, et al. Diversity and distribution of *Blastocystis* sp. subtypes in non-human primates. *Parasitology*. 2013;140:966-71.

## Figure legend

**Fig. 1** Alignment of partial SSU rDNA gene sequences from *Blastocystis* sp. ST6 isolates. In this reduced alignment (see complete alignment in Additional file 4), the sequence of a single representative isolate of each identified genotype is shown with the exception of genotypes 7 and 11 shown in shaded boxes for which all corresponding isolates are included. Only the 27 variable positions identified in the compared domain of the gene are included in this alignment. Their positions with respect to the reference sequence (LWA-9 Chicken Malaysia Accession number KX234595) are indicated above it. Nucleotides identical to those of the reference sequence are represented by dashes, and gaps are represented by asterisks. The genotypes are indicated on the right of the alignment followed, in parentheses, by the total number of isolates then the number of Lebanese isolates identified in our study for the corresponding genotype.

## Additional files

**Additional file 1:** Origin (farm) and season of collection of chicken samples from slaughterhouses and *Blastocystis* sp. identification. (PDF 27 kb)

**Additional file 2:** Clinical data collected from slaughterhouse A staff members and *Blastocystis* sp. identification. (XLSX 15 kb)

**Additional file 3:** Clinical data collected from patients hospitalized at Hamidi Medical Center and *Blastocystis* sp. identification. (XLSX 16 kb)

**Additional file 4:** Alignment of partial SSU rDNA gene sequences from *Blastocystis* sp. ST6 isolates (PDF 11 kb)



## **II. Prévalence et distribution des sous-types de *Blastocystis* sp. chez les vaches laitières au Liban et évaluation de son potentiel zoonotique**

Cette étude fait l'objet d'une publication soumise dans la revue « Acta Tropica ».

**Greige S**, El Safadi D, Khaled S, Gantois N, Baydoun M, Chemaly M, Benamrouz-Vanneste S, Chabé M, Osman M, Certad G, Hamze M, Viscogliosi E. First report on the prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in dairy cattle in Lebanon and assessment of zoonotic transmission risk. *Acta Tropica* 2018 soumis.

### **1. Contribution de l'étudiante à l'étude**

- Collecte des échantillons humains et animaux sur le terrain et des données cliniques des individus
- Management et organisation de la collection d'échantillons
- Réalisation des expériences de biologie moléculaire et analyse des séquences
- Interprétation des données obtenues
- Rédaction de l'article

### **2. Résumé de l'étude**

En raison de son impact et de son potentiel zoonotique avéré, *Blastocystis* sp. a été recherché pour un large éventail d'hôtes animaux et en particulier, chez les bovins domestiques dans différents pays car ces animaux peuvent constituer un réservoir possible d'infection pour l'Homme. Cependant, malgré l'importance économique majeure de la filière bovine au Liban en termes de production de viande et de lait, les données épidémiologiques concernant la prévalence et la distribution des STs de *Blastocystis* sp. chez ces animaux étaient inexistantes dans ce pays.

Des échantillons de matières fécales ont alors été collectés pour 254 vaches laitières élevées dans 55 fermes situées dans la région du Nord-Liban et soumis à une analyse visant à détecter ce parasite par PCR quantitative en temps réel ciblant le gène codant l'ARNr 18S. Afin d'explorer le potentiel zoonotique du parasite, des échantillons de selle provenant de 40

éleveurs de ces mêmes animaux ainsi que de 40 patients hospitalisés dans le même gouvernorat Libanais et n'ayant pas de contact avec ce bétail ont également été analysés.

La prévalence globale de *Blastocystis* sp. était de 63,4% chez les vaches laitières. L'analyse des séquences des isolats identifiés chez ces animaux révélait la présence de 7 STs, avec une prédominance des ST10 (44,0%) et ST14 (36,8%) et des proportions plus faibles pour les ST2 (8,0%), ST1 (7,2%), ST5 (2,4%), ST3 et ST7 (0,8% chacun). Cette enquête est la première étude au niveau mondial rapportant la présence des ST2 et ST7 chez les bovins domestiques. Chez les éleveurs, la prévalence du parasite était de 52,5% et donc proche de celle observée chez les patients hospitalisés (57,5%). De plus, les trois mêmes STs ont été identifiés dans les deux cohortes humaines, avec une prédominance du ST3 suivi du ST1 ou du ST2 en fonction du groupe. Aucun autre ST, et en particulier le ST10 ou le ST14, n'a été identifié. De plus, même si les ST1, ST2 et ST3 étaient trouvés à la fois chez les vaches laitières et chez les éleveurs, un seul isolat de ST3 présentait une identité de séquence de 100% entre les deux hôtes suggérant fortement une transmission de l'éleveur à l'animal du fait de la prédominance de ce ST dans la population humaine libanaise.

En conclusion, cette étude a montré la forte prévalence de *Blastocystis* sp. chez les vaches laitières comme d'ailleurs chez les éleveurs et les patients hospitalisés. Elle a de plus confirmé que les ST10 et ST14 représentaient des STs adaptés aux bovins compte tenu de leurs prévalences élevées chez les vaches laitières. Chez ces animaux, la présence et la faible prévalence des ST1, ST2, ST3, ST5 et ST7 dont la plupart présentent une faible spécificité d'hôte, pourraient résulter de leur exposition directe et occasionnelle à des matières fécales provenant d'hôtes humains ou non humains ou de l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés dans l'enceinte des fermes. En conséquence, couplées à l'absence des ST10 et ST14 dans la population humaine, ces données suggèrent que les bovins joueraient un rôle négligeable en tant que réservoirs zoonotiques de *Blastocystis* sp.

**First report on the prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in dairy cattle in Lebanon and assessment of zoonotic transmission risk**

Stéphanie Greige<sup>a,b,1</sup>, Dima El Safadi<sup>a,b,1</sup>, Salma Khaled<sup>a,b,1</sup>, Nausicaa Gantois<sup>a</sup>, Martha Baydoun<sup>a</sup>, Marianne Chemaly<sup>c</sup>, Sadia Benamrouz-Vanneste<sup>a</sup>, Magali Chabé<sup>a</sup>, Marwan Osman<sup>b</sup>, Gabriela Certad<sup>a,d</sup>, Monzer Hamze<sup>b</sup>, Eric Viscogliosi<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR 8204 – CIIL – Centre d’Infection et d’Immunité de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille cedex, France

<sup>b</sup> Laboratoire Microbiologie Santé et Environnement (LMSE), Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie, Faculté de Santé Publique, Université Libanaise, Rue Mitein, Tripoli, Lebanon

<sup>c</sup> ANSES, Ploufragan-Plouzané Laboratory, Hygiene and Quality of Poultry and Pig Products Unit, Bretagne-Loire University, Ploufragan, France

<sup>d</sup> Département de la Recherche Médicale, Groupement des Hôpitaux de l’Institut Catholique de Lille, Faculté de Médecine et Maïeutique, Université Catholique de Lille, 51 Boulevard de Belfort, 59000 Lille, France

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 20 87 79 61; fax: +33 3 20 87 78 88

E-mail address: eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr (E. Viscogliosi)

<sup>1</sup> Equal contributors

## Abstract

*Blastocystis* sp. is one of the most common gut-dwelling protozoans colonising humans worldwide, while also being frequently identified in a wide range of animal hosts, including bovids. Because of its burden and zoonotic potential, this parasite has been sought in domestic cattle from various countries, since this livestock may also represent a possible reservoir of human infection. However, epidemiological data regarding the prevalence and ST distribution of *Blastocystis* sp. in this animal group of major economic importance is lacking in Lebanon. Therefore, faecal samples were collected from a total of 254 dairy cattle raised on 55 farms located in the North Lebanon region and screened for the presence of the parasite by quantitative real-time PCR targeting the small subunit rDNA gene. The overall prevalence of *Blastocystis* sp. was shown to reach 63.4% in cattle livestock. Sequence analysis of positive samples indicated the presence of seven STs, with predominance of ST10 (44.0%) and ST14 (36.8%) and lower proportions of ST2 (8.0%), ST1 (7.2%), ST5 (2.4%), ST3 and ST7 (0.8% each). This survey was the first conducted worldwide reporting ST2 and ST7 in domestic cattle and confirmed that ST10 and ST14 represent cattle-adapted STs in view of their high prevalence. To explore the zoonotic potential of the parasite, faecal samples from in-contact breeders and patients hospitalised in the same Lebanese governorate who reported no contact with cattle livestock were also analysed for the presence of *Blastocystis* sp. The same three STs were identified in both human cohorts, with predominance of ST3, followed either by ST1 or ST2 depending of the group. No other STs, including ST10 or ST14, have been reported. Moreover, even though ST1, ST2 and ST3 were found to be common to dairy cattle and breeders cohorts, only one ST3 isolate showed 100% sequence identity between both hosts, strongly suggesting reverse zoonosis from handlers to animal according to the predominance of this ST in the human population. In our opinion, the presence and low prevalence of ST1, ST2, ST3, ST5 and ST7 identified herein in domestic cattle, most of which exhibit low host specificity, could be derived from occasional direct exposure to faecal material from human and non-human hosts or by ingestion of contaminated drinking water or food in the enclosure of the farms. Consequently, together with the absence of ST10 and ST14 in the human population, these data suggest that cattle play a negligible role as zoonotic reservoirs of *Blastocystis* sp.

**Keywords:** *Blastocystis* sp., Dairy cattle, Intestinal parasite, Molecular epidemiology, Transmission, Zoonosis

## 1. Introduction

*Blastocystis* sp. is currently the most common single-celled intestinal parasite found in humans, since its prevalence can greatly exceed 50% in developed countries (El Safadi et al., 2014; Forsell et al., 2016) and reach an average of around 20% in industrialised regions of Europe (Bart et al., 2013; El Safadi et al., 2016). This protozoan has also been frequently found in many groups of animals, including non-human primates and various groups of mammals, birds, reptiles, amphibians and insects (Tan, 2004; Stensvold and Clark, 2016; Yoshikawa et al., 2016; Cian et al., 2017). The principal mode of transmission of *Blastocystis* sp. is the faecal-oral route, essentially through consumption of water or food contaminated by environmentally resistant cystic forms of the parasite (Tan, 2008). Due to the very common asymptomatic carriage of the parasite in the human population worldwide, its pathogenic potential and clinical significance remains uncertain (Andersen and Stensvold, 2016), even though numerous recent *in vitro* studies have identified the mechanisms and molecules involved in the virulence of the parasite (Clark et al., 2013; Wawrzyniak et al., 2013; Ajjampur and Tan, 2016; Stensvold and Clark, 2016). Moreover, recent data suggest that colonisation by the parasite is associated with certain intestinal bacterial communities in the host (Andersen et al., 2015; Audebert et al., 2016; Forsell et al., 2017). *Blastocystis* sp. infection would thus be associated with various gastrointestinal disorders (Tan, 2008; Tan et al., 2010) and/or urticaria (Lepczynska et al., 2015) in numerous human clinical cases.

An extensive genetic diversity has been demonstrated within the genus *Blastocystis* based on the comparison of small subunit (SSU) rDNA gene sequences (Noël et al., 2005; Stensvold et al., 2007a). Indeed, 17 subtypes (STs) have been identified so far in mammalian and avian hosts (Alfellani et al., 2013a), ten of which infect humans with varying prevalence (Alfellani et al., 2013b; Clark et al., 2013; Ramirez et al., 2016; Stensvold and Clark, 2016). Briefly, more than 90% of human isolates belong to ST1 to ST4, in large part likely related to human-to-human transmission (Alfellani et al., 2013b; Clark et al., 2013). Most other STs found in the human population are considered to be of animal origin, with low host specificity and are potentially zoonotic. For instance, ST5 frequently infects pigs, whereas ST6 and ST7 are predominant in birds (Cian et al., 2017). Based on large-scale epidemiological surveys, these last STs were considered to be pig- and avian-adapted STs respectively, and corresponding isolates were shown to be possibly transmitted from these animals to their in-contact workers at intensive commercial piggeries and poultry slaughterhouses (Wang et al., 2014; Greige et al., 2018). In addition, ST8, which is common in non-human primates, was identified with unexpected high prevalence in their keepers



(Stensvold et al., 2009). In view of these data, it became necessary to determine the infection rate and ST distribution of *Blastocystis* sp. in other animal groups, such as bovids and particularly livestock cattle. In the main recent molecular epidemiological surveys including a large number of specimens (Zhu et al., 2017; Lee et al., 2018; Masuda et al., 2018; Wang et al., 2018), the prevalence of the parasite in domestic dairy/beef cattle varied between 6.7% and 54.1%, depending on the country. The potential significant occurrence of *Blastocystis* sp. in livestock cattle could thus induce a risk of zoonotic transmission, especially in breeders. Moreover, the same molecular studies and a few others identified ST10 and ST14 as the predominant STs in cattle, likely reflecting bovids as natural hosts for both STs (Cian et al., 2017; Zhu et al., 2017; Masuda et al., 2018). Strikingly, ST10 and ST14 have never yet been reported in human infections, suggesting minimal risk of zoonotic transmission (Cian et al., 2017; Wang et al., 2018). However, neither of these STs has so far been sought in cattle and their in-contact breeders to confirm this hypothesis.

The objectives of this study was thus to obtain the first molecular data regarding the prevalence and ST distribution of *Blastocystis* sp. in dairy cattle in Lebanon. A particular purpose was to confirm that bovids represent natural hosts of ST10 and ST14. In addition, the risk of zoonotic transmission of the parasite was assessed through a comparative analysis of the ST distribution of isolates identified in dairy cattle and in-contact breeders, as well as in individuals reporting no contact with these animals.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Ethics statement**

The protocol of this study was approved by the Lebanese Minister of Public Health with reference number 2014/4/39716 and by the research ethics committee of Hamidi Medical Centre in Tripoli, Lebanon, with reference number Hamidi-7-2017. Oral and written informed consent was obtained from all subjects included in this study after a clear explanation of the research objectives prior to enrolment. The subjects' data were collected anonymously (with encryption of the identity of individuals). This study was conducted in accordance with the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki). All dairy cattle samples were collected under the supervision of the breeders. No approval from the Institutional Animal Care and Use Committee or ethics committee was necessary, as no invasive sampling approach was performed.

### **2.2. Study sites and sample collection**

The study was conducted in the two governorates comprising the North Lebanon region, namely Akkar and North governorates, the latter including the regional capital Tripoli (Figure 1). All healthy adult dairy cattle included in this study were older than 12 months and were of the Holstein-Friesian breed (*Bos taurus*). In Akkar governorate, 157 faecal specimens were randomly collected from 22 villages and 36 farms from July to November 2016. In order to obtain epidemiological data from dairy cattle in different geographical areas in Lebanon, 97 samples were also randomly obtained from 15 villages and 19 farms from July to November 2017 in North governorate, for an overall total of 254 cattle samples screened in this survey (one specimen per animal). Briefly, faecal samples were collected in the early morning with the assistance of the breeders and veterinarians. Specimens were either collected directly from the rectum of the animal with a gloved hand or directly from the ground immediately after defecation to prevent potential contamination between animals. Each fresh faecal sample was recovered in a sterile plastic container, respecting the conditions of asepsis and hygiene. The containers were stored in ice and then immediately transported to the LMSE at the AZM Centre in Tripoli. To evaluate the zoonotic potential of *Blastocystis* sp. isolates identified in dairy cattle, human stool samples were obtained during the same period from 40 breeders working at the same 19 dairy cattle farms located in North governorate and from 40 individuals followed up for different pathologies or who presented for routine medical check-ups at Hamidi Medical Centre in Tripoli who reported no contact with cattle (control population). A standardised questionnaire was designed to collect data of interest, such as age, sex, residency and gastrointestinal symptoms (abdominal pain, bloating, constipation, diarrhoea and/or vomiting) for each voluntary individual, as well as seniority as in-contact worker with cattle for the cohort of breeders.

### 2.3. DNA extraction

Total genomic DNA was extracted directly from approximately 250 mg of animal or human faecal samples using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommended procedures. The DNA was eluted in 200 µl of elution buffer and stored at -20°C at the LMSE in Tripoli. The DNA samples were then transported to the Pasteur Institute in Lille (France) for molecular screening and subtyping of *Blastocystis* sp.

### 2.4. Detection and molecular subtyping of *Blastocystis* sp. isolates

SSU rDNA gene detection of the parasite was performed by quantitative real-time PCR (qPCR) using 2 µl of extracted DNA and the *Blastocystis*-specific primer pair BL18SPPF1 / BL18SR2PP, as described previously by Poirier et al. (2011). DNA extraction controls (isolation of DNAs without stool and from a *Blastocystis* sp.-negative stool) subsequently used in qPCR assays and positive (DNA obtained from *Blastocystis* sp. ST7 strain B axenic culture maintained in the laboratory) and negative (DNA matrix replaced by water) qPCR controls were performed. The qPCR product from each positive sample was purified and sequenced in both strands by Genoscreen (Lille, France). For 3 human samples obtained from breeders and 3 others collected from patients followed at Hamidi Medical Centre in Tripoli, sequence chromatogram analysis revealed the presence of double traces, suggesting mixed infection by different STs. Mixed signals were also generated for numerous qPCR products obtained from dairy cattle samples. All 6 human samples and a selection of 9 animal samples corresponding to mixed infections were thus re-analysed by non-qPCR using the same primer pair as for qPCR. Non-qPCR amplification, as well as purification and cloning of the non-qPCR product, were performed as described previously (Cian et al., 2017). Briefly, the purified non-qPCR product cloned in the T-vector, pCR 2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, USA) was amplified in *Escherichia coli* One Shot TOP10 competent cells and minipreparations of plasmid DNA were done using the NucleoSpin Plasmid kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Five positive clones containing inserts of the expected size were selected arbitrarily and sequenced on both strands. The SSU rDNA gene sequences obtained in this study were deposited in GenBank under accession numbers MH883051 to MH883225. The sequences obtained were compared with all *Blastocystis* sp. homologous sequences available from the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) using the nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program. The STs were identified by determining the exact match or closest similarity to all known mammalian and avian *Blastocystis* sp. STs according to the most recent classification of the parasite (Alfellani et al., 2013a).

## 2.5. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software, version 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The chi-squared test was used to compare the *Blastocystis* sp. prevalence between the Akkar and North governorate dairy cattle groups. Fisher's exact test was used to compare the ST distribution of the parasite between the two

human cohorts, as well as those of the two animal groups. All tests were two-sided and the general significance level was set at a *P* value of below 0.05.

### 3. Results and discussion

A total of 254 single dairy cattle samples collected from 37 villages and 55 farms located in two governorates of North Lebanon were screened in this study (Table 1). Of these samples, 157 were obtained at Akkar governorate from cattle raised on 36 different farms. Of these 157 samples, 78.3% ( $n = 123$ ) were identified as positive for *Blastocystis* sp. by qPCR. Of the 97 dairy cattle samples collected from 19 different farms in North governorate, 38 (39.2%) were also positive for the parasite by qPCR. The statistically significant difference of *Blastocystis* sp. prevalence in cattle between the two geographical regions (chi-squared test,  $Z = 4.498$ ,  $P < 0.05$ ) may possibly be due to the lower quality hygiene and sanitary conditions at farms in the rural governorate of Akkar, thus facilitating the transmission of the parasite between livestock. By combining the molecular data obtained from the two governorates, the prevalence of *Blastocystis* sp. reached 63.4% (161/254) among dairy cattle samples. This high infection rate in Lebanon was roughly similar to that observed using molecular methods in other countries, including Japan (54.1%) (Masuda et al., 2018), Thailand (50.0%) (Udonsom et al., 2018), Colombia (80.0%) (Ramirez et al., 2014) and Libya (41.7%) (Alfellani et al., 2013a) but was significantly higher than that reported in Korea (6.7%) (Lee et al., 2018), China (9.5% and 10.3%, respectively) (Zhu et al., 2017; Wang et al., 2018), Iran (9.6%) (Badparva et al., 2015), the United Kingdom (22.6%) (Alfellani et al., 2013a) and the United States (19.1%) (Fayer et al., 2012). Additional surveys also revealed a prevalence of 71.0%, 21.4% and 1.8% in Japan (Abe et al., 2002), Brazil (Franco Moura et al., 2018) and Spain (Quilez et al., 1995) respectively, using direct light microscopy of faecal smears, in the knowledge that this identification method has been shown to be less sensitive than PCR (Poirier et al., 2011). Although the prevalence of the parasite in domestic cattle may vary between geographical areas, it is nevertheless globally important worldwide, thus inducing a potential risk of transmission to in-contact humans.

To start assessing this zoonotic risk, single stool samples were collected from a total of 80 volunteers divided into two cohorts (Table 1). The first cohort included 40 individuals (26 males and 14 females), all working on dairy cattle farms in North governorate for a period of between 6 months and 30 years, with a median of 8 years, indicating a potentially long period of contact with animals. The age of the individuals in this cohort was between 22 and 65 years (mean age of  $36 \pm 10$  years) and 21 of these 40 breeders (52.5%) were shown to be

infected with *Blastocystis* sp. by qPCR. Moreover, only 5 breeders presented gastrointestinal symptoms and 3 of them were infected by the parasite. The second cohort (or control group) consisted of 40 patients (12 males and 28 females) aged 21 to 70 years (mean age of  $24 \pm 12$  years), hospitalised at Hamidi Medical Centre in Tripoli for various pathologies or medical check-ups, who reported no contact with cattle. 62.5% of the patients (25/40) presented one or more gastrointestinal symptoms. Using qPCR, the prevalence of *Blastocystis* sp. in this second human cohort was not significantly different to that of the breeders, i.e. 57.5% (23/40). In addition, 52.0% of symptomatic patients (13/25) were infected by the parasite. Interestingly, the infection rate observed in each of these two groups (52.5% and 57.5% respectively) was very similar to that recently reported in North Lebanon region in a large cohort of schoolchildren (63.0%) (Osman et al., 2016) and two groups of individuals working in a poultry slaughterhouse (56.0%) or hospitalised at Hamidi Medical Centre in Tripoli (54.0%) (Greige et al., 2018). On the other hand, the similar prevalence observed between all these Lebanese groups of individuals suggested that people working closely with animals, including for instance domestic cattle or poultry (Greige et al., 2018) but also pigs (Wang et al., 2014), did not systematically have a higher risk of acquiring *Blastocystis* sp. infection as previously proposed (Rajah Salim et al., 1999), without thereby jeopardising the potential zoonotic transmission of certain animal STs.

In a second step, the genetic diversity of *Blastocystis* sp. isolates was explored in dairy cattle and human cohorts. In this study, all partial SSU rDNA gene sequences obtained from animal or human samples showed 99 to 100% identity with homologous sequences available in databases allowing the direct subtyping of the corresponding isolates (Table 1). Regarding the 123 positive dairy cattle samples identified in Akkar governorate, 84 corresponded to single infections by either ST1 ( $n = 4$ , 3.3%), ST5 ( $n = 3$ , 2.4%), ST7 ( $n = 1$ , 0.8%), ST10 ( $n = 40$ , 32.5%) and ST14 ( $n = 36$ , 29.3%). The 39 remaining positive dairy cattle samples (31.7%) from this governorate presented mixed infections with at least 2 unidentified STs according to the resulting sequence chromatograms. Of the 38 positive animal specimens identified in North governorate, 21 corresponded to single infections with the detection of ST2 ( $n = 1$ , 2.6%), ST3 ( $n = 1$ , 2.6%), ST10 ( $n = 12$ , 31.6%) and ST14 ( $n = 7$ , 18.4%) and the 17 other samples (44.8%) to mixed infections. Given the large number of mixed infections identified in animal samples collected in both governorates, only a selection of them was thus re-analysed by non-qPCR to have a partial overview of the STs found in these specimens. Therefore, one sample from each farm presenting mixed infection in North governorate was selected. Cloning of the non-qPCR products was performed from these 9 representative

animal specimens for subtyping, and 5 positive clones were selected arbitrarily and sequenced for each cloning. Seven of the 9 selected samples showed mixed infections with two different STs (ST2/ST1,  $n = 4$ ; ST2/ST10,  $n = 1$ ; ST2/ST14,  $n = 2$ ) whereas the two remaining samples harboured 3 different STs (ST1/ST2/ST10 and ST2/ST10/ST14 respectively). Taking into account these 9 mixed infections consisting of either two or three different STs, the ST distribution in dairy cattle from this governorate was as follows: ST1 ( $n = 5$ ), ST2 ( $n = 10$ ), ST3 ( $n = 1$ ), ST10 ( $n = 15$ ) and ST14 ( $n = 10$ ). The major difference observed between these two animal cohorts in terms of distribution of STs was the presence of only ST2 in the group of North dairy cattle, while it was absent from the Akkar group of animals (Fisher's exact test, 24.4% vs. 0%,  $P < 0.05$ ). By merging all molecular data obtained from dairy cattle samples in North Lebanon region, a total of 125 isolates were subtyped and belonged to 7 different STs with, in order of prevalence, ST10 (55/125, 44.0%), ST14 (46/125, 36.8%), ST2 (10/125, 8.0%), ST1 (9/125, 7.2%), ST5 (3/125, 2.4%), ST3 and ST7 (1/125 each, 0.8%). Herein, ST10 and ST14 were thus largely predominant by accounting for more than 80% of the subtyped isolates. As shown in Table 2 reporting all the isolates subtyped from domestic cattle in various geographical areas, ST10 and ST14 also globally represented the most widely distributed STs (73.2% of total isolates). This was clearly the case, for instance, in Japan (Masuda et al., 2018), Korea (Lee et al., 2018), China (Zhu et al., 2017) and Libya (Alfellani et al., 2013a). Strikingly, ST10 and ST14 were the only two STs identified in cattle in the USA (Santin et al., 2011; Fayer et al., 2012). Therefore, all of these data confirmed that domestic cattle would be natural hosts for *Blastocystis* sp. ST10 and ST14. In addition to these two predominant STs, five minor STs (ST1, ST2, ST3, ST5 and ST7) were identified in the livestock investigated in this study. Briefly, it was the first report of the presence of ST2 and ST7 in domestic cattle, while the three other STs had previously been detected with varying prevalence in the same animal group in different countries (Table 2).

Regarding the breeders cohort, 18 individuals presented single infections by the parasite, and 3 others had mixed infections with two STs. With the addition of these mixed infections, a total of 24 isolates was subtyped. As shown in Table 1, ST3 was predominant (12/24, 50.0%), followed by ST2 (7/24, 29.2%) and ST1 (5/24, 20.8%). In the case of the second human cohort comprising patients enrolled at Hamidi Medical Centre in Tripoli, 20 and 3 of them presented single and mixed infections with two STs respectively. Therefore, a total of 26 isolates was subtyped and three different STs were identified as follows: ST3 (13/26, 50.0%), ST1 (8/26, 30.8%) and ST2 (5/26, 19.2%). Interestingly, no other ST was identified

in these two human groups. Moreover, although the number of samples analysed in each cohort remained limited, the distribution of the different STs was not significantly different between the two human groups (Fisher's exact test,  $P = 0.67$ ). Strikingly, this distribution with predominance of ST3 followed by either ST1 or ST2 was also nearly similar to that observed in previous studies conducted recently among patients at the same hospital in Tripoli, staff members working in poultry slaughterhouses in North Lebanon (Greige et al., 2018) and among schoolchildren in Tripoli (Osman et al., 2016).

By analysing all the molecular data obtained herein, the zoonotic potential of *Blastocystis* sp. was evaluated through the comparison of the ST distribution reported in animal and human cohorts in North Lebanon. Despite the high prevalence of ST10 and ST14 in cattle livestock, neither ST was identified especially in breeders despite these workers having intimate, long-term and repeated contact with these animals. To our knowledge, these two STs have also never been documented in human infections worldwide (Clark et al., 2013; Stensvold and Clark, 2016), suggesting that humans would not be susceptible to their infection. Another hypothesis that remains to be further confirmed could be that these two STs produce non-resistant cystic environmental forms or even produce no cysts, thus preventing any possible transmission of the parasite to another host through indirect contact. ST5 was also infrequently identified in dairy cattle, as in previous studies conducted in various countries (Table 2) and herein only in animals raised at Akkar governorate. Recently, ST5 was proposed as a pig-adapted ST (Wang et al., 2014) and consequently cannot likely be assigned to domestic cattle at this time. Its zoonotic potential was confirmed through the frequent infection of piggery staff by this ST (Wang et al., 2014) and pig-rearing villagers (Yan et al., 2007). However, despite the very large number of samples screened, ST5 has not yet been identified in this study as in other Lebanese human cohorts (Osman et al., 2016; Greige et al., 2018). The only known case of ST7 infection in cattle was identified in this study at a farm located at Akkar governorate. This ST was proposed as an avian-adapted ST with potential zoonotic risk (Alfellani et al., 2013a; Cian et al., 2017) and its episodic prevalence in cattle livestock likely reflected opportunistic infection through contact with bird faeces. Again, ST7 has never been yet identified in the Lebanese human population (Osman et al., 2016; Greige et al., 2018), as confirmed herein. Interestingly, three STs (ST1, ST2 and ST3) were found in common in dairy cattle and their in-contact breeders in North governorate, suggesting potential transmission between the hosts. However, only six animal isolates belonging to these STs and as part of single or mixed infections were identified on 4 different farms at which breeders were infected by the same STs. By comparing the

corresponding dairy cattle and in-contact breeder isolate sequences, 100% identity was shown for only one ST3 isolate infecting both hosts. Since ST3 is known to be predominantly harboured by the human population (Clark et al., 2013; Stensvold and Clark, 2016) including Lebanon and very rarely found in domestic cattle as shown in Table 2, this case of *Blastocystis* sp. ST3 infestation in livestock can likely be explained by reverse zoonosis from human handlers to animals, as suggested in previous studies focused on various animal hosts (Ramirez et al., 2014) and pigs (Wang et al., 2014). Regarding the two others, ST1 and ST2, considered to be emerging STs linked to human infection (Clark et al., 2013; Stensvold and Clark, 2016), their origin in Lebanese domestic cattle remains uncertain according to our sequence data. Globally, the low prevalence of ST1, ST2, ST3, ST5 and ST7 observed in the Lebanese cattle population suggests that these animals are unlikely to be natural hosts of these STs and are potentially opportunistically infected through direct exposure to faecal material from human and non-human hosts or by ingestion of contaminated drinking water or food in their environment, as proposed in both stray and household dogs (Wang et al., 2013; Osman et al., 2015). The difference in the prevalence of ST2 observed between dairy cattle raised in the two Lebanese governorates, while this ST is known to infect humans and numerous animal groups (Clark et al., 2013; Stensvold and Clark, 2016; Cian et al., 2017), reinforced this hypothesis by highlighting different infection sources in two different Lebanese geographical areas. However, since domestic cattle carry potential zoonotic STs, these animals are thus capable of shedding the corresponding isolates and may therefore represent secondary zoonotic reservoirs of infection.

#### **4. Conclusion**

This study presents the first molecular epidemiological data on *Blastocystis* sp. infection in cattle livestock in Lebanon. Through both the high number of samples screened and isolates subtyped, it provided new insights into the prevalence and ST distribution of the parasite in this animal host. This survey conducted in North Lebanon demonstrated that dairy cattle were frequently infected by *Blastocystis* sp., with an overall prevalence of the parasite exceeding 60%. This clearly raised the question of the impact of this infection in the bovid sector, which is of major importance in this country. The variety of STs colonising this animal group was also highlighted, with a total of seven STs identified, including ST1, ST2, ST3, ST5, ST7, ST10 and ST14. ST10 and ST14 were largely predominant in this animal population, confirming that both STs could be considered cattle-adapted STs. Others STs were all identified with low prevalence and their presence was suggested to be related to



opportunistic contamination from various animal or even human and environmental sources. Finally, by comparing the ST distribution of the parasite in cattle and in-contact breeders, as well as in individuals without contact with bovids, the risk of zoonotic transmission of *Blastocystis* sp. was demonstrated to be minimal. However, further large-scale studies should be conducted to fully understand the exact role of domestic cattle in the epidemiology of *Blastocystis* sp. and as potential sources of transmission of the parasite to humans, at least as secondary reservoirs.

### **Conflicts of interest**

The authors declare that there are no competing interests.

### **Authors' contributions**

D.E.S., M.O., G.C., M.H. and E.V. conceived the study and designed the experiments. S.G., D.E.S., S.K., N.G. and M.O. collected the samples and/or performed the experiments. M.B. performed the statistical analyses. S.G., D.E.S., S.K., S.B.V., M.Che, M.Cha, G.C., M.H. and E.V. participated in the interpretation of data. S.G., D.E.S., S.K. and E.V. wrote the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank all those who participated in the study, the staff of Hamidi Medical Centre in Tripoli, breeders for their assistance in sample collection and processing, and veterinary doctor Rabah Outour. This work was supported by grants from the Programme Orientations Stratégiques of the University of Lille 2, the Partenariat Hubert Curien (PHC) France Lebanon CEDRE 2015 Project n°32684NM from the Ministère des Affaires Etrangères et du Développement International and the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut Pasteur of Lille, the Lebanese University and the Catholic University of Lille. S.G. and S.K. were supported by Ph.D. fellowships from the Azm & Saade Association of Lebanon.

## References

- Abe, N., Nagoshi, M., Takami, K., Sawano, Y., Yoshikawa, H., 2002. A survey of *Blastocystis* sp. in livestock, pets, and zoo animals in Japan. *Vet Parasitol.* 106, 203-212.
- Ajjampur, S.S., Tan, K.S., 2016. Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. - Interpreting results from *in vitro* and *in vivo* studies. *Parasitol Int.* 65, 772-779.
- Alfellani, M.A., Taner-Mulla, D., Jacob, A.S., Imeede, C.A., Yoshikawa, H., Stensvold, C.R., Clark, C.G., 2013a. Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist.* 164, 497-509.
- Alfellani, M.A., Stensvold, C.R., Vidal-Lapiedra, A., Onuoha, E.S., Fagbenro-Beyioku, A.F., Clark, C.G., 2013b. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop.* 126, 11-18.
- Andersen, L.O., Stensvold, C.R., 2016. *Blastocystis* in health and disease: are we moving from a clinical to a public health perspective? *J Clin Microbiol.* 54, 524-528.
- Andersen, L.O., Bonde, I., Nielsen, H.B., Stensvold, C.R., 2015. A retrospective metagenomics approach to studying *Blastocystis*. *FEMS Microbiol Ecol.* 91, fiv072.
- Audebert, C., Even, G., Cian, A., The *Blastocystis* Investigation Group, Loywick, A., Merlin, S., Viscogliosi, E., Chabé, M., 2016. Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Sci Rep.* 6, 25255.
- Badparva, E., Sadraee, J., Kheirandish, F., 2015. Genetic diversity of *Blastocystis* isolated from cattle in Khorramabad, Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 8, e14810.
- Bart, A., Wentink-Bonnema, E.M.S., Gilis, H., Verhaar, N., Wassenaar, C.J.A., van Vugt, M., Goorhuis, A., van Gool, T., 2013. Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infect Dis.* 13, 389.
- Cian, A., El Safadi, D., Osman, M., Moriniere, R., Gantois, N., Benamrouz-Vanneste, S., Delgado-Viscogliosi, P., Guyot, K., Li, L.L., Monchy, S., Noël, C., Poirier, P., Nourrisson, C., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Bosc, S., Chabe, M., Petit, T., Certad, G., Viscogliosi, E., 2017. Molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of potential zoonotic risk. *PLoS One* 12, e0169659.
- Clark, C.G., van der Giezen, M., Alfellani, M.A., Stensvold, C.R., 2013. Recent developments in *Blastocystis* research. *Adv Parasitol.* 82, 1-32.

- El Safadi, D., Gaayeb, L., Meloni, D., Cian, A., Poirier, P., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Dabboussi, F., Delhaes, L., Seck, M., Hamze, M., Riveau, G., Viscogliosi, E., 2014. Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infect Dis.* 14, 164.
- El Safadi, D., Cian, A., Nourrisson, C., Pereira, B., Morelle, C., Bastien, P., Bellanger, A.-P., Botterel, F., Candolfi, E., Desoubeaux, G., Lachaud, L., Morio, F., Pomares, C., Rabodonirina, M., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Gantois, N., Certad, G., Delhaes, L., Poirier, P., Viscogliosi, E., 2016. Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. from a large-scale multi-center study in France. *BMC Infect Dis.* 16, 451.
- Fayer, R., Santin, M., Macarasin, D., 2012. Detection of concurrent infection of dairy cattle with *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* by molecular and microscopic methods. *Parasitol Res.* 111, 1349-1355.
- Forsell, J., Granlund, M., Samuelsson, L., Koskiniemi, S., Edebro, H., Evengard, B., 2016. High occurrence of *Blastocystis* sp. subtypes 1-3 and *Giardia intestinalis* assemblage B among patients in Zanzibar, Tanzania. *Parasit Vectors.* 9, 370.
- Forsell, J., Bengtsson-Palme, J., Angelin, M., Johansson, A., Evengard, B., Granlund, M., 2017. The relation between *Blastocystis* and the intestinal microbiota in Swedish travelers. *BMC Microbiol.* 17, 231.
- Franco Moura, R.G., de Oliveira-Silva, M.B., Pedrosa, A.L., Nogueira Nascentes, G.A., Cabrine-Santos, M., 2018. Occurrence of *Blastocystis* spp. in domestic animals in Triangulo Mineiro area of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 51, 240-243<;
- Greige, S., El safadi, D., Bécu, N., Gantois, N., Pereira, B., Chabé, M., Benamrouz-Vanneste, S., Certad, G., El Hage, R., Chemaly, M., Hamze, M., Viscogliosi, E., 2018. Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. isolates from poultry in Lebanon and evidence of zoonotic potential. *Parasit Vectors.* 11, 389.
- Lee, H., Lee, S.-H., Seo, M.-G., Kim, H.-Y., Kim, J. W., Lee, Y.6R., Kim, J. H., Kwon, O.-D., Kwak, D., 2018. Occurrence and genetic diversity of *Blastocystis* in Korean cattle. *Vet Parasitol.* 258, 70-73.
- Lepczynska, M., Chen, W.C., Dzika, E., 2015. Mysterious chronic urticarial caused by *Blastocystis* spp.? *Int J Dermatol.* 55, 259-266.
- Masuda, A., Sumiyoshi, T., Ohtaki, T., Matsumoto, J., 2018. Prevalence and molecular subtyping of *Blastocystis* from dairy cattle in Kanagawa, Japan. *Parasitol Int.* 67, 702-705.

- Noël, C., Dufernez, F., Gerbod, D., Edgcomb, V.P., Delgado-Viscogliosi, P., Ho, L.C., Singh, M., Wintjens, R., Sogin, M.L., Capron, M., Pierce, R., Zenner, L., Viscogliosi, E., 2005. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J Clin Microbiol.* 43, 348-355.
- Osman, M., Bories, J., El Safadi, D., Poirel, M.-T., Gantois, N., Benamrouz-Vanneste, S., Delhaes, L., Hugonnard, M., Certad, G., Zenner, L., Viscogliosi, E., 2015. Prevalence and genetic diversity of the intestinal parasites *Blastocystis* sp. and *Cryptosporidium* spp. in household dogs in France and evaluation of zoonotic transmission risk. *Vet Parasitol.* 214, 167-170.
- Osman, M., El Safadi, D., Cian, A., Benamrouz, S., Nourrisson, C., Poirier, P., Pereira, B., Razakandrainibe, R., Pinon, A., Lambert, C., Wawrzyniak, I., Dabboussi, F., Delbac, F., Favennec, L., Hamze, M., Viscogliosi, E., Certad, G., 2016. Prevalence and risk factors for intestinal protozoan infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLoS Negl Trop Dis.* 10, e0004496.
- Poirier, P., Wawrzyniak, I., Albert, A., El Alaoui, H., Delbac, F., Livrelli, V., 2011. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol.* 49, 975–983.
- Quilez, J., Sanchez-Acedo, C., Clavel, A., Causapé, A.C., 1995. Occurrence of *Blastocystis* sp. in cattle in Aragon, northeastern Spain. *Parasitol Res.* 81, 703-705.
- Rajah Salim, H., Suresh Kumar, G., Vellayan, S., Mak, J.W., Khairul Anuar, A., Init, I., Vennila, G.D., Saminathan, R., Ramakrishnan, K., 1999. *Blastocystis* in animal handlers. *Parasitol Res.* 85, 1032-1033.
- Ramirez, J.D., Sanchez, L.V., Bautista, D.C., Corredor, A.F., Florez, A.C., Stensvold, C.R., 2014. *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infect Genet Evol.* 22, 223-228.
- Ramírez JD, Sánchez A, Hernández C, Florez C, Bernal MC, Giraldo JC, Reyes, P., Lopez, M.C., Garcia, L., Cooper, P.J., Vicuna, Y., Mongi, F., Casero, R.D., 2016. Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. *Infect Genet Evol.* 41, 32-35.

- Santin, M., Gomez-Munos, M.T., Solano-Aguilar, G., Fayer, R., 2011. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitol Res.* 109, 205-212.
- Stensvold, C.R., Clark, C.G., 2016. Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitol Int.* 65, 763-771.
- Stensvold, C.R., Suresh, G.K., Tan, K.S., Thompson, R.C., Traub, R.J., Viscogliosi, E., Yoshikawa, H., Clark, C.G., 2007. Terminology for *Blastocystis* subtypes a consensus. *Trends Parasitol.* 23, 93-96.
- Stensvold, C.R., Alfellani, M.A., Norskov-Lauritsen, S., Prip, K., Victory, E.L., Maddox, C., Nielsen, H.V., Clark, C.G., 2009. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int J Parasitol.* 39, 473-479.
- Tan, K.S.W., 2004. *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. *Vet Parasitol.* 126, 121-144.
- Tan, K.S.W., 2008. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev.* 21, 639-665.
- Tan, K.S.W., Mirza, H., Teo, J.D.W., Wu, B., MacAry, P.A., 2010. Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Curr Infect Dis Rep.* 12, 28-35.
- Udonsom, R., Prasertbun, R., Mahittikorn, A., Mori, H., Changbunjong, T., Komalamisra, C., Pintong, A., Sukthana, Y., Popruk, S., 2018. *Blastocystis* infection and subtype distribution in humans, cattle, goats, and pigs in central and western Thailand. *Infect genet Evol.* 65, 107-111.
- Wang, W., Cuttall, L., Bielefeldt-Ohmann, H., Inpankaew, T., Owen, H., Traub, R.J., 2013. Diversity of *Blastocystis* subtypes in dogs in different geographical settings. *Parasit Vectors.* 6, 215.
- Wang, W., Owen, H., Traub, R.J., Cuttall, L., Inpankaew, T., Bielefeldt-Ohmann, H., 2014. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia. *Vet Parasitol.* 203, 264-269.
- Wang, J., Gong, B., Yang, F., Zhang, W., Zheng, Y., Liu, A., 2018. Subtype distribution and genetic characterization of *Blastocystis* in pigs, cattle, sheep and goats in northeastern China's Heilongjiang Province. *Infect Genet Evol.* 57, 171-176.
- Wawrzyniak, I., Poirier, P., Viscogliosi, E., Meloni, D., Texier, C., Delbac, F., El Alaoui, H., 2013. *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther Adv Infect Dis.* 1, 167-178.

- Yan, Y., Su, S., Ye, J., Lai, X., Lai, R., Liao, H., Chen, G., Zhang, R., Hou, Z., Luo, X., 2007. *Blastocystis* sp. subtype 5 : a possibly zoonotic genotype. *Parasitol Res.* 101, 1527-1532.
- Yoshikawa, H., Koyama, Y., Tsuchiya, E., Takami, K., 2016. *Blastocystis* phylogeny among various isolates from humans to insects. *Parasitol Int.* 65, 750-759.
- Zhu, W., Tao, W., Gong, B., Yang, H., Li, Y., Song, M., Lu, Y., Li, W., 2017. First report of *Blastocystis* infections in cattle in China. *Vet Parasitol.* 246, 38-42.

**Table 1**

Prevalence of *Blastocystis* sp. infection and ST distribution in animal and human cohorts in North Lebanon

Infection	Akkar dairy cattle (n = 157)	North dairy cattle (n = 97)	North breeders (n = 40)	North hospital patients <sup>a</sup> (n = 40)
% positive	78.3% (123)	39.2% (38 <sup>b</sup> )	52.5% (21 <sup>c</sup> )	57.5% (23 <sup>d</sup> )
ST1	4	5	5	8
ST2	0	10	7	5
ST3	0	1	12	13
ST5	3	0	0	0
ST7	1	0	0	0
ST10	40	15	0	0
ST14	36	10	0	0
MI <sup>e</sup>	39	8	0	0

<sup>a</sup>Hamidi Medical Centre, Tripoli

<sup>b</sup>Mixed infections by 2 or 3 STs identified in 9 selected samples resulting in the molecular characterisation of a total of 40 isolates

<sup>c</sup>Mixed infections by 2 STs identified in 3 samples resulting in the molecular characterisation of a total of 24 isolates

<sup>d</sup>Mixed infections by 2 STs identified in 3 samples resulting in the molecular characterisation of a total of 26 isolates

<sup>e</sup>MI, Mixed infections with unidentified STs

**Table 2**ST distribution of *Blastocystis* sp. in domestic cattle around the world

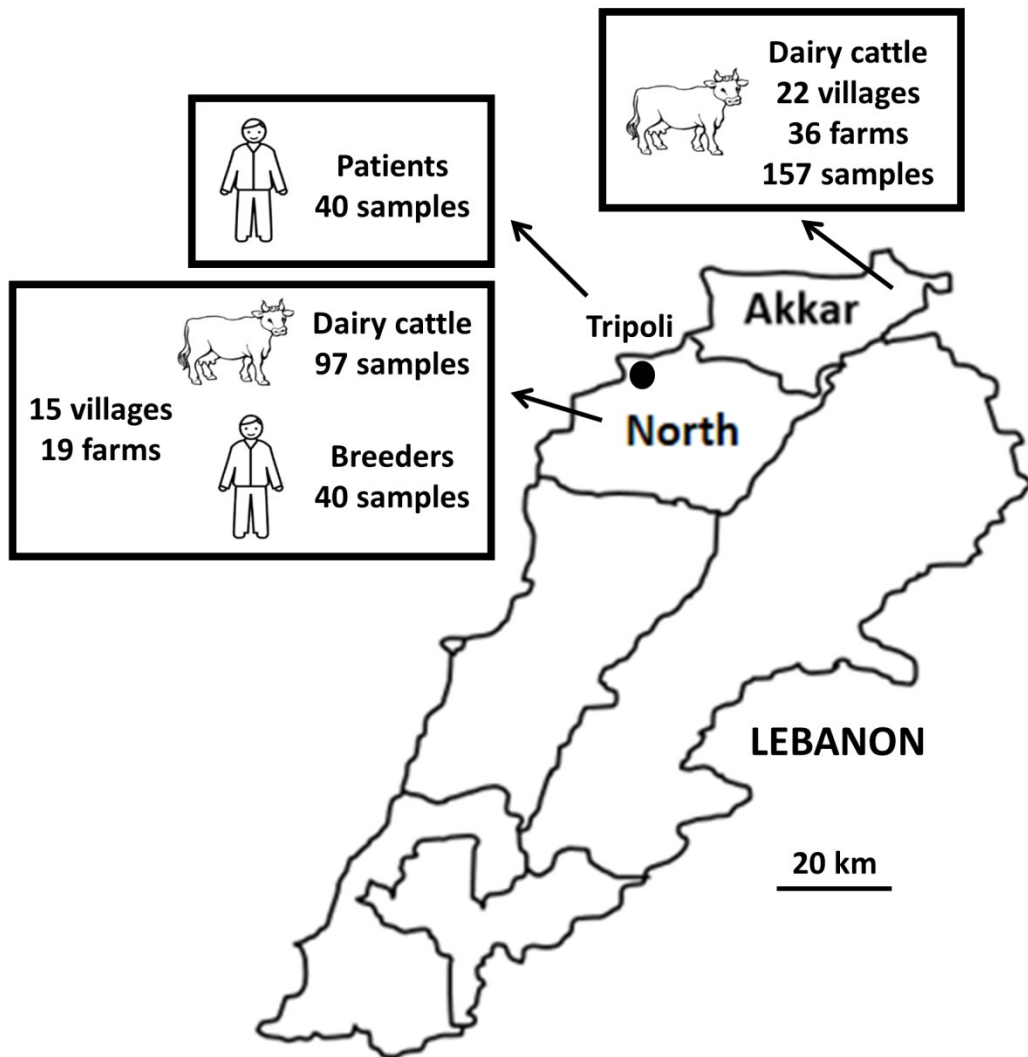
Country	No. of isolates identified by sequencing	<i>Blastocystis</i> sp. STs										Reference
		ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST10	ST12	ST14	
<a href="#">Japan</a>	45	0	0	0	0	0	0	0	1	0	44	<a href="#">Masuda et al., 2018</a>
<a href="#">Japan<sup>a</sup></a>	8	1	0	1	0	6	0	0	0	0	0	<a href="#">Yoshikawa et al., 2004</a>
<a href="#">Japan<sup>a</sup></a>	3	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	<a href="#">Abe et al., 2003</a>
<a href="#">Korea</a>	30	6	0	0	0	5	0	0	9	0	10	<a href="#">Lee et al., 2018</a>
<a href="#">China</a>	14	0	0	2	0	0	0	0	10	0	2	<a href="#">Wang et al., 2018</a>
<a href="#">China</a>	54	0	0	0	2	1	0	0	41	0	10	<a href="#">Zhu et al., 2017</a>
<a href="#">Thailand</a>	6	0	0	0	0	0	0	0	2	4	0	<a href="#">Udonsom et al., 2018</a>
<a href="#">Iran<sup>a</sup></a>	17	0	0	4	0	11	2	0	0	0	0	<a href="#">Badparva et al., 2015</a>
<a href="#">Libya</a>	10	0	0	0	0	2	0	0	6	0	2	<a href="#">Alfellani et al., 2013a</a>
<a href="#">Lebanon</a>	125	9	10	1	0	3	0	1	55	0	46	<a href="#">Present study</a>
<a href="#">UK</a>	5	1	0	0	0	1	0	0	3	0	0	<a href="#">Alfellani et al., 2013a</a>
<a href="#">Colombia</a>	20	12	0	8	0	0	0	0	0	0	0	<a href="#">Ramirez et al., 2014</a>
<a href="#">USA</a>	7	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	<a href="#">Santin et al., 2011</a>
<a href="#">USA</a>	11	0	0	0	0	0	0	0	8	0	3	<a href="#">Fayer et al., 2012</a>
<b>Total</b>	<b>355</b>	<b>30</b>	<b>10</b>	<b>18</b>	<b>2</b>	<b>29</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>142</b>	<b>4</b>	<b>117</b>	

<sup>a</sup>PCR using ST-specific primers allowing the detection of only ST1 to ST7



## Figure captions

**Fig. 1.** Study area in Lebanon and description of the animal and human cohorts screened in this epidemiological survey.



### **III. Prévalence et diversité génétique de *Campylobacter* spp. dans la chaîne de production des poulets de chair au Liban: évaluation de son potentiel zoonotique et de son association avec le protozoaire entérique *Blastocystis* sp.**

Cette étude fait l'objet d'une publication soumise dans la revue « Poultry Science ».

**Greige S**, Rivoal K, Osman M, El Safadi D, Dabboussi F, El Hage R, Viscogliosi E, Hamze M, Chemaly M. Prevalence and genetic diversity of *Campylobacter* spp. in the production chain of broiler chickens in Lebanon and its association with the intestinal protozoan *Blastocystis* sp. *Poultry Science* 2018 soumis.

#### **1. Contribution de l'étudiante à l'étude**

- Collecte des échantillons humains et animaux sur le terrain et des données cliniques des individus
- Management et organisation de la collection d'échantillons
- Réalisation des expériences de biologie moléculaire et analyse des profils bactériens
- Interprétation des données obtenues
- Rédaction de l'article

#### **2. Résumé de l'étude**

*Campylobacter jejuni* est reconnue comme étant l'agent pathogène bactérien d'origine alimentaire le plus communément associé à une gastroentérite humaine (ou campylobactériose) à travers le monde. Les poulets de chair sont fréquemment infectés par la bactérie et sont considérés comme la principale source de transmission à l'Homme. Cependant, malgré son impact majeur en santé publique, aucune donnée récente n'est actuellement disponible au Liban concernant la situation de *Campylobacter* spp. chez les volailles comme dans la population humaine.

Cette étude visait donc à évaluer la prévalence et la diversité génétique de *Campylobacter* spp. dans 227 caeca et sur 227 carcasses de poulets de chair collectés dans des abattoirs libanais. Globalement, à l'aide de méthodes microbiologiques d'isolement et par

PCR multiplex pour l'identification des isolats, la prévalence de *Campylobacter* spp. atteignait 67,0 % dans les caeca et 17,2 % sur les carcasses de volailles libanaises après traitement chimique. Les deux seules espèces de *Campylobacter* identifiées étaient *C. jejuni* et *C. coli*, avec une prévalence légèrement supérieure de *C. coli* dans les caeca et de *C. jejuni* sur les carcasses. Un niveau élevé de diversité génétique a été mis en évidence pour les 51 isolats de *C. jejuni* sélectionnés parmi les poulets de chair libanais puisque 25 profils distincts furent identifiés par la méthode comparative de typage génomique basée sur un sous-ensemble de 40 gènes (ou marqueurs génétiques) et en utilisant un seuil de similarité de 90%. Les profils prédominants observés pour les isolats de volailles libanaises ont également été fréquemment trouvés parmi les cas cliniques humains français, confirmant ainsi que les poulets de chair représentaient un réservoir potentiel pour la campylobactériose humaine au Liban. En outre, une prévalence significativement plus élevée de *Campylobacter* spp. a été observée chez les travailleurs des abattoirs par rapport à celle déterminée dans une cohorte de patients hospitalisés et ne rapportant aucun contact avec des volailles. Cela suggérait que les poulets de chair contaminés dans les abattoirs représentaient une source non négligeable de transmission zoonotique de *Campylobacter* spp. D'autre part, une association significative a été observée entre la présence de *Campylobacter* spp. et celle du protozoaire entérique *Blastocystis* sp. En d'autres termes, cette corrélation suggérait que la présence de *Campylobacter* spp. était favorisée par celle de *Blastocystis* sp. De même, l'absence de l'un de ces deux microorganismes favorisait l'absence de l'autre.

A notre connaissance, cette étude est la première menée à grande échelle sur l'impact de *Campylobacter* spp. chez les poulets de chair au Liban et a confirmé la nécessité de mettre en œuvre des mesures de prévention et de contrôle dans la chaîne de production avicole pour réduire l'impact de la campylobactériose dans la population humaine.

## MICROBIOLOGY AND FOOD SAFETY

### CAMPYLOBACTER INFECTION IN LEBANESE BROILERS

**Prevalence and genetic diversity of *Campylobacter* spp. in the production chain of broiler chickens in Lebanon and its association with the intestinal protozoan *Blastocystis* sp.**

**S. Greige,<sup>\*,†,‡</sup> K. Rivoal,<sup>‡</sup> M. Osman,<sup>†</sup> D. El Safadi,<sup>†</sup> F. Dabboussi,<sup>†</sup> R. El Hage,<sup>#</sup> E. Viscogliosi,<sup>\*</sup> M. Hamze,<sup>†</sup> M. Chemaly,<sup>‡,1</sup>**

<sup>\*</sup>Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR 8204 – CIIL – Centre d’Infection et d’Immunité de Lille, Lille, France

<sup>†</sup>Laboratoire Microbiologie Santé Environnement (LMSE), Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie, Faculté de Santé Publique, Université Libanaise, Tripoli, Liban

<sup>‡</sup>ANSES, Ploufragan-Plouzané Laboratory, Hygiene and Quality of Poultry and Pig Products Unit, Bretagne-Loire University, Ploufragan, France

<sup>#</sup>Institut de Recherche Agronomique Libanais (IRAL), Laboratoire de Microbiologie Alimentaire, Station de Fanar, Jdeideh El-Metn, Lebanon

<sup>1</sup>Corresponding author: Marianne.CHEMALY@anses.fr

ANSES, Laboratoire de Ploufragan - Plouzané, Unité Hygiène et qualité des produits avicoles et porcins, Université Bretagne-Loire, Ploufragan, France

**ABSTRACT** *Campylobacter jejuni* is recognised as the most common foodborne pathogen associated with human gastroenteritis worldwide. Broilers are frequently infected by the bacteria and are considered the main source of exposure to humans. However, despite its public health impact, no recent data is currently available in Lebanon about *Campylobacter* spp. in poultry and human populations. Therefore, this study aimed to evaluate the prevalence and genetic diversity of *Campylobacter* spp. in 227 caeca and on 227 carcasses of broiler chickens collected in Lebanese slaughterhouses. Overall, the prevalence of *Campylobacter* was shown to reach 67.0% in caeca and 17.2% on carcasses of Lebanese poultry. The only two *Campylobacter* species identified were *C. jejuni* and *C. coli*, with a slightly higher prevalence of *C. coli* in caeca and of *C. jejuni* on carcasses. A high level of genetic diversity was reported among the 51 *C. jejuni* isolates selected, since 25 distinct profiles were identified according to the comparative genomic fingerprinting typing method based on a subset of 40 genes using the 90% similarity threshold. Predominant clusters observed in Lebanese poultry isolates were also frequently found among French human clinical cases, highlighting that broiler chickens represent a potential reservoir for human campylobacteriosis. In addition, a significantly higher prevalence of *Campylobacter* spp. was found in slaughterhouse workers than in a cohort of hospitalised patients with no contact with poultry, confirming that contaminated broiler chickens in slaughterhouse appeared to be a non-negligible source of *Campylobacter* spp. transmission. Interestingly, a significant association between *Campylobacter* spp. and *Blastocystis* sp. has been observed. This correlation suggested that the presence of *Campylobacter* spp. would be favoured when *Blastocystis* sp. is present and, similarly, the absence of one would favour the absence of the other. This is the first large-scale investigation focusing on the impact of *Campylobacter* spp. in broiler chickens in Lebanon and confirmed the need to implement prevention and control measures in the poultry production to reduce the burden of campylobacteriosis in the human population.

**Key words:** *Campylobacter*, *Blastocystis*, foodborne pathogens, genetic diversity, comparative genomic fingerprinting, zoonosis, poultry

## INTRODUCTION

*Campylobacter* species are the most commonly reported gastrointestinal bacterial pathogens in humans worldwide (FAO/WHO, 2009) that cause an enteric foodborne zoonotic disease called campylobacteriosis. In the European Union (EU), this disease ranks first in terms of prevalence, exceeding the total number of human zoonoses caused respectively by

*Salmonella*, *Yersinia*, and *Escherichia coli* (EFSA et ECDC, 2017). Campylobacteriosis induces a self-limiting gastroenteritis that generally resolves within two to three weeks, but may lead to severe post-infectious sequelae such as Guillain-Barré syndrome and reactive arthritis (Mortensen et al., 2009; Jackson et al., 2014). *Campylobacter* spp. are regarded as common inhabitants of the intestinal tract of many domestic and wild birds, as well as warm-blooded animals such as cattle and pigs, in which these bacteria seem to establish a commensal relationship. Humans become infected either directly by animal contact or indirectly through handling and ingestion of contaminated food products derived from these animals such as undercooked chicken and pork, improperly cooked beef and raw milk or untreated drinking water (Lévesque et al., 2008; Mossong et al., 2016). Several avian species are considered the main reservoirs of *Campylobacter* spp., in particular broiler chickens intended for human consumption. Indeed, these bacteria can grow at the higher body temperature of birds, i.e. 42°C. In addition, infected poultry are asymptomatic and shed the bacteria in their faeces, thereby facilitating transmission of *Campylobacter* spp. (Sarp et al., 2016; Garcia-Sanchez et al., 2017; Pergola et al., 2017).

Human campylobacteriosis is mainly caused by the two species, *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) and *C. coli*, which are responsible for around 90% of all cases diagnosed in the EU. More than 200,000 confirmed cases of campylobacteriosis were reported in 2016, with chickens being the main reservoir of transmission according to the European Food Safety Authority (EFSA and ECDC, 2017). According to a baseline study conducted in Europe in 2008, the prevalence of *Campylobacter* spp. was globally shown to reach 71.2% and 75.8% in live broiler chickens and broiler carcasses respectively (EFSA, 2010). Moreover, the prevalence within member states ranged from 2.0% to 100% for caecal contents and from 4.9% to 100% for carcasses. In Middle Eastern countries, a large-scale study reported that 57% and 100% of poultry slaughterhouses were contaminated by *Campylobacter* spp. in Bahrain and Saudi Arabia respectively, with *C. jejuni* being the major species identified in both surveys (Senok and Botta, 2009). Moreover, 48% of chickens supplied to supermarkets by Saudi (53%) and Qatari (45.9%) producers were found to be infected with *Campylobacter* spp. (Abu-Madi et al., 2016). In Lebanon, very little data is currently available regarding the burden of *Campylobacter* spp. in human and broiler chicken populations. The few smaller-scale studies conducted in this country showed low (0.7% and 2.5%) (Talhouk et al., 1998; Bechara et al., 2016) to moderate (11.1%) (Dabboussi et al., 2012) prevalence of *Campylobacter* spp. among diarrhoeic patients, with a relative predominance of *C. jejuni*. Moreover, 100% of faecal and cloacal swabs collected from a poultry farm as well as 50% of

breast swabs obtained from the corresponding slaughterhouse were shown to be contaminated by either *C. jejuni* or *C. coli* or both species (Hajj Semaan et al., 2014). In addition, 22.7% of caeca collected from meat chicken breeder farms and 9.7% of raw chicken carcasses obtained from shops in Lebanon were also positive for the bacteria, with predominance of *C. coli* (Talhok et al., 1998).

In addition to *Campylobacter* spp. and other pathogenic bacterial species, cosmopolitan enteric protozoans such as *Blastocystis* sp. also frequently colonise humans (Clark et al., 2013; Stensvold and Clark, 2016) and a wide range of animals, including birds (Cian et al., 2017). In Lebanon, the infection rate exceeds 50% in various human cohorts (Osman et al., 2016; Greige et al., 2018) and 30% of poultry samples collected from slaughterhouses (Greige et al., 2018). The zoonotic transmission of *Blastocystis* sp. was confirmed through repeated and direct contact between chickens and their handlers (Greige et al., 2018). Although the pathogenicity of this parasite is still uncertain, mainly because of its significant asymptomatic carriage (Andersen and Stensvold, 2016), infection with *Blastocystis* sp. is associated with various digestive disorders and urticaria (Tan, 2010; Lepczynska et al., 2015). Interestingly, a direct association between the presence of this parasite and variations in the composition of bacterial communities in the gut was recently demonstrated (Andersen et al., 2015; Audebert et al., 2016; Forsell et al., 2017; Nieves-Ramirez et al., 2018), suggesting that *Blastocystis* sp. plays a major role, at least within the human microbiome.

The aims of this study were thus to estimate the prevalence of *Campylobacter* spp. in the caeca and on carcasses of farmed broiler chickens collected in Lebanese slaughterhouses, to identify the main species isolated from positive samples and analyse the genetic diversity of *C. jejuni* isolates. In addition, the genetic profiles obtained herein were compared to those of French poultry and human clinical isolates (Thépault et al., 2018a) to clarify the impact of broiler chickens in the zoonotic transmission of *Campylobacter* spp. in Lebanon. Finally, the possible association between *Campylobacter* spp. and *Blastocystis* sp. in broiler chickens was evaluated, since this protozoan was already reported with high prevalence in the same collection of poultry caeca samples screened herein (Greige et al., 2018).

## MATERIALS AND METHODS

### ***Ethics Statement***

The study was approved by the research ethics committee “Comité Interne d’Ethique de la Recherche Médicale (CIER) du Groupement des Hôpitaux de l’Institut Catholique de Lille (GHICL)” (France) with reference number 2016-04-02. Oral and written informed

consents were obtained from all subjects included in this study after a clear explanation of the research objectives prior to enrolment. The subject data was collected anonymously (with encryption of the identity of individuals). This study was conducted in accordance with the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki). All chicken samples were collected after slaughter under the supervision of slaughterhouses staff. No approval from the Institutional Animal Care and Use Committee or ethics committee was necessary, as no experiments involving live chickens were performed.

### ***Study Sites***

The study was conducted throughout 2016 at three of the biggest poultry slaughterhouses in Lebanon. The first is located in the governorate of North Lebanon, while the other two slaughterhouses are in the governorate of Mount Lebanon. All chickens included in this study belonged to the subspecies *Gallus gallus domesticus* and were aged from 29 to 47 days at the time of slaughter. The animals were raised on a total of 74 farms located near the corresponding slaughterhouses. The clinical epidemiological survey was conducted at Hamidi Medical Centre in Tripoli.

### ***Poultry Sample Collection***

A total of 227 caecal and 227 neck skin samples were collected from the three slaughterhouses supplied by the 74 farms, each of which corresponded to one batch. For each farm, 5 caeca from 5 randomly selected chickens from the same batch were collected separately by the slaughterhouse staff in the evisceration area. Each caecum was recovered in a sterile bag, respecting the conditions of asepsis and hygiene. The lower end of each of the 5 caeca collected was cut using a pair of sterile tweezers and its contents were recovered into a sterile cup and pooled for further processing of what was considered a single sample. In parallel, 5 neck skins of eviscerated and chilled carcasses were collected from 5 other randomly selected chickens of the same batch under aseptic conditions after chemical treatment with either chlorine or peracetic acid (**PAA**) depending on the slaughterhouse, then recovered in a sterile bag. For each of the farms, 1 to 4 samples (maximum one sample per season) were collected throughout the year. All samples were stored in isothermal containers with ice and transported as quickly as possible to the LMSE of the AZM Centre in Tripoli.

### ***Human Sample Collection***



With the aim of evaluating the zoonotic potential of *Campylobacter* spp. isolates identified in poultry, human stool samples were obtained during the same period from 50 individuals in contact with broiler chickens due to working in the slaughterhouses and thus classified as “exposed” to the bacteria. In parallel, a second cohort included 50 volunteering patients classified as “non-exposed” because they reported no contact with poultry and were followed up for different pathologies at Hamidi Medical Centre in Tripoli.

### ***Sample Microbiological Analysis***

The detection of *Campylobacter* spp. in caecal and neck skin samples was performed one day after specimen collection according to the ISO 10272-1 standard procedure (ISO, 2006). Briefly, *Campylobacter* species were isolated from caecal samples by direct plating of pooled intestinal content onto the solid modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar (**mCCDA**) selective medium (Scharlau Chemicals, Barcelona, Spain). The agar plates were incubated under microaerophilic conditions at 42°C for 72 h. All neck skin samples were swabbed using the same sterile cotton-tipped swab stick and then plated directly onto mCCDA agar plate. In parallel, 5 neck skin samples from the same batch were also minced with sterile scissors, pooled and added to 25 ml of Bolton broth (Scharlau Chemicals, Barcelona, Spain) in a sterile container for pre-enrichment at 37°C for 4 to 6 h, followed by enrichment for 48 h at 42°C. After incubation, the broth was streaked on a mCCDA agar plate under microaerophilic conditions at 42°C for 48 h. All agar plates were subsequently examined for the presence of typical colonies of *Campylobacter* spp. For each positive sample, one colony per plate was selected, subcultured on blood agar (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and incubated for 48 h at 42°C. Following incubation, one colony per plate was used to perform standard Gram staining and microscopic examination. Colonies consisting of curved or spiral motile Gram-negative bacilli presumed to be *Campylobacter* spp. were finally subcultured on blood agar.

### ***Identification of Campylobacter spp. by Multiplex-Polymerase Chain Reaction***

Genomic DNA was isolated from 1-day colony subcultured bacteria grown on blood agar using the boiling method. Briefly, cell lysates were prepared by suspending two or three bacterial colonies from the same positive sample in 300 µl of sterile distilled water in a microcentrifuge tube placed in boiling water for 5 min before being centrifuged at 13,000 rpm for 10 min. Then, 100 µl of the supernatant was transferred to a new sterile tube and stored at -20°C for further analysis. Genomic DNA was quantified using a NanoDrop ND-1000

spectrophotometer (Thermo Scientific, Gometz le Châtel, France). Multiplex PCR (**m-PCR**) amplification of 20 to 100 ng genomic DNA with the two primer pairs MDmapA1 / MDmapA2 and COL3 / MDCOL2 was performed for the simultaneous identification of *C. jejuni* and *C. coli* respectively. The sequence primers and m-PCR conditions were previously described by Denis et al. (1999). The first primer pair targets the *mapA* gene of *C. jejuni* encoding an outer membrane lipoprotein, while the second allows the amplification of the *ceuE* gene of *C. coli* encoding a protein involved in siderophore transport. Positive (DNA obtained from *C. coli* ATCC 33559 and *C. jejuni* ATCC BAA-1062) and negative (DNA matrix replaced by water) m-PCR controls were performed.

### ***Comparative Genomic Fingerprinting Typing of C. jejuni Isolates***

Of the 79 *C. jejuni* isolates identified in this study, 51 (65%) were randomly selected for subtyping using the Comparative Genomic Fingerprinting typing method based on a subset of 40 genes (**CGF40**) as developed by Taboada et al. (2012). The selected isolates were almost equally distributed between caecum (26) and neck skin (25) samples. To generate a CGF40 fingerprint for each selected *C. jejuni* isolate, eight 5-plex PCRs were performed using forty primer sets following PCR conditions detailed previously (Thépault et al., 2018a). The CGF40 fingerprints were then visualised using a standard gel electrophoresis containing 2% of agarose stained with GelRed (Interchim, Montluçon, France) according to the manufacturer's recommended procedures. The reference *C. jejuni* strain NCTC11168 was used as positive control in all assays, since it exhibits the 40 targeted markers in its genome. The PCR results were converted to binary values, with 0 representing the absence of the marker gene and 1 indicating its presence in the bacterial genome, resulting in a 40-digit binary profile for each isolate. The isolate profiles were stored in BioNumerics software (v7.6, Applied Maths, Sint Martens-Latem, Belgium). A dendrogram was thus built using the simple matching distance and unweighted-pair group method using average linkages (**UPGMA**) of clustering in BioNumerics, with 90%, 95% and 100% fingerprinting similarity (CGF40-90%, CGF40-95% and CGF40-100% clusters respectively) to analyse the population structure of isolates (Taboada et al., 2012). CGF40-90% clusters including at least 4% of the isolates of the broiler chickens population were defined as predominant in the population. For comparison purposes, a selection of CGF40-90% profiles from 471 isolates of *C. jejuni* (Thépault et al., 2018a) collected in France during the EU baseline investigation and representative of the national broiler production (Hue et al., 2011) were used, as well as those of two collections of 143 and 371 *C. jejuni* clinical isolates originating from human cases of

campylobacteriosis reported in France in 2009 and 2015 respectively (Thépault et al., 2018b).

### ***Statistical Analysis***

The online tool “Comparing Partitions” from the website <http://www.comparingpartitions.info> (Cariço et al., 2006) was used to determine the discriminatory power of each CGF40 fingerprint using Simpson’s diversity index (**Simpson’s ID**) (Taboada et al., 2012). This index indicates the probability of two strains sampled randomly from a population belonging to two different types. The seasonal variation of the prevalence of *Campylobacter* spp., the comparison of human cohorts and the association between *Campylobacter* spp. and *Blastocystis* sp. were assessed using the chi-square test. The general significance level was set at a *p* value of below 0.05.

## **RESULTS**

### ***Prevalence and identification of Campylobacter spp. in poultry samples***

Of the 227 samples of chicken caeca screened herein from 74 farms, 152 were found to be positive for *Campylobacter* spp., which corresponded to a prevalence of 67.0% (Table 1). Of the positive specimens, 67 (44.1%) corresponded to single infections by *C. coli* and 60 (39.5%) by *C. jejuni*, while the remaining 25 (16.4%) were identified as co-infections by both *Campylobacter* species. Although bacterial infection was detected during the whole year, significant seasonal variation in prevalence of *Campylobacter* spp. was observed among caeca samples, since the bacteria were more prevalent in autumn (31.6%) and summer (28.9%) than in winter (23.7%) and spring (15.8%) (chi-square test, *p* = 0.012). Of the 227 neck skin samples of broiler carcasses collected after evisceration and treatment with either chlorine or PAA, 17.2% (39/227) were positive for *Campylobacter* spp. Of the positive specimens, 19 (48.7%) corresponded to single infections by *C. jejuni*, 17 (43.6%) by *C. coli* and 3 (7.7%) to co-infections by both *Campylobacter* species (Table 1). By merging all these data regarding single infections, a total of 79 *C. jejuni* and 84 *C. coli* isolates were identified among all the animal samples screened in this study. Moreover, a farm was considered positive for *Campylobacter* spp. if at least one broiler sample was positive either for caecum or neck skin specimens. Therefore, about 92% (68/74) of the farms analysed herein were contaminated with *Campylobacter* spp., with slight predominance of single infections by *C. coli* (51.5% vs. 48.5% for single infections by *C. jejuni*) (Table 1).

### ***Prevalence of Campylobacter spp. in human cohorts***

Single stool specimens were collected from a total of 100 individuals divided into two groups. The first group of 50 individuals was considered to be exposed to potential contamination by *Campylobacter* spp. by including only slaughterhouse staff members reporting direct and repeated contact with broiler chickens. Six of these 50 individuals (12.0%) were shown to be infected with *Campylobacter* spp. Single infections with *C. coli* were identified in four of the positive individuals, while the two remaining positive staff members exhibited mixed infection with *C. coli* and *C. jejuni*. Interestingly, no cases of *Campylobacter* spp. infection were found in the control group consisting of 50 individuals hospitalised at Hamidi Medical Centre in Tripoli for various pathologies and reporting no contact with poultry. The difference in *Campylobacter* spp. infection between the exposed and control groups was statistically significant (chi-square test,  $p = 0.012$ ), confirming that exposure to poultry represents a source of human contamination. Unfortunately, typing of human isolates was not performed due to the absence of single infection with *C. jejuni*.

#### ***CGF40 Typing of Lebanese C. jejuni Broiler Isolates and Comparison with French Poultry and Human Isolates***

CGF40 fingerprints were generated for 51 selected *C. jejuni* isolates among the 79 identified in this study and obtained from caecum and neck skin samples of Lebanese broiler chickens. These 51 isolates were clustered into 36, 32 and 25 profiles revealed by the CGF40-100%, CGF40-95% and CGF40-90% analysis respectively (Table 2). The corresponding Simpson's ID was 0.976 using both the 95% and 100% similarity thresholds and 0.958 using the 90% similarity threshold (Table 2). The level of genetic diversity observed through the CGF40-90% analysis (25 genotypes and Simpson's ID = 0.958) was considered to have an acceptable balance allowing both high discriminatory power and identification of clades with genetically similar isolates (Thépault et al., 2018a). According to this level, six *C. jejuni* isolates belonged to cluster 13 (11.7%), five to clusters 1 and 30 (9.8% each), four to cluster 38 (7.7%), three to clusters 3 and 11 (5.8% each), and two to clusters 6, 9, 18, 19, 21, and 22 (3.9% each) (Figure 1). Each of the remaining thirteen *C. jejuni* isolates presented a unique profile (2% each). Six of all these clusters (13, 1, 30, 38, 3 and 11) included at least 4% of the *C. jejuni* isolates and were thus defined as predominant in the Lebanese broiler population. Together, these six clusters accounted for 51.0% (26/51) of the isolates.

These profiles were first compared to those previously obtained from 471 poultry isolates in France, leading to the identification of 70 clusters considering a 90% similarity threshold. Cluster 13 was predominant and represented 11.8% of the Lebanese *C. jejuni*

isolates, but only 1.5% of the French isolates (Figure 2). Two other clusters (30 and 38) represented 9.8% and 7.8% of the Lebanese poultry isolates respectively, and were not found in the French broiler collection. Cluster 1\*, which represented 5.9% of the Lebanese *C. jejuni* isolates, was predominant among the French broiler isolates (11%). To complete these data, cluster 3 included 5.9% and 0.6% of the Lebanese and French poultry isolates respectively.

Because of the absence of single infection with *C. jejuni* among slaughterhouse staff members and, more generally, the lack of surveillance programme for campylobacteriosis in the Lebanese population, the profiles obtained from the 51 *C. jejuni* isolates of Lebanese broiler chickens were compared to those identified from a total of 514 *C. jejuni* clinical isolates originating from human cases of campylobacteriosis in France. CGF40–90% analysis revealed 110 distinct profiles among a total of 565 *C. jejuni* isolates, divided into six predominant clusters (13, 30, 38, 72, 3, and 57) accounting for 47% (24/51) of the Lebanese broiler isolates (Figure 3). Of the Lebanese poultry isolates, cluster 13 was the predominant profile (11.8%) followed by the clusters 30 (9.8%), 38 (7.8%), 72, 3, and 57 (5.9% each). Interestingly, the profile 72 that was found to be predominant among French human isolates (12.8%), was also identified in 5.9% of Lebanese poultry isolates. Similarly, profiles 13, 38 and 57 were also shown to be shared by various proportions of both Lebanese poultry and French human isolates. In contrast, clusters 30 and 3 grouping a significant number of Lebanese poultry isolates were not identified among the French human isolates.

### ***Assessment of the Association between Campylobacter spp. and Blastocystis sp. Infection in Lebanese Broiler Chickens***

Previously, 223 of the 227 caecum samples from broiler chickens screened herein for the presence of *Campylobacter* spp. were analysed to determine the infection rate of the parasitic protozoan *Blastocystis* sp. (Greige et al., 2018). The remaining 4 caecum specimens collected in this study were rapidly tested for the presence of *Blastocystis* sp. by real-time quantitative PCR (Poirier et al., 2011) and were found to be negative. The potential association between the two micro-organisms was thus assessed through the results of the analysis of these 227 samples. Of these, 55 were co-infected by *Campylobacter* spp. and *Blastocystis* sp., 59 were negative for both micro-organisms, 16 were positive only for *Blastocystis* sp. and 97 were positive only for *Campylobacter* spp. (Table 3). A statistically significant difference (chi-square test,  $p = 0.023$ ) was obtained between the observed number of cases of infection by each of these two micro-organisms and the theoretically expected number in the absence of association of *Blastocystis* sp. and *Campylobacter* spp. According to

our data, the presence of *Campylobacter* spp. would be associated with the presence of *Blastocystis* sp. and, similarly, the absence of *Campylobacter* spp. would be associated with the absence of *Blastocystis* sp.

## DISCUSSION

This study focused on broiler chickens because they represent the largest poultry market sector in Lebanon and are considered a major source of human campylobacteriosis (EFSA and ECDC, 2016; Silva et al., 2011; Thépault et al., 2017; 2018b). One of the main objectives of this survey was to assess the rate of contamination of Lebanese broiler chickens by *Campylobacter* spp. at the farm and slaughterhouse levels. Strikingly, these bacteria were detected in 92% of sampled poultry farms and with higher prevalence in autumn and summer than in winter and spring. This high prevalence of *Campylobacter* spp. in broiler flocks has already been described, for instance in France as in other European countries (EFSA 2010; Hue et al., 2010; Allain et al., 2014). Moreover, the seasonal variation in prevalence of the bacteria observed here was probably due to various factors, including temperature and environmental reservoirs of contamination, such as flies, insects, rodents, birds, in the summer and early autumn period (EFSA and ECDC, 2016; Ellis-Iversen et al., 2009; Huneau-Salaün et al., 2007; Jorgensen et al., 2011). Within the farms, the prevalence of *C. coli* was slightly higher than that of *C. jejuni*, while conversely *C. jejuni* was slightly predominant in slaughterhouses. Another smaller-scale survey conducted in Lebanon reported predominance of *C. coli* in caecum and on carcass samples (Talhok et al., 1998) while, on the contrary, a second study aiming to assess the infection rate of domestic broiler chickens by *Campylobacter* spp. on farms and throughout the slaughtering process in the same geographical region reported predominance of *C. jejuni* (Hajj Semaan et al., 2014). While *C. jejuni* is generally predominant in poultry worldwide (EFSA 2010, Hue et al., 2011; Allain et al., 2014; García-Sánchez et al., 2017), the predominance of *C. coli* in Lebanese poultry farms was, however, in agreement with various surveys conducted in European countries including Bulgaria, Hungary, Italy, Luxembourg, Malta, Portugal, Ireland, Spain and Greece (EFSA 2010; Marinou et al., 2012; Nobile et al., 2013; Sahin et al., 2015; Mezher et al., 2016; Pergola et al., 2017). Since all except Luxembourg and Ireland represent southern European countries, most of which surround the Mediterranean Sea, the predominance of *C. coli* on poultry farms could be associated with the geographical area. Regarding Lebanese broiler carcasses contaminated with *Campylobacter* spp., our results indicating lower prevalence on carcass than in caecum samples were roughly similar to those observed in Cyprus and Sweden

(EFSA, 2010). Moreover, lower prevalence of *Campylobacter* spp. was observed on skin samples in Lebanon in comparison to those reported in studies conducted in German, Croatian and French slaughterhouses (EFSA, 2010; Hue et al., 2010; Hue et al., 2011; EFSA and ECDC, 2015; Alpigliani et al., 2017). This could be explained by the absence of decontamination in these European countries associated with regulations prohibiting the use of chemical decontaminants on broiler carcasses. However, the decontamination process using chlorine or PAA performed in Lebanese slaughterhouses was clearly not sufficiently effective, since 17% of carcasses remained positive for the bacteria at the end of the slaughter chain in this study.

A comprehensive molecular characterisation of *C. jejuni* isolated from Lebanese poultry on farms and during the slaughtering process was performed. Briefly, the majority of Lebanese broiler isolates were distributed into 6 profiles, most of which were present in the French broiler production, indicating a weak association between the genetic profile and the geographical origin of the bacteria as previously suggested by Thépault et al. (2017). Interestingly, most of these profiles were also identified in French human cases of campylobacteriosis, highlighting the potential zoonotic risk of transmission to the Lebanese population. Thus, these results confirmed the high genetic diversity of *C. jejuni* and the importance of poultry as a source of contamination for humans (Strachan et al., 2012; Thépault et al., 2017, 2018a,b). Although only 51 *C. jejuni* isolates were subtyped, profile 30 was identified as potentially specific to Lebanese broiler production, since it was reported neither in French avian nor in French human isolates. In addition to foodborne exposure, work-related exposure to *Campylobacter* spp. may also represent a major source of infection (Castillo Neyra et al., 2012). Interestingly, 12% of Lebanese slaughterhouse workers were contaminated by the bacteria, while all non-directly exposed individuals were negative for *Campylobacter* spp. Our findings provided evidence that humans working with poultry may be at increased risk of exposure to *Campylobacter* spp., as previously suggested (Vegosen et al., 2015). Two studies conducted in Sweden and the USA reinforced this statement, since 25% of Swedish poultry abattoir workers (Ellström et al., 2014; de Perio et al., 2013) and 83% of workers for less than a month in American slaughterhouses were positive for *Campylobacter* spp. (de Perio et al., 2013).

Finally, a relatively large proportion (24.2%) of caecum samples from Lebanese poultry were co-infected by the eukaryotic single-celled *Blastocystis* sp. and *Campylobacter* spp. Interestingly, this protozoan was previously identified as a co-pathogen with *Campylobacter* spp. in a patient hospitalised with gastroenteritis (Jansen et al., 2008).

Moreover, in the context of two described outbreaks of the apicomplexan protozoa *Cryptosporidium* occurring in the United Kingdom, a few individuals were also shown to be infected concurrently with *Campylobacter* spp. (Casemore et al., 1986; Duke et al., 1996). Recent studies conducted in humans have described bacterial microbiota changes associated with *Blastocystis* sp. colonisation, with mainly an increase in bacterial alpha diversity (Scanlan et al., 2014; Audebert et al., 2016; Nieves-Ramirez et al., 2018). It was postulated that *Blastocystis* sp. may exert a predatory effect on intestinal bacteria of highly abundant taxa (Chabé et al., 2017; Nieves-Ramirez et al., 2018). Consequently, this predation may decrease competition for nutrients and space, thus leading to an increase in bacterial richness. Although no data is currently available regarding the impact of *Blastocystis* sp. on the bacterial intestinal microbiota of chickens, this latter observation could therefore explain, at least partly, the infection rate of *Campylobacter* spp. in *Blastocystis* sp.-colonised animals by favouring the colonisation of the host by the bacteria. In addition, *Blastocystis* sp. is also known to have immunomodulatory properties (Ajjampur and Tan, 2016). In particular, the parasite produces cysteine proteases which are able to degrade human secretory immunoglobulin A (Puthia et al., 2005). Since IgA play a crucial role in regulation of host-bacteria interactions in the gut, the supposed immunomodulatory effect of the parasite in infected chickens could also facilitate colonisation by other enteric pathogens such as *Campylobacter* spp. Future studies focusing on *Blastocystis*-colonised broiler chickens are necessary to test all these hypotheses.

In conclusion, this study highlighted the high prevalence and genetic diversity of *Campylobacter* spp. in Lebanese poultry production and strongly suggested that broiler chickens represented a significant reservoir for human campylobacteriosis. In particular, their in-contact workers in poultry slaughterhouses exhibited a higher risk of infection by the bacteria through zoonotic transmission. Consequently, a surveillance programme is needed in Lebanon, together with effective measures in terms of hygiene practices with the aim of controlling the burden of *Campylobacter* spp. in both animal and human populations.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Programme Orientations Stratégiques from the University of Lille 2, the Partenariat Hubert Curien (PHC) France Lebanon CEDRE 2015 Project no. 32684NM from the Ministère des Affaires Etrangères et du Développement International and the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut Pasteur of Lille, the



Lebanese University and the Catholic University of Lille. SG was supported by a Ph.D. fellowship from the Azm & Saade Association of Lebanon. *The authors would like to thank all those who participated in the study from the HQPAP Unit of Anses, Hamidi Medical Centre of Tripoli and the three poultry slaughterhouses for their assistance in sample collection and processing.*

## REFERENCES

- Abu-Madi, M., J. M. Behnke, A. Sharma, R. Bearden, and N. Al-Banna. 2016. Prevalence of virulence/stress genes in *Campylobacter jejuni* from chicken meat sold in Qatari retail outlets. PLoS One 11:e0156938.
- Ajjampur, S. S. R., and K. S. W. Tan. 2016. Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. – Interpreting results from *in vitro* and *in vivo* studies. Parasitol. Int. 65:772–779.
- Allain, V., M. Chemaly, M. J. Laisney, S. Rouxel, S. Quesne, and S. Le Bouquin. 2014. Prevalence of and risk factors for *Campylobacter* colonisation in broiler flocks at the end of the rearing period in France. Br. Poult. Sci. 55:452–459.
- Alpigiani, I., J. C. Abrahantes, V. Michel, A. Huneau-Salaün, M. Chemaly, L. J. Keeling, A. Gervelmeyer, C. Bacci, F. Brindani, S. Bonardi, S., and F. Berthe. 2017. Associations between animal welfare indicators and *Campylobacter* spp. in broiler chickens under commercial settings: A case study. Prev. Vet. Med. 147:186–193.
- Andersen, L. O., I. Bonde, H. B. Nielsen, and C. R. Stensvold. 2015. A retrospective metagenomics approach to studying *Blastocystis*. FEMS Microbiol. Ecol. 91:1–9.
- Andersen, L. O., and C. R. Stensvold. 2016. *Blastocystis* in health and disease: are we moving from a clinical to a public health perspective? J. Clin. Microbiol. 54:524–528.
- Audebert, C., G. Even, A. Cian, A., The *Blastocystis* Investigation Group, A. Loywick, S. Merlin, E. Viscogliosi, and M. Chabé. 2016. Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. Sci. Rep. 6:25255.
- Bechara, R., M. Hosny, I. AL-Kassaa, F. Dabboussi, H. Mallat, and M. Hamze. 2016. Detection of pathogenic bacteria in diarrheal stool collected from children in north lebanon by using conventional stool culture and microarray technique « clart® enterobac ». Leb. Sci. J. 17:233-239.
- Carriço, J. A., C. Silva-Costa, J. Melo-Cristino, F. R. Pinto, H. de Lencastre, J. S. Almeida, and M. Ramirez. 2006. Illustration of a common framework for relating multiple typing

- methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*. J. Clin. Microbiol. 44:2524-2532.
- Casemore, D. P., E. G. Jessop, D. Douce, and F. B. Jackson. 1986. *Cryptosporidium* plus *Campylobacter*: an outbreak in a semi-rural population. J. Hyg. (Lond). 96:95–105.
- Castillo Neyra, R., L. Vegosen, M. F. Davis, L. Price, and E. K. Silbergeld. 2012. Antimicrobial-resistant bacteria: an unrecognized work-related risk in food animal production. Saf. Health Work. 3:85–91.
- Chabé, M., A. Lokmer, and L. Ségurel. 2017. Gut protozoa: friends or foes of the human gut microbiota? Trends Parasitol. 33:925–934.
- Cian, A., D. El Safadi, M. Osman, R. Moriniere, N. Gantois, S. Benamrouz-Vanneste, P. Delgado-Viscogliosi, K. Guyot, L. L. Li, S. Monchy, C. Noël, P. Poirier, C. Nourrisson, I. Wawrzyniak, F. Delbac, S. Bosc, M. Chabe, T. Petit, G. Certad, and E. Viscogliosi. 2017. Molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of potential zoonotic risk. PLoS One 12:e0169659.
- Clark, C. G., M. van der Giezen, M. A. Alfellani, and C. R. Stensvold. 2013. Recent developments in *Blastocystis* research. Adv. Parasitol. 82:1–32.
- Dabboussi, F., S. Alam, H. Mallat, S. Hlais, and M. Hamze. 2012. Preliminary study on the prevalence of *Campylobacter* in childhood diarrhoea in North Lebanon. East Mediterr Health J. 18:1225-1228.
- Denis, M., C. Soumet, K. Rivoal, G. Ermel, D. Blivet, G. Salvat, and P. Colin. 1999. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. Lett. Appl. Microbiol. 29:406–410.
- Duke, L. A., A. S. Breathnach, D. R. Jenkins, B. A. Harkis, and A. W. Codd. 1996. A mixed outbreak of *Cryptosporidium* and *Campylobacter* infection associated with a private water supply. Epidemiol. Infect. 116:303–308.
- EFSA. 2010. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008. EFSA J. 8:1503.
- EFSA, and ECDC. 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. EFSA J. 13:3991.
- EFSA, and ECDC. 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. EFSA J. 14:4634.
- EFSA, and ECDC. 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. EFSA J. 15:5077.

- Ellis-Iversen, J., F. Jorgensen, S. Bull, L. Powell, A. J. Cook, and T.J. Humphrey. 2009. Risk factors for *Campylobacter* colonisation during rearing of broiler flocks in Great Britain. *Prev. Vet. Med.* 89:178–184.
- Ellström, P., I. Hansson, C. Söderström, E. O. Engvall, and H. Rautelin. 2014. A prospective follow-up study on transmission of *Campylobacter* from poultry to abattoir workers. *Foodborne Pathog. Dis.* 11:684–688.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). 2009. Risk assessment of *Campylobacter* spp. in broiler chickens: Interpretative Summary. Microbiological Risk Assessment Series No 11. Geneva. 35 pp.
- Forsell, J., J. Bengtsson-Palme, M. Angelin, A. Johansson, B. Evengård, and M. Granlund. 2017. The relation between *Blastocystis* and the intestinal microbiota in Swedish travellers. *BMC Microbiol.* 17:231.
- García-Sánchez, L., B. Melero, I. Jaime, M. L. Hänninen, M. Rossi, and J. Rovira. 2017. *Campylobacter jejuni* survival in a poultry processing plant environment. *Food Microbiol.* 65:185–192.
- Greige, S., D. El Safadi, N. Bécu, N. Gantois, B. Pereira, M. Chabé, S. Benamrouz-Vanneste, G. Certad, R. El Hage, M. Chemaly, M. Hamze, and E. Viscogliosi. 2018. Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. isolates from poultry in Lebanon and evidence of zoonotic potential. *Parasit. Vectors.* 11:389.
- Hajj Semaan, E., H. Dib, R. Mrad, C. Chami, and R. Jalkh. 2014. Dynamic of *Campylobacter* species contamination along a poultry slaughtering chain. *Ital. J. Food Saf.* 3:2246.
- Hue, O., S. Le Bouquin, M. J. Laisney, V. Allain, F. Lalande, I. Petetin, S. Rouxel, S. Quesne, P. Y. Gloaguen, M. Picherot, J. Santolini, S. Gilles, S. Bougeard, and M. Chemaly. 2010. Prevalence of and risk factors for *Campylobacter* spp. contamination of broiler chicken carcasses at the slaughterhouse. *Food Microbiol.* 27:992–999.
- Hue, O., V. Allain, M. J. Laisney, S. Le Bouquin, F. Lalande, I. Petetin, S. Rouxel, S. Quesne, P. Y. Gloaguen, M. Picherot, J. Santolini, S. Bougeard, S. Gilles, and M. Chemaly. 2011. *Campylobacter* contamination of broiler caeca and carcasses at the slaughterhouse and correlation with *Salmonella* contamination. *Food Microbiol.* 28:862–868.
- Huneau-Salaün, A., M. Denis, L. Balaine, and G. Salvat. 2007. Risk factors for *Campylobacter* spp. colonization in French free-range broiler-chicken flocks at the end of the indoor rearing period. *Prev. Vet. Med.* 80:34–48.
- ISO - International Organization for Standardization. 2006. ISO 10272 microbiology of food and animal feeding stuff - horizontal method for detection and enumeration of

*Campylobacter* spp. - Part 1: enrichment method; Part 2: enumeration method. Geneva, Switzerland.

- Jackson, B. R., J. A. Zegarra, H. López-Gatell, J. Sejvar, F. Arzate, S. Waterman, A. S. Núñez, B. López, J. Weiss, R. Q. Cruz, D. Y. Murrieta, R. Luna-Gierke, K. Heiman, A. R. Vieira, C. Fitzgerald, P. Kwan, M. Zarate-Bermudez, D. Talkington, V. R. Hill, and B. Mahon. 2014. Binational outbreak of Guillain–Barré syndrome associated with *Campylobacter jejuni* infection, Mexico and USA, 2011. *Epidemiol. Infect.* 142:1089–1099.
- Jansen, A., K. Stark, J. Kunkel, E. Schreier, R. Ignatius, O. Liesenfeld, D. Werber, U. B. Göbel, M. Zeitz, and T. Schneider. 2008. Aetiology of community-acquired, acute gastroenteritis in hospitalised adults: a prospective cohort study. *BMC Infect. Dis.* 8:143.
- Jorgensen, F., J. Ellis-Iversen, S. Rushton, S. A. Bull, S. A. Harris, S. J. Bryan, A. Gonzalez, and T. J. Humphrey. 2011. Influence of season and geography on *Campylobacter jejuni* and *C. coli* subtypes in housed broiler flocks reared in Great Britain. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:3741–3748.
- Lepczynska, M., W. C. Chen, and E. Dzika. 2015. Mysterious chronic urticarial caused by *Blastocystis* spp.? *Int. J. Dermatol.* 55:259-266.
- Lévesque, S., E. Frost, R. D. Arbeit, and S. Michaud. 2008. Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* isolates from humans, chickens, raw milk, and environmental water in Quebec, Canada. *J. Clin. Microbiol.* 46:3404–3411.
- Marinou, I., S. Bersimis, A. Ioannidis, C. Nicolaou, A. Mitrousia-Ziouva, N. J. Legakis, and S. Chatzipanagiotou. 2012. Identification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from animal sources. *Front. Microbiol.* 3:58.
- Mezher, Z., S. Saccares, R. Marcianò, P. De Santis, E. M. F. Rodas, V. De Angelis, and R. Condoleo. 2016. Occurrence of *Campylobacter* spp. in poultry meat at retail and processing plants' levels in central Italy. *Ital. J. Food Saf.* 5:5495.
- Mortensen, N.P., M. L. Kuijf, C. W. Ang, P. Schiellerup, K. A. Krogfelt, B. C. Jacobs, A. van Belkum, H. P. Endtz, and M.P. Bergman. 2009. Sialylation of *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharides is associated with severe gastro-enteritis and reactive arthritis. *Microbes Infect.* 11:988-994.
- Mossong, J., L. Mughini-Gras, C. Penny, A. Devaux, C. Olinger, S. Losch, H. M. Cauchie, W. van Pelt, and C. Ragimbeau. 2016. Human campylobacteriosis in Luxembourg, 2010-2013: a case-control study combined with Multilocus Sequence Typing for source attribution and risk factor analysis. *Sci. Rep.* 6:20939.

- Nieves-Ramírez, M. E., O. Partida-Rodríguez, I. Laforest-Lapointe, L. A. Reynolds, E. M. Brown, A. Valdez-Salazar, P. Morán-Silva, L. RojasVelázquez, E. Morien, L. W. Parfrey, M. Jin, J. Walter, J. Torres, M. C. Arrieta, C. Ximénez-García, and B. B. Finlay. 2018. Asymptomatic intestinal colonization with protist *Blastocystis* is strongly associated with distinct microbiome ecological patterns. *mSystems* 3:e00007-18.
- Nobile, C. G. A., R. Costantino, A. Bianco, C. Pileggi, and M. Pavia. 2013. Prevalence and pattern of antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. in poultry meat in Southern Italy. *Food Control* 32:715–718.
- Osman, M., D. El Safadi, A. Cian, S. Benamrouz, C. Nourrisson, P. Poirier, B. Pereira, R. Razakandrainibe, A. Pinon, C. Lambert, I. Wawrzyniak, F. Dabboussi, F. Delbac, L. Favennec, M. Hamze, E. Viscogliosi, and G. Certad. 2016. Prevalence and risk factors for intestinal protozoan infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e0004496.
- Pergola, S., M. P. Franciosini, F. Comitini, M. Ciani, S. De Luca, S. Bellucci, L. Menchetti, and P. Casagrande Proietti. 2017. Genetic diversity and antimicrobial resistance profiles of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolated from broiler chicken in farms and at time of slaughter in central Italy. *J. Appl. Microbiol.* 122:1348–1356.
- de Perio, M. A., R. T. Niemeier, S. J. Levine, K. Gruszynski, and J.D. Gibbins. 2013. *Campylobacter* infection in poultry-processing workers, Virginia, USA, 2008–2011. *Emerg. Infect. Dis.* 19:286–288.
- Poirier, P., I. Wawrzyniak, A. Albert, H. El Alaoui, F. Delbac, and V. Livrelli. 2011. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. *J. Clin. Microbiol.* 49:975–983
- Puthia, M. K., A. Vaithilingam, J. Lu, and K. S. W. Tan. 2005. Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. *Parasitol. Res.* 97:386–389.
- Sahin, O., I. I. Kassem, Z. Shen, J. Lin, G. Rajashekara, and Q. Zhang. 2015. *Campylobacter* in poultry: ecology and potential interventions. *Avian Dis.* 59:185–200.
- Scanlan, P. D., C. R. Stensvold, M. Rajilić-Stojanović, H. G. H. J. Heilig, W. M. De Vos, P. W. O’Toole, and P. D. Cotter. 2014. The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiol. Ecol.* 90:326–330.

- Senok, A. C., and G. A. Botta. 2009. *Campylobacter* enteritis in the Arabian Gulf. *J. Infect. Dev. Ctries.* 3:74-82.
- Silva, J., D. Leite, M. Fernandes, C. Mena, P. A. Gibbs, and P. Teixeira. 2011. *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Front. Microbiol.* 2:200.
- Skarp, C. P. A., M. L. Hänninen, and H. I. K. Rautelin. 2016. Campylobacteriosis: the role of poultry meat. *Clin. Microbiol. Infect.* 22:103–109.
- Stensvold, C. R., and C. G. Clark. 2016. Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitol. Int.* 65:763–771.
- Strachan, N. J. C., M. MacRae, A. Thomson, O. Rotariu, I. D. Ogden, and K. J. Forbes. 2012. Source attribution, prevalence and enumeration of *Campylobacter* spp. from retail liver. *Int. J. Food Microbiol.* 153:234–236.
- Taboada, E. N., S. L. Ross, S. K. Mutschall, J. M. MacKinnon, M. J. Roberts, C. J. Buchanan, P. Kruczkiewicz, C. C. Jokinen, J. E. Thomas, J. H. E. Nash, V. P. J. Gannon, B. Marshall, F. Pollari, and C. G. Clark. 2012. Development and validation of a comparative genomic fingerprinting method for high-resolution genotyping of *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 50:788–797.
- Talhok, R., R. El-Dana, G. Araj, E. Barbour, and F. Hashwa. 1998. Prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular characterization of *Campylobacter* isolates recovered from humans and poultry in Lebanon. *J. Med. Leban.* 46:310–316.
- Tan, K., H. Mirza, J. Teo, B. Wu, and P. Macary. 2010. Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 12:28–35.
- Thépault, A., G. Méric, K. Rivoal, B. Pascoe, L. Mageiros, F. Touzain, V. Rose, V. Béven, M. Chemaly, and S. K. Sheppard. 2017. Genome-wide identification of host-segregating epidemiological markers for source attribution in *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 83:e03085–16.
- Thépault, A., M. Guyard-Nicodème, V. Rose, S. Quesne, M. Queguiner, E. Houard, F. Mégraud, K. Rivoal, and M. Chemaly. 2018a. A representative overview of the genetic diversity and lipooligosaccharide sialylation in *Campylobacter jejuni* along the broiler production chain in France and its comparison with human isolates. *Int. J. Food Microbiol.* 274:20–30.
- Thépault, A., V. Rose, S. Quesne, T. Poezevara, V. Béven, E. Hirchaud, F. Touzain, P. Lucas, G. Méric, L. Mageiros, S. K. Sheppard, M. Chemaly, and K. Rivoal. 2018b. Ruminant and chicken: important sources of campylobacteriosis in France despite a variation of source attribution in 2009 and 2015. *Sci. Rep.* 8:9305.

Vegosen, L., P. N. Breysse, J. Agnew, G. C. Gray, I. Nachamkin, K. Sheikh, F. Kamel, and E. Silbergeld. 2015. Occupational exposure to swine, poultry, and cattle and antibody biomarkers of *Campylobacter jejuni* exposure and autoimmune peripheral neuropathy. PLoS One 10:e0143587.

**Table 1.** Prevalence and distribution of *Campylobacter* species in Lebanese broiler chicken samples

Broiler samples	Positive/total	% positive	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	Mixed infections
Caecum	152/227	67.0%	60 (39.5%)	67 (44.1%)	25 (16.4%)
Neck skin	39/227	17.2%	19 (48.7%)	17 (43.6%)	3 (7.7%)

**Table 2.** Comparison of the discriminating power of the three CGF40 analyses generated for 51 selected *C. jejuni* broiler isolates using Simpson's index

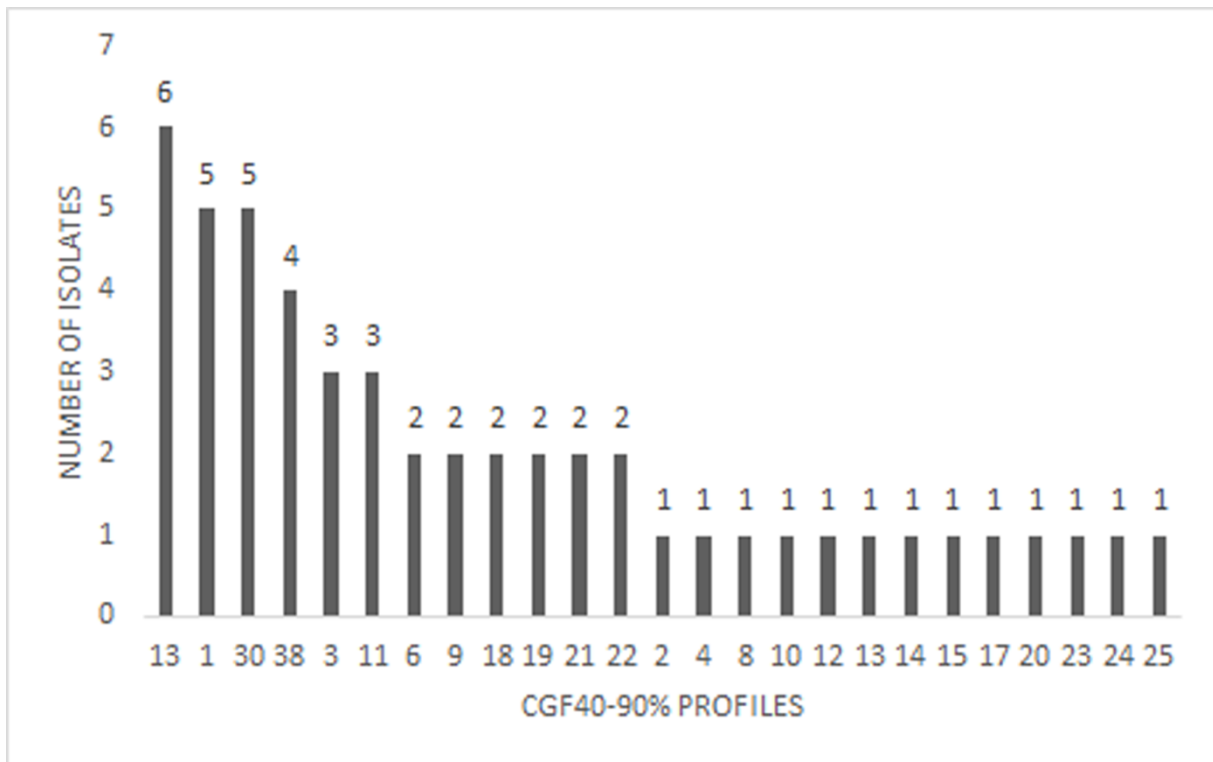
Analysis	No. of profiles	Simpson's ID	CI (95%)
CGF40-90%	25	0.958	(0.939-0.978)
CGF40-95%	32	0.976	(0.961-0.991)
CGF40-100%	36	0.976	(0.966-0.995)

**Table 3.** Comparison of the observed and expected (without association) number of cases of infection by *Blastocystis* sp and *Campylobacter* spp. in caecum samples from Lebanese broiler chickens

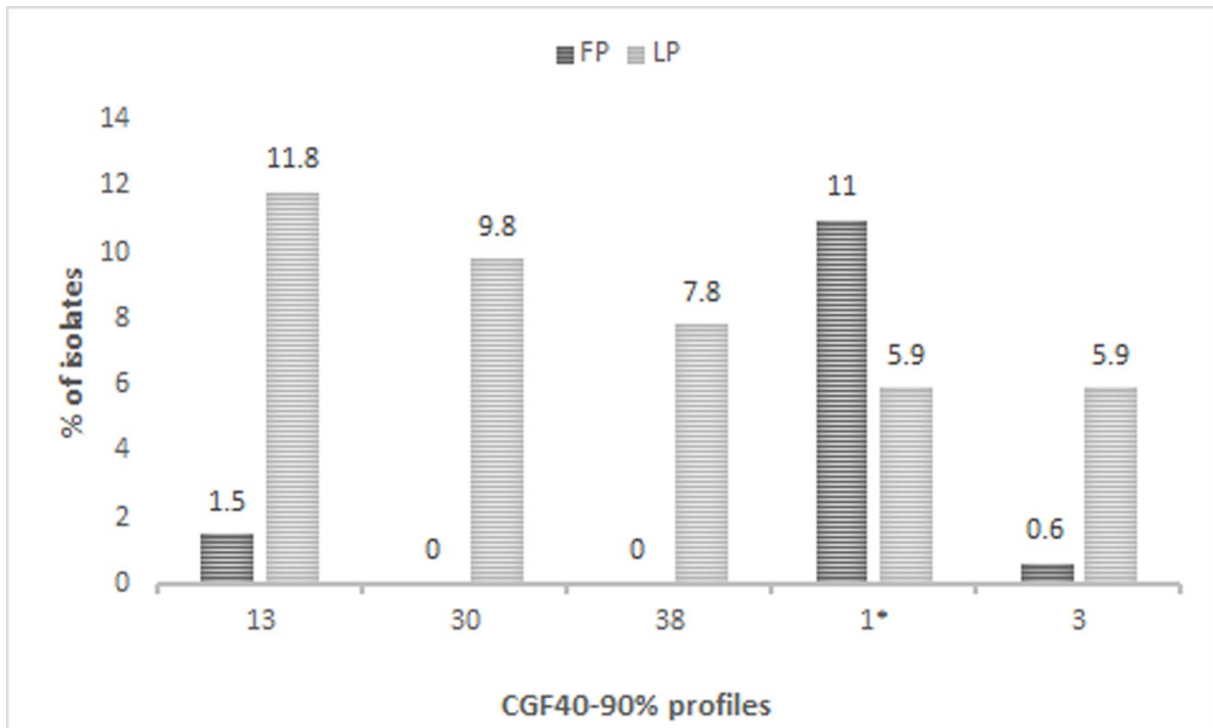
No. of cases of infection	Negative for <i>Blastocystis</i> sp. (observed/expected)	Positive for <i>Blastocystis</i> sp. (observed/expected)	Total
Negative for <i>Campylobacter</i> spp. (observed/expected)	59 (51.5)	16 (23.5)	75
Positive for <i>Campylobacter</i> spp. (observed/expected)	97 (104.5)	55 (47.5)	152
Total	156	71	227



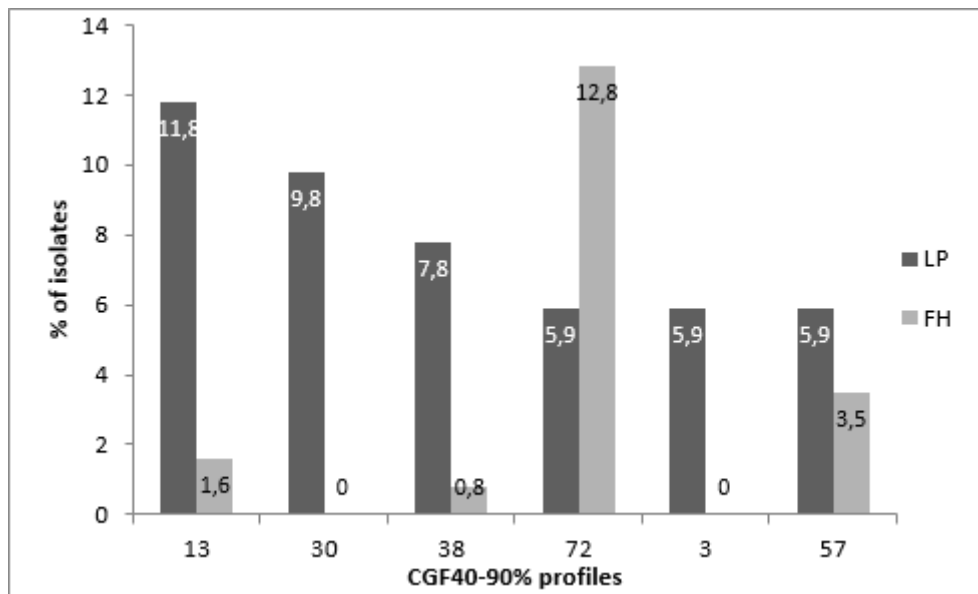
**Figure 1.** Distribution of CGF40-90% profiles within the population of 51 *C. jejuni* isolates from broiler chickens in Lebanon



**Figure 2.** Distribution of the main CGF40-90% profiles within the two groups of *C. jejuni* isolates from Lebanese (LP) and French (FP) broiler chickens



**Figure 3.** Distribution of the main CGF40-90% profiles within the two groups of *C. jejuni* isolates from Lebanese broiler chickens (LP) and French humans (FH)



# *Discussion*

---

## **Prévalence et distribution des sous-types de *Blastocystis* sp. dans la filière poulets de chair au Nord-Liban**

L'étude menée lors de ma thèse concernant l'impact de *Blastocystis* sp. chez les poulets de chair est à notre connaissance la première enquête épidémiologique réalisée au Liban dans la filière avicole. Ce secteur revêt pourtant une importance économique majeure puisque la production de poulets dans ce pays est estimée à plus de 100 millions d'animaux par an. C'est aussi à ce jour la plus large enquête conduite chez les volailles à l'aide d'outils moléculaires à travers le monde. Ainsi, sur les 223 échantillons de volailles collectés et analysés dans trois des principaux abattoirs du Liban, 71 d'entre eux soit près de 32% ont été identifiés comme étant positifs pour *Blastocystis* sp. Si on tenait compte de l'origine de ces échantillons c'est-à-dire des fermes dans lesquelles ont été élevées ces volailles, le parasite était présent dans environ 65% des 74 fermes testées. Ces chiffres de prévalence étaient donc extrêmement élevés et corroboraient ceux publiés précédemment dans d'autres enquêtes menées dans différents pays et obtenus par des méthodes d'identification morphologique et/ou culturale du parasite que l'on sait moins sensibles que la PCR quantitative en temps réel (Poirier et al., 2011 ; El Safadi et al., 2016 ; Osman et al., 2016). Ainsi, la prévalence de *Blastocystis* sp. chez les poulets de chair au Liban était similaire à celle observée chez les poulets domestiques élevés dans des fermes ou des villages ou vendus sur des marchés en Malaisie (Farah Haziqah et al., 2014), en Indonésie (Yoshikawa et al., 2016) ou au Brésil (Bergamo do Bofilm et al., 2013). Par contre, même importante, cette prévalence était cependant nettement inférieure à celle rapportée chez des poulets élevés dans des fermes commerciales en Australie puisque 80 à 95% des animaux étaient infectés par le parasite (Stenzel et al., 1994 ; Lee et Stenzel, 1999). Pour expliquer une telle prévalence, on peut naturellement proposer que la forte densité observée généralement dans les élevages facilite très certainement la transmission féco-orale du parasite entre animaux. D'ailleurs, dans notre étude, un impact saisonnier de la prévalence de *Blastocystis* sp. dans les échantillons de volaille a été montré avec une prévalence plus forte en été en lien probablement avec une consommation accrue durant cette saison d'eau potentiellement contaminée par des matières fécales animales dans les élevages.

Toujours dans le cadre de notre enquête, pas moins de 71 isolats de *Blastocystis* sp. de volailles ont pu être sous-typés. De manière intéressante, tous les isolats aviaires appartenaient soit au ST6 soit au ST7 avec cependant une nette prédominance pour le ST6 (77,5% des isolats sous-typés). D'autre part, malgré le nombre important d'échantillons

aviaires analysés dans notre étude, aucun autre ST n'a été identifié même si l'on sait que d'autres STs peuvent occasionnellement infecter ce groupe d'hôtes comme les ST1, ST2, ST4 et ST5 (Cian et al., 2017 ; **Annexe 1**). Des enquêtes épidémiologiques antérieures à plus petite échelle ont également confirmé la seule présence du ST6 ou du ST7 chez plusieurs espèces d'oiseaux, chez des poulets domestiques ou chez des autruches dans différents pays (Chandrasekaran et al., 2014 ; Ramirez et al., 2016 ; Yoshikawa et al., 2016). Cette répartition des STs couplée à la forte prévalence du parasite observée dans notre étude confirment que les oiseaux, et en particulier les poulets, seraient des hôtes naturels de *Blastocystis* sp. et que les ST6 et ST7 correspondraient à des ST aviaires comme cela fut précédemment suggéré (Noël et al., 2005 ; Stensvold et al., 2007a ; Stensvold et al., 2009 ; Cian et al., 2017).

### **Prévalence et distribution des sous-types de *Blastocystis* sp. dans la filière bovine au Nord-Liban**

Comme pour la filière avicole, aucune donnée n'était disponible concernant la prévalence et la distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans la filière bovine au Liban et en particulier, chez les vaches laitières alors que ce secteur a un impact économique majeur en termes de production de lait mais aussi de viande. Aussi, plus de 250 échantillons de selle de vaches domestiques ont été collectés dans 37 villages et 55 fermes toujours dans la région du Nord-Liban et analysés pour la présence du parasite en utilisant une approche moléculaire. Globalement, la prévalence de *Blastocystis* sp. s'est montrée élevée puisqu'elle dépassait les 60% parmi les échantillons testés. Au contraire de notre enquête menée dans la filière avicole, nous avons ici la possibilité de comparer cette prévalence de 60% à celles obtenues dans d'autres pays via des méthodes moléculaires d'identification. De manière intéressante, certaines de ces prévalences étaient similaires à celle observée au Liban puisqu'elles étaient par exemple d'environ 54% au Japon (Masuda et al., 2018), de 50% en Thaïlande (Udonsom et al., 2018) et de 42% en Libye (Alfellani et al., 2013a). Par contre, la prévalence au Liban était nettement inférieure aux 80% observés en Colombie mais sur un échantillonnage d'animaux très réduit (Ramirez et al., 2014) et significativement plus élevée que celles reportées dans plusieurs autres pays comme la Corée (6,7 %) (Lee et al., 2018), la Chine (9,5 % et 10,3 %) (Zhu et al., 2017 ; Wang et al., 2018), l'Iran (9,6 %) (Badparva et al., 2015), la Grande-Bretagne (22,6 %) (Alfellani et al., 2013a) et les Etats-Unis (19,1 %) (Fayer et al., 2012). Toutes ces données montrent donc que même si la prévalence du parasite chez les

bovins domestiques est très variable d'une région géographique à une autre, elle reste néanmoins importante à l'échelle mondiale.

Dans un second temps, tous les isolats de *Blastocystis* sp. identifiés chez les vaches laitières libanaises ont été sous-typés. En fusionnant toutes les données obtenues dans le cadre d'infections simples ou d'infections mixtes chez ces animaux (infection par au moins deux STs différents de *Blastocystis* sp.), les 125 isolats finalement sous-typés appartenaient à 7 STs différents avec, par ordre de prévalence, les ST10 (44,0%), ST14 (36,8%), ST2 (8,0%), ST1 (7,2%), ST5 (2,4%), ST3 et ST7 (0,8% chacun) (**Tableau 2**). Ainsi, les ST10 et ST14 étaient largement prédominants puisque à eux deux, ils représentaient plus de 80% des isolats de bovins sous-typés au Liban.

Pays	Isolats sous-typés	STs de <i>Blastocystis</i> sp.										Référence
		ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST10	ST12	ST14	
Japon	45	0	0	0	0	0	0	0	1	0	44	Masuda et al., 2018
Japon	8	1	0	1	0	6	0	0	0	0	0	Yoshikawa et al., 2004c
Japon	3	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	Abe et al., 2003
Corée du Sud	30	6	0	0	0	5	0	0	9	0	10	Lee et al., 2018
Chine	14	0	0	2	0	0	0	0	10	0	2	Wang et al., 2018
Chine	54	0	0	0	2	1	0	0	41	0	10	Zhu et al., 2017
Thaïlande	6	0	0	0	0	0	0	0	2	4	0	Udonsom et al., 2018
Iran	17	0	0	4	0	11	2	0	0	0	0	Badparva et al., 2015
Libye	10	0	0	0	0	2	0	0	6	0	2	Alfellani et al., 2013a
<b>Liban</b>	<b>125</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>55</b>	<b>0</b>	<b>46</b>	<b>Etude 2</b>
Royaume-Uni	5	1	0	0	0	1	0	0	3	0	0	Alfellani et al., 2013a
Colombie	20	12	0	8	0	0	0	0	0	0	0	Ramirez et al., 2014
USA	7	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	Santin et al., 2011
USA	11	0	0	0	0	0	0	0	8	0	3	Fayer et al., 2012
<b>Total</b>	<b>355</b>	<b>30</b>	<b>10</b>	<b>18</b>	<b>2</b>	<b>29</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>142</b>	<b>4</b>	<b>117</b>	

**Tableau 2:** Distribution des STs de *Blastocystis* sp. chez les vaches domestiques à travers le monde.

En faisant la synthèse de toutes les études moléculaires disponibles à ce jour, c'est aussi le cas globalement à travers le monde puisque près de 75% des isolats sous-typés chez les vaches domestiques appartiennent à ces deux STs (**Tableau 2**). Ils sont ainsi prédominants, par exemple, au Japon (Masuda et al., 2018), en Corée du Sud (Lee et al., 2018), en Chine (Zhu et al., 2017) et en Libye (Alfellani et al., 2013a). Il est aussi frappant de

constater que les ST10 et ST14 étaient les deux seuls STs identifiés chez les vaches aux États-Unis (Santin et al., 2011 ; Fayer et al., 2012). Par conséquent, toutes ces données confirment que les vaches domestiques sont des hôtes naturels de *Blastocystis* sp. et que les ST10 et ST14 sont spécifiques de ce groupe d'animaux. En plus de ces deux STs prédominants, cinq STs mineurs (ST1, ST2, ST3, ST5 et ST7) ont été identifiés chez les vaches dans notre étude. Concernant les ST2 et ST7, il s'agissait tout simplement de la première identification de ces deux STs chez les bovins domestiques au niveau mondial. Pour ce qui est des trois autres STs, ils avaient déjà été détectés avec une prévalence très variable et souvent faible dans le même groupe d'animaux et ce dans différents pays (Abe et al., 2003 ; Yoshikawa et al., 2004c ; Alfellani et al., 2013a ; Ramirez et al., 2014 ; Badparva et al., 2015 ; Zhu et al., 2017 ; Lee et al., 2018 ; Wang et al., 2018) (**Tableau 2**).

### Situation de la blastocystose dans la population humaine au Nord-Liban

Les toutes premières données épidémiologiques fournies par Hamze et al., (2004) concernant la prévalence des parasites intestinaux dans la région du Nord-Liban montraient que cette zone géographique était fortement touchée par ces infections. En effet, sur la base d'un simple examen microscopique et macroscopique d'un échantillon de selle collecté pour plus de 17000 patients suivis pendant 5 ans dans un des plus grands hôpitaux de la ville de Tripoli, la prévalence de ces parasites était comprise entre 31 et 37% avec une moyenne avoisinant les 33% (**Tableau 3**). Pour les protozoaires, une prévalence importante était observée pour *Entamoeba* et *Giardia* ce qui fut d'ailleurs confirmé récemment pour ce dernier parasite dans une cohorte d'écoliers de Tripoli (Osman et al., 2016). Cependant, à cette période, *Blastocystis* sp. n'avait pas été recherché.

**A**

Année	Sexe	Patients examinés	Patients parasités	Prévalence (%)
1997	M	1660	506	30,48
	F	2128	699	32,84
	Total	3788	1205	31,81
1998	M	1468	453	30,85
	F	1989	624	31,37
	Total	3457	1077	31,15
1999	M	1425	423	29,68
	F	1944	690	35,49
	Total	3369	1113	33,03
2000	M	1466	498	33,96
	F	2003	793	35,59
	Total	3469	1291	37,21
2001	M	1254	412	32,85
	F	1789	615	34,37
	Total	3043	1027	33,74
Total		17126	5713	33,35

M : masculin.  
F : féminin.



**B**

Année	Sexe	A. lumbricoïdes		Taenia spp.		H. nana		Enter. vermicularis		Trichuris trichiura		Ent. coli		G. lamblia		Ent. histolytica		Trich. intestinalis		Total
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
1997	M	186	36,75	13	2,56	2	0,40	1	0,20	2	0,40	183	36,17	100	19,76	18	3,56	5	0,98	506
	F	244	34,91	27	3,86	1	0,14	4	0,57	0	0	283	40,49	112	16,02	25	3,58	10	1,43	699
	Total	430	35,88	40	3,31	3	0,25	5	0,41	2	0,17	466	38,67	212	17,59	43	3,57	15	1,25	1205
1998	M	161	35,54	7	1,54	3	0,66	3	0,66	0	0	174	38,41	74	16,34	26	5,74	7	1,55	453
	F	215	34,46	44	7,05	0	0	3	0,48	0	0	262	41,99	76	12,18	30	4,80	8	1,29	624
	Total	376	34,91	51	4,73	3	0,28	6	0,56	0	0	436	40,48	150	13,93	56	5,20	15	1,39	1077
1999	M	163	38,53	13	3,07	2	0,47	0	0	0	0	147	34,76	77	18,21	22	5,20	4	0,94	423
	F	272	39,42	21	3,04	4	0,58	3	0,43	0	0	272	39,42	85	12,32	25	3,62	13	1,88	690
	Total	435	39,08	34	3,05	6	0,54	3	0,27	0	0	419	37,65	162	14,56	47	4,22	17	1,52	1113
2000	M	176	35,34	13	2,61	2	0,40	2	0,40	2	0,40	177	35,55	101	20,28	24	4,82	5	1,00	498
	F	309	38,97	24	3,02	2	0,25	2	0,25	0	0	291	36,70	117	14,75	44	5,55	10	1,26	793
	Total	485	37,57	37	2,85	4	0,31	4	0,31	2	0,16	468	36,18	218	16,93	68	5,28	15	1,16	1291
2001	M	157	38,11	8	1,94	1	0,24	0	0	0	0	160	38,84	60	14,56	23	5,58	5	1,21	412
	F	239	38,86	18	2,92	2	0,32	2	0,32	1	0,16	248	40,33	77	12,52	24	3,90	10	1,63	615
	Total	396	38,56	26	2,53	3	0,29	2	0,19	1	0,10	408	39,73	137	13,34	47	4,58	15	1,46	1027
<b>Total</b>		<b>2122</b>	<b>37,14</b>	<b>188</b>	<b>3,3</b>	<b>19</b>	<b>0,33</b>	<b>20</b>	<b>0,35</b>	<b>5</b>	<b>0,09</b>	<b>2197</b>	<b>38,45</b>	<b>879</b>	<b>15,39</b>	<b>261</b>	<b>4,57</b>	<b>77</b>	<b>1,35</b>	<b>5713</b>

N : nombre de cas.  
M : masculin.  
F : féminin.

**Tableau 3 :** Diagnostiques parasitaires chez des patients du Nord-Liban entre 1997 et 2001 (A) et prévalence des différents parasites identifiés (B) (Hamze et al., 2004).

Il a fallu attendre 2013 et l'étude réalisée par El Safadi et al. pour obtenir les premières informations concernant l'impact de *Blastocystis* sp. dans la population libanaise. Dans cette enquête, les selles de 220 patients présentant ou non des symptômes digestifs (population générale ou « tout-venant ») et suivis dans 6 hôpitaux de Tripoli ont été analysés. Or, cette recherche du parasite fut réalisée par simple observation microscopique directe des selles fraîches et de ce fait, la prévalence observée de 19%, même si elle pouvait être jugée comme étant non négligeable, était pourtant très probablement largement sous-estimée puisque l'on sait que les méthodes morphologiques sont beaucoup moins sensibles que les méthodes moléculaires (Poirier et al., 2011 ; El Safadi et al., 2016 ; Osman et al., 2016). Cette étude a cependant permis de collecter les premières données concernant la distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans la population libanaise puisque 36 des 42 isolats du parasite identifiés par microscopie furent sous-typés. Ainsi, les ST3 et ST2 étaient prédominants (33,3% chacun) suivis du ST1 (30,8%) et du ST4 (2,8%) (Tableau 4). Plus récemment, une seconde étude menée sur 249 écoliers de Tripoli a montré une prévalence du parasite de 63% au sein de cette cohorte en utilisant la PCR quantitative en temps réel comme méthode d'identification (Osman et al., 2016). De plus, la répartition des STs déterminée d'après l'analyse des séquences obtenues pour 138 isolats montrait une large prédominance du ST3 (46,3%) suivi des ST2 (28,3%) et ST1 (25,4%) (Tableau 4).

Population ciblée	Echantillons analysés	Echantillons positifs	Isolats sous-typés	STs de <i>Blastocystis</i> sp.					Référence
				ST1	ST2	ST3	ST4	ST6	
Population générale	220	42 (19%)*	36	11	12	12	1	0	El Safadi et al. 2013
Ecoliers	249	157 (63%)	138	35	39	64	0	0	Osman et al. 2016
Population générale	50	27 (54%)	28	1	6	21	0	0	Etude 1 poulets
Employés d'abattoir	50	28 (56%)	28	7	5	14	0	2	Etude 1 poulets
Population générale	40	23(57,5%)	26	8	5	13	0	0	Etude 2 bovins
Eleveurs de vaches	40	21 (52,5%)	24	5	7	12	0	0	Etude 2 bovins
<b>Total</b>	<b>629</b>	<b>298 (47,4%)</b>	<b>280</b>	<b>67</b>	<b>74</b>	<b>136</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	

**Tableau 4:** Prévalence et distribution des STs de *Blastocystis* sp. au sein de différentes cohortes dans la population libanaise.

Dans le cadre de ma thèse, et afin de pouvoir évaluer le potentiel zoonotique de *Blastocystis* sp., j'ai eu l'opportunité de rechercher ce parasite toujours par PCR quantitative en temps réel dans plusieurs cohortes humaines de la même région du Nord-Liban et donc de pouvoir comparer ces données à celles détaillées précédemment. Dans ma première étude, une cohorte de 50 individus hospitalisés à Tripoli et sans contact avec des volailles et une seconde cohorte de 50 autres individus travaillant dans un abattoir de poulets ont été analysées (**Tableau 4**). La prévalence de *Blastocystis* sp. dans ces deux cohortes était très similaire puisque respectivement de 54% et de 56% tout comme d'ailleurs la distribution des STs puisque dans les deux groupes, on observait une forte prédominance du ST3 suivi du ST1 ou du ST2 selon la cohorte. Dans ma seconde étude, deux autres cohortes (population générale et éleveurs de vaches laitières) composées chacune de 40 individus ont été analysées pour la présence du parasite (**Tableau 4**). Là encore, la prévalence de *Blastocystis* sp. dépassait les 50% et était du même ordre de grandeur entre les deux cohortes puisqu'elle était de 57,5% dans la population générale et de 52,5% chez les éleveurs. De même, le ST3 était prédominant dans ces deux cohortes suivi du ST1 ou du ST2 en fonction de la cohorte considérée.

En faisant la synthèse de toutes ces données, on note que la prévalence du parasite dépasse régulièrement les 50% dans la région du Nord-Liban quelles que soient la période et la nature de la cohorte. Même si peu de données sont disponibles au Moyen-Orient via l'utilisation de méthodes moléculaires, c'est cependant une prévalence proche de celle observée par exemple aux Emirats Arabes Unis (44,4%) (AbuOdeh et al., 2016) mais supérieure à celle reportée en Arabie Saoudite (10,5%) (Mohamed et al., 2017). Pour ce qui

est de la distribution des STs, le ST3 est largement prédominant dans la population libanaise et la quasi-totalité des isolats appartiennent aux ST1, ST2 et ST3 (**Tableau 4**). Seuls deux cas d'infection par le ST6 au sein du personnel de l'abattoir et dont nous reparlerons plus loin car en lien potentiel avec une transmission zoonotique et un cas d'infection par le ST4 chez un patient hospitalisé ont été identifiés en dehors des 3 STs majeurs. Cette prédominance du ST3 suivi des ST1 ou ST2 a été décrite en Arabie Saoudite (Mohamed et al., 2017) et aux Emirats Arabes Unis (AbuOdeh et al., 2016) ainsi que dans des pays limitrophes comme l'Iran (Jalallou et al., 2017 ; Salehi et al., 2017), la Lybie (Abdulsalam et al., 2013) et la Turquie (Alinaghizade et al., 2017 ; Mirjalali et al., 2017). Plus globalement, cette prédominance du ST3 est observée dans une énorme majorité de pays à travers le monde (Clark et al., 2013 ; Alfellani et al., 2013c ; Stensvold et Clark, 2016). Comme indiqué ci-dessus, le ST4 est absent ou retrouvé avec une prévalence extrêmement faible au Liban et plus généralement dans les pays du Moyen-Orient. C'est aussi le cas en Amérique, en Afrique et en Asie alors qu'il est fréquent en Europe d'où l'hypothèse émise par Clark et al., (2013) d'une émergence récente de ce ST sur le continent européen où il est principalement confiné.

### **Evaluation du potentiel zoonotique de *Blastocystis* sp.**

La forte prévalence de *Blastocystis* sp. rapportée dans nos enquêtes chez les volailles comme chez les vaches laitières induisait donc un risque potentiel de transmission zoonotique du parasite, en particulier chez les personnes manipulant ces animaux comme les membres du personnel des abattoirs de poulets de chair ou les éleveurs de bovins. En ce sens, il a été par exemple suggéré à plusieurs reprises que les STs aviaires en l'occurrence les ST6 et ST7 qui représentent ensemble près de 10% des isolats humains caractérisés jusqu'à présent hors d'Europe (Stensvold et Clark, 2016) pouvaient être des STs zoonotiques sur la base de l'identité de séquence des gènes codant l'ARNr 18S entre les isolats de ST6 ou de ST7 d'oiseaux et d'humains (Noël et al., 2005 ; Stensvold et al., 2007a ; Alfellani et al., 2013a). Or les isolats ainsi comparés étaient originaires de zones géographiques différentes et de ce fait, la transmission directe entre les deux hôtes n'avait jamais été définitivement démontrée. Pourtant, cette notion de risque de transmission zoonotique lié au degré d'exposition d'individus aux matières fécales animales a d'abord été mise en évidence dans l'environnement de parcs zoologiques (Parkar et al., 2007 ; Stensvold et al., 2009 ; Parkar et al., 2010). Le meilleur exemple dans ce contexte concerne une étude portant sur les gardiens de primates non-humains dans un zoo anglais (Stensvold et al., 2009) chez lesquels un taux

d'infection anormalement élevé par *Blastocystis* sp. ST8 a été relevé. Ce ST8 est fréquemment trouvé chez les primates mais très rarement identifié dans la population humaine (Alfellani et al., 2013a) d'où l'hypothèse plus que probable d'une transmission zoonotique chez ces gardiens en contact avec les singes. Cette notion de risque a ensuite été renforcée à travers une étude récente portant sur des porcs infectés en nombre par *Blastocystis* sp. ST5 dans des porcheries commerciales en Australie (Wang et al., 2014). En effet, il a été démontré que ces isolats de ST5 de porcs étaient fréquemment transmis aux travailleurs des porcheries par contact répété avec ces animaux.

Pour évaluer ce potentiel risque de transmission zoonotique à partir des oiseaux, une analyse moléculaire a donc été réalisée dans le cadre de notre première étude sur 50 échantillons de matières fécales provenant du personnel de l'abattoir de poulets de chair. En parallèle, un groupe contrôle composé d'individus hospitalisés rapportant aucun contact avec des volailles a aussi été analysé à des fins de comparaison. De manière intéressante, deux personnels de l'abattoir se sont avérés infectés par le ST6 aviaire alors qu'aucun cas d'infection par ce ST n'a été rapporté dans la population contrôle de cette étude ni même dans aucune autre étude épidémiologique conduite au Liban (El Safadi et al., 2013 ; Osman et al., 2016) incluant d'ailleurs les cohortes humaines de notre seconde étude. La seule convergence de STs n'est cependant pas suffisante pour affirmer une transmission directe entre deux hôtes et doit être confirmée par une identité de séquence des gènes codant l'ARNr 18S des isolats correspondants (Wang et al., 2014). En intégrant dans une analyse comparative toutes les séquences d'isolats de ST6 obtenues dans notre étude ainsi que celles disponibles dans les bases de données pour des hôtes humains et animaux, 18 « génotypes » ont pu être identifiés en lien avec le polymorphisme de séquence de cette partie du gène codant l'ARNr 18S et servant au sous-typage. Parmi ces génotypes, deux d'entre eux ne comprenaient uniquement que des isolats de poulets et d'humains issus du même abattoir libanais. Cela confirmait donc avec certitude que l'infection à *Blastocystis* sp. ST6 contractée par le personnel de l'abattoir était d'origine animale par transmission zoonotique d'isolats de poulet de ces deux génotypes.

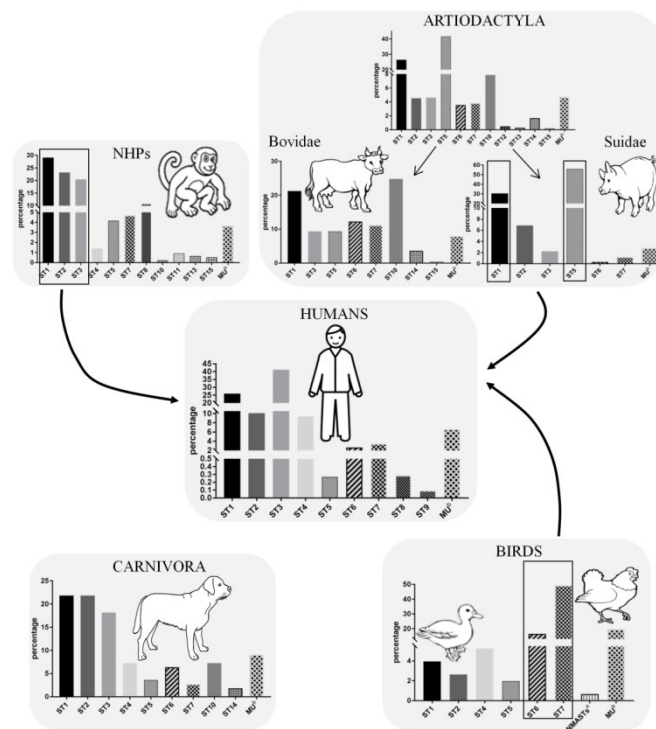
Une approche épidémiologique similaire a été menée pour évaluer le risque de transmission zoonotique à partir des vaches domestiques au Nord-Liban. Une cohorte de 40 éleveurs et une seconde du même nombre d'individus correspondant à des patients hospitalisés sans contact avec des bovins ont donc été analysés. Les ST10 et ST14 de *Blastocystis* sp. qui sont largement prédominants chez les vaches laitières du Nord-Liban n'ont pas été identifiés chez les éleveurs malgré un contact répété avec leurs animaux. Plus globalement, ces deux STs n'ont à ce jour jamais été identifiés dans la population humaine

(Clark et al., 2013; Stensvold et Clark, 2016) suggérant donc que l'Homme ne serait pas sensible à une infection par ces deux STs. Une autre hypothèse pourrait être que ces deux STs ne produisent pas de formes kystiques ou s'ils en produisent, qu'elles ne soient pas résistantes dans l'environnement empêchant ainsi toute transmission possible du parasite à un autre hôte par contact indirect. Dans ce cas, la transmission de ces deux STs se ferait uniquement par contact direct entre les animaux.

Comme indiqué ci-dessus, 5 autres STs mineurs ont été identifiés dans notre seconde étude chez les vaches laitières en l'occurrence les ST1, ST2, ST3, ST5 et ST7. Concernant d'abord le ST5, il n'a été que rarement rapporté chez les bovins si on compare sa prévalence à celle observée pour les ST10 et ST14 (Yoshikawa et al., 2004c ; Alfellani et al., 2013a ; Badparva et al., 2015 ; Zhu et al., 2017 ; Lee et al., 2018) (**Tableau 2**). En outre, *Blastocystis* sp. ST5 a été proposé comme étant un ST adapté aux porcs (Wang et al., 2014) et de ce fait il ne peut que difficilement être attribué aux bovins domestiques même si dans ce dernier groupe d'animaux, son origine reste inexplicée. Pour ce qui est du ST7 qui est comme nous l'avons confirmé ci-dessus considéré comme un ST aviaire, sa présence chez une seule vache libanaise reflète probablement une contamination accidentelle par contact avec des excréments d'oiseaux. Regardant les trois autres STs mineurs (ST1, ST2 et ST3), ils ont été trouvés dans 6 cas seulement en commun chez les vaches et leurs éleveurs dans notre étude suggérant une transmission potentielle entre ces hôtes. En comparant les séquences correspondantes d'isolats de vaches et d'éleveurs de même ST, une identité de séquence de 100 % n'a été confirmée que pour un seul isolat de ST3 infectant les deux hôtes. Comme on sait que le ST3 est largement prédominant dans la population humaine (Clark et al., 2013 ; Stensvold et Clark, 2016) y compris au Liban (voir ci-dessus), et que ce ST n'a qu'une faible prévalence chez les vaches (**Tableau 2**), ce cas d'infestation par *Blastocystis* sp. ST3 chez une vache libanaise peut très probablement s'expliquer par ce que l'on appelle une zoonose inverse c'est-à-dire un passage du parasite de l'Homme à l'animal comme suggéré d'ailleurs dans des études antérieures concernant l'infection par *Blastocystis* sp. chez différents hôtes animaux (Ramirez et al., 2014) et chez les porcs (Wang et al., 2014). En ce qui concerne les ST1 et ST2 considérés comme des STs liés à une infection humaine (Clark et al., 2013 ; Stensvold et Clark, 2016), leur origine chez les vaches domestiques reste incertaine d'après nos données de séquence puisque ces STs sont aussi trouvés chez de nombreux hôtes animaux (Cian et al., 2017 ; **Annexe 1**).

Globalement, la faible prévalence des ST1, ST2, ST3, ST5 et ST7 observée dans la population bovine libanaise suggère que ces animaux ont peu de chances d'être des hôtes

naturels de ces STs et sont potentiellement infectés de manière occasionnelle par une exposition directe aux matières fécales provenant d'hôtes humains et non humains ou par ingestion d'eau potable ou de nourriture contaminée dans leur environnement comme cela a par exemple été proposé chez les chiens errants ou domestiques (Wang et al., 2013 ; Osman et al., 2015). Toutefois, étant donné que les vaches sont porteurs de STs mineurs potentiellement zoonotiques, ces animaux sont donc capables d'excréter les isolats correspondants et peuvent donc représenter éventuellement des réservoirs zoonotiques secondaires d'infection. Enfin, les données obtenues dans nos deux premières études épidémiologiques menées chez les poulets et les vaches nous permettent de compléter la figure publiée par Cian et al., (2017) (**Figure 16**) proposant plusieurs sources animales possibles de transmission de *Blastocystis* sp. à l'Homme. Si l'on fait abstraction des primates non humains avec qui la possibilité de contact reste plus que limitée en dehors des parcs zoologiques, les sources d'infection potentielles confirmées sont donc les Suidae et les oiseaux avec une interrogation persistante pour certains STs trouvés chez les bovins.



**Figure 16 :** Comparaison de la distribution et de la prévalence des STs de *Blastocystis* sp. dans la population humaine et chez plusieurs groupes majeurs d'animaux et évaluation du risque de transmission zoonotique du parasite.

## **Situation de *Campylobacter* spp. dans les populations humaine et animale au Nord-Liban**

Notre troisième étude a visé à clarifier l'impact des bactéries pathogènes zoonotiques du genre *Campylobacter* chez les poulets de chair au Liban car très peu de données épidémiologiques sont actuellement disponibles dans ce pays alors que ces animaux sont considérés comme une source majeure de campylobactériose humaine (EFSA et ECDC, 2016 ; Silva et al., 2011 ; Thépault et al., 2017 ; Thépault et al., 2018a). L'un des principaux objectifs de notre enquête était donc d'évaluer le taux de contamination des poulets de chair libanais par *Campylobacter* spp. dans les fermes en analysant les caeca des animaux à leur arrivée à l'abattoir mais aussi en fin de chaîne d'abattage en analysant les carcasses des animaux après traitement chimique. Ainsi, plus de 200 échantillons de caecum et de carcasses de poulets ont été collectés et analysés par des méthodes microbiologiques et moléculaires. Fait frappant, ces bactéries ont été détectées dans près de 70% des caeca de volailles testés dans notre enquête. Cette prévalence élevée de *Campylobacter* spp. chez les poulets de chair a aussi été décrite, par exemple, en France et dans d'autres pays européens (EFSA, 2010 ; Hue et al., 2010 ; Allain et al., 2014). Pour ce qui est des carcasses de poulets libanais, plus de 17% d'entre elles étaient encore positives pour *Campylobacter* spp. après traitement chimique dans l'abattoir. Cela indiquait clairement que le processus de décontamination des animaux effectué dans les abattoirs libanais après éviscération n'était manifestement pas suffisamment efficace. Même encore importante, cette prévalence était pourtant plus faible que celles rapportées sur des carcasses dans des abattoirs allemands, croates et français (EFSA, 2010 ; Hue et al., 2010 ; Hue et al., 2011 ; EFSA et ECDC, 2015 ; Alpigliani et al., 2017). Cela pourrait tout simplement s'expliquer par l'absence de décontamination dans ces pays européens associée à une réglementation interdisant l'utilisation de décontaminants chimiques sur les carcasses de poulets de chair. D'autre part, si on considère qu'une ferme est contaminée par la bactérie si au moins un caecum ou une carcasse venant de l'élevage est positif pour *Campylobacter* spp., alors près de 92% des fermes testées étaient infectées ce qui témoigne de l'impact majeur de cet agent pathogène au Liban.

Les espèces de *Campylobacter* impliquées ont pu être identifiées par PCR multiplex (Denis et al., 1999) pour tous les échantillons positifs. Ainsi, la prévalence de *C. coli* était légèrement supérieure à celle de *C. jejuni* dans les caeca alors qu'inversement, *C. jejuni* était légèrement prédominant sur les carcasses. De plus, globalement au sein des fermes, les prévalences des deux espèces étaient quasi-similaires avec une légère prédominance pour *C. coli*. En comparaison, une autre étude plus limitée et menée au Liban avait rapporté une

prédominance de *C. coli* à la fois dans les caeca et sur les échantillons de carcasses de poulets (Talhok et al., 1998) alors que *C. jejuni* était majoritaire pour les mêmes types d'échantillons dans une seconde enquête toujours conduite au Liban (Hajj Semaan et al., 2014). Même si *C. jejuni* est généralement prédominant chez les volailles à travers le monde (EFSA 2010 ; Hue et al., 2011 ; Allain et al., 2014 ; García-Sánchez et al., 2017), la prédominance de *C. coli* dans les élevages de volailles libanais était cependant en accord avec diverses études menées dans plusieurs pays européens comme la Bulgarie, la Hongrie, l'Italie, le Luxembourg, Malte, le Portugal, l'Irlande, l'Espagne et la Grèce (EFSA, 2010 ; Marinou et al., 2012 ; Nobile et al., 2013 ; Sahin et al., 2015 ; Mezher et al., 2016 ; Pergola et al., 2017). On peut remarquer que tous ces pays, à l'exception du Luxembourg et de l'Irlande, sont des pays du sud de l'Europe, dont la plupart composant le pourtour Méditerranéen, suggérant ainsi une possible prédominance de *C. coli* dans les élevages de volailles associée à cette zone géographique.

Un génotypage de 51 des 79 isolats de *C. jejuni* de volailles libanaises identifiés dans les caeca ou sur les carcasses a ensuite été réalisé via l'utilisation de la méthode CGF développée pour un panel de 40 gènes (Taboada et al., 2012). Brièvement, sur la base d'un seuil de similarité de 90%, la majorité des isolats de *C. jejuni* de poulets de chair libanais ont été répartis en 6 profils, chacun d'entre eux incluant au moins 4% des isolats et de ce fait considérés comme des profils prédominants. La plupart de ces profils prédominants étaient par comparaison communs avec ceux d'isolats de poulets de chair français suggérant une faible association entre le profil génétique et l'origine géographique de la bactérie comme suggéré par Thépault et al., (2017). Il est intéressant de noter que la plupart de ces profils ont également été identifiés dans des cas humains français de campylobactériose soulignant ainsi le risque zoonotique potentiel de transmission à la population libanaise. Ces résultats ont donc confirmé à la fois la grande diversité génétique des isolats de *C. jejuni* et l'importance majeure des volailles comme source potentielle de contamination pour l'Homme au Liban comme cela a été démontré dans d'autres pays (Strachan et al., 2012 ; Thépault et al., 2017, 2018a,b). En outre, même si le nombre d'isolats animaux libanais de *C. jejuni* sous-typés reste encore limité, un profil, en l'occurrence le profil 30, a été identifié comme étant potentiellement spécifique de la production libanaise de poulets de chair puisqu'il n'a pas été identifié au sein des isolats aviaires et humains français.

A côté d'une exposition possible à *Campylobacter* spp. d'origine alimentaire, l'exposition liée au travail peut également représenter une source importante d'infection (Castillo Neyra et al., 2012). En ce sens, il est intéressant de noter que 12% des travailleurs des abattoirs libanais testés étaient contaminés par la bactérie alors qu'en comparaison, tous



les individus non exposés directement aux volailles et hospitalisés pour différentes pathologies dans un hôpital de Tripoli étaient négatifs pour *Campylobacter* spp. Il est ainsi clair qu'un personnel ayant un contact étroit et répété avec de la volaille a un risque accru d'exposition à *Campylobacter* spp. comme suggéré précédemment (Vegosen et al., 2015). C'est à notre connaissance la première démonstration de ce risque au Liban. Deux études récentes ont renforcé cette affirmation puisque 25% des travailleurs dans des abattoirs de volailles suédois (Ellström et al., 2014 ; de Perio et al., 2013) et 83% du personnel ayant travaillé au moins d'un mois dans des abattoirs américains étaient positifs pour *Campylobacter* spp. (de Perio et al., 2013).

Enfin, un résultat inattendu obtenu dans le cadre de ma thèse a été lié à la possibilité de comparer la prévalence de *Campylobacter* spp. chez les poulets de chair libanais avec celle du protozoaire entérique *Blastocystis* sp. En effet, les caeca analysés dans les études 1 et 3 de ma thèse étaient les mêmes permettant ainsi cette comparaison chez ces animaux. Sur la base d'une analyse statistique, une association entre la présence de *Campylobacter* spp. et celle de *Blastocystis* sp. a été montrée chez les poulets libanais. En d'autres termes, la présence de l'un des deux microorganismes dans le tube digestif des poulets favoriserait la colonisation par le second. De même, l'absence de l'un favoriserait l'absence de l'autre. Dans le cadre d'études menées chez l'Homme, on sait que la colonisation par *Blastocystis* sp. entraîne ou est liée à des modifications de la composition du microbiote bactérien digestif puisqu'une augmentation de la diversité bactérienne de ce microbiote a été mise en évidence chez les individus porteurs de ce protozoaire (Scanlan et al., 2014 ; Audebert et al., 2016 ; Nieves-Ramirez et al., 2018). Cette variation de composition du microbiote pourrait s'expliquer par l'action de prédation de *Blastocystis* sp. sur les bactéries intestinales de taxons très abondants (Chabé et al., 2017 ; Nieves-Ramirez et al., 2018). Cette prédation pourrait diminuer la compétition entre microorganismes pour les nutriments et l'espace entraînant ainsi une augmentation de la richesse bactérienne. Bien qu'aucune donnée ne soit actuellement disponible sur l'impact de *Blastocystis* sp. sur le microbiote intestinal bactérien des poulets, cette dernière hypothèse pourrait donc expliquer, au moins partiellement, le taux d'infection plus élevé par *Campylobacter* spp. chez les animaux colonisés par *Blastocystis* sp. en favorisant la colonisation de l'hôte par la bactérie. De plus, les propriétés immunomodulatrices de *Blastocystis* sp. ont également été décrites (Ajjampur et Tan, 2016). En particulier, le parasite sécrète des protéases à cystéine capables de dégrader l'immunoglobuline A humaine (Puthia et al., 2005). Or, cette immunoglobuline est prédominante à la surface de la muqueuse intestinale et joue un rôle crucial dans la régulation

des interactions hôte-bactéries dans l'intestin. Aussi, l'effet immunomodulateur supposé du parasite chez les poulets infectés pourrait également faciliter la colonisation par d'autres pathogènes entériques tels que *Campylobacter* spp.

# ***Conclusion***

---

## CONCLUSION

---

Nos travaux réalisés dans la région du Nord-Liban ont clairement apporté, dans un premier temps, une contribution significative à l'étude de l'épidémiologie moléculaire et de la circulation du protozoaire entérique *Blastocystis* sp. dans les populations humaine et animales. Pour différentes raisons comme, en particulier, la vétusté du réseau de distribution d'eau et le manque de systèmes d'assainissement, la région du Nord-Liban reste fortement touchée par les infections parasitaires et nos données ne font malheureusement que confirmer cet état des lieux. En effet, la prévalence de *Blastocystis* sp. dépasse les 50% dans toutes les cohortes d'individus analysées dans cette région que ce soit chez les enfants (Osman et al., 2016), les patients hospitalisés pour différentes pathologies, le personnel d'abattoirs ou les éleveurs (Etudes 1 et 2). La situation vis-à-vis de *Blastocystis* sp. est donc préoccupante au Liban comme d'ailleurs dans d'autres zones géographiques et il serait intéressant de préciser si elle est généralisée à tout le pays ou limitée à certaines régions comme le Nord-Liban. Pour répondre à cette interrogation, une large étude épidémiologique devrait être menée à court terme dans la région plus urbanisée de Beyrouth en collaboration avec plusieurs hôpitaux de la capitale Libanaise. D'autre part, l'arrivée récente et massive de réfugiés en provenance de pays considérés à risque pour les infections parasitaires comme l'Irak ou la Syrie pourrait initier une augmentation de la prévalence de *Blastocystis* sp. dans la population Libanaise en lien avec les conditions sanitaires précaires de ces déplacés. Là encore, une enquête épidémiologique sera menée dans les mois qui viennent chez ces réfugiés en collaboration avec certaines organisations internationales. Cette situation globale nécessite donc de mettre en place des mesures de prévention en direction de la population tout en développant des méthodes de contrôle en particulier pour ce qui est de la qualité des eaux de consommation qui reste probablement la principale source de transmission. L'un des objectifs du Programme Hubert Curien 2015 CEDRE Franco-Libanais ayant en partie financé mon travail de thèse est justement de créer, dans un futur proche, une unité de surveillance des agents microbiologiques au Nord-Liban.

Mon travail de thèse englobe aussi l'enquête épidémiologique la plus large jamais menée à l'aide d'outils moléculaires concernant la prévalence et la distribution des STs de *Blastocystis* sp. chez les volailles. Brièvement, notre étude conduite au Nord-Liban a montré que les poulets de chair sont fréquemment infectés par le parasite et donc des hôtes naturels de celui-ci. Ainsi, cette prévalence élevée de *Blastocystis* sp. observée dans les élevages commerciaux de poulets soulève naturellement la question de l'impact de ce parasite dans la filière avicole et suggère là aussi de mettre en œuvre des mesures de prévention et de contrôle pour réduire l'impact du parasite dans les fermes. De plus, comme seuls les ST6 et ST7 ont

## CONCLUSION

---

été identifiés avec une fréquence importante chez ce groupe d'animaux, cela confirme que ces deux STs représentent des STs adaptés aux oiseaux. D'autre part, le potentiel zoonotique de *Blastocystis* sp. ST6 a été clairement démontré pour la première fois par l'identification des mêmes isolats de ce ST à la fois chez les poulets et chez le personnel de l'abattoir de ces mêmes volailles. Cependant, malgré la forte prévalence du parasite chez les poulets, cette transmission à l'Homme qui nécessite, très probablement, un contact direct et répété avec les animaux, s'est avérée assez limitée en nombre de cas. Aussi, même si des cas de transmission zoonotique ont été identifiés, cela sous-entendrait que les conditions d'hygiène et de salubrité mises en place dans les abattoirs seraient globalement efficaces pour permettre une protection appropriée du personnel lors de la manipulation des animaux. Pour confirmer cette hypothèse, des travaux futurs devraient s'intéresser directement aux éleveurs de poulets pour lesquels le risque de transmission zoonotique est probablement plus élevé en raison d'une exposition encore plus directe aux selles animales et d'une protection sans doute plus limitée que dans les abattoirs.

Pour compléter ces données, nos travaux se sont aussi, pour la première fois, concentrés sur la prévalence de *Blastocystis* sp. chez les vaches laitières au Nord-Liban. Cette prospection a montré que les vaches laitières sont très fréquemment infectées par le parasite avec une prévalence globale de celui-ci dépassant les 60%. Comme pour la filière avicole, la question de l'impact de cette infection dans la filière bovine qui revêt aussi une importance majeure dans ce pays est clairement posée. La large prédominance observée des ST10 et ST14 confirme que ces deux STs représentent des STs adaptés aux bovins. Les autres STs mineurs identifiés sont le reflet d'une très probable contamination via diverses sources animales ou même humaines et environnementales dans ou à proximité des fermes. Enfin, en comparant la distribution des STs du parasite chez les bovins et leurs éleveurs, le risque de transmission zoonotique de *Blastocystis* sp. par ces animaux semble très limité. Toutefois, d'autres enquêtes devront être menées à grande échelle afin de clarifier le rôle exact des bovins domestiques dans l'épidémiologie de *Blastocystis* sp. et comme sources potentielles de transmission du parasite à l'Homme, au moins en tant que réservoirs secondaires.

Enfin, la dernière partie de ma thèse et pas la moindre s'est focalisée sur la prévalence de *Campylobacter* spp. dans les fermes et dans la chaîne d'abattage des poulets de chair au Nord-Liban. C'est à notre connaissance la plus large étude jamais menée dans ce pays sur ce thème et la seule ayant clarifié à la fois la diversité génétique des isolats de *C. jejuni* et leur potentiel zoonotique même si le nombre d'isolats caractérisés se devra d'être augmenté dans des études futures. Cette enquête a mis en évidence la prévalence élevée et la large diversité

## CONCLUSION

---

génétique de *Campylobacter* spp. dans la production avicole libanaise et a démontré que les poulets de chair représentaient un réservoir important pour la campylobactériose humaine. En particulier, le personnel des abattoirs de volailles en contact avec ces animaux présentent un risque plus élevé d'infection par transmission zoonotique de *Campylobacter* spp. Par conséquent, un programme de surveillance de cette bactérie est nécessaire au Liban tout comme la mise en place de mesures efficaces dans le but de contrôler l'impact de *Campylobacter* spp. dans les populations humaine et animale. Enfin, l'association observée entre *Campylobacter* spp. et *Blastocystis* sp. chez les poulets de chair se doit d'être confirmée sur des populations animales plus larges. En outre, les hypothèses émises visant à expliquer cette association pourront être vérifiées via l'analyse et la comparaison de la composition du microbiote bactérien intestinal de poulets expérimentalement infectés par ces deux microorganismes (Iguchi et al., 2007).

# *Références bibliographiques*

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Abdulsalam, A.M., Ithoi, I., Al-Mekhlafi, H.M., Ahmed, A., Surin, J., Mak, J.W. (2012) Drinking water is a significant predictor of *Blastocystis* infection among rural Malaysian primary schoolchildren. *Parasitology* 139: 1014–1020
- Abdulsalam, A.M., Ithoi, I., Al-Mekhlafi, H.M., Khan, A.H., Ahmed, A., Surin, J., Mak, J.W. (2013) Prevalence, predictors and clinical significance of *Blastocystis* sp. in Sebha, Libya. *Parasit Vectors* 6: 86
- Abe, N., Nagoshi, M., Takami, K., Sawano, Y., Yoshikawa, H. (2002) A survey of *Blastocystis* sp. in livestock, pets, and zoo animals in Japan. *Vet Parasitol* 106: 203–212
- Abe, N., Wu, Z., Yoshikawa, H. (2003) Zoonotic genotypes of *Blastocystis hominis* detected in cattle and pigs by PCR with diagnostic primers and restriction fragment length polymorphism analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. *Parasitol Res* 90: 124–128
- AbuOdeh, R., Ezzedine, S., Samie, A., Stensvold, C.R., ElBakri, A. (2016) Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* in healthy individuals in Sharjah, United Arab Emirates. *Infect Genet Evol* 37: 158–162
- Abu-Madi, M., Behnke, J.M., Sharma, A., Bearden, R., Al-Banna, N. (2016) Prevalence of virulence/stress genes in *Campylobacter jejuni* from chicken meat sold in Qatari retail outlets. *PLoS ONE* 11: e0156938
- Achen, M., Morishita, T.Y., Ley, E.C. (1998) Shedding and colonization of *Campylobacter jejuni* in broilers from day-of-hatch to slaughter age. *Avian Dis* 42: 732–737
- Ajene, A.N., Walker, C.L.F., Black, R.E. (2013) Enteric Pathogens and Reactive Arthritis: A systematic review of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Shigella*-associated reactive arthritis. *J Health Popul Nutr* 31: 299–307
- Ajjampur, S.S.R., Png, C.W., Chia, W.N., Zhang, Y., Tan, K.S.W. (2016) Ex Vivo and In Vivo Mice Models to Study *Blastocystis* spp. Adhesion, Colonization and Pathology: Closer to Proving Koch's Postulates. *PLoS ONE* 11: e0160458
- Ajjampur, S.S.R., Tan, K.S.W. (2016) Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. – Interpreting results from in vitro and in vivo studies. *Parasitol Int* 65: 772–779
- Al Amri, A., Senok, A.C., Ismaeel, A.Y., Al-Mahmeed, A.E., Botta, G.A. (2007) Multiplex PCR for direct identification of *Campylobacter* spp. in human and chicken stools. *J Med Microbiol* 56: 1350–1355



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Alemu, A., Shiferaw, Y., Getnet, G., Yalew, A., Addis, Z. (2011) Opportunistic and other intestinal parasites among HIV/AIDS patients attending Gambi higher clinic in Bahir Dar city, North West Ethiopia. *Asian Pac J Trop Med* 4: 661-665
- Alfellani, M.A., Taner-Mulla, D., Jacob, A.S., Imeede, CA., Yoshikawa, H., Stensvold, CR., Clark, CG. (2013a) Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist* 164: 497–509
- Alfellani, M.A., Jacob, A.S., Perea, N.O., Krecek, R.C., Taner-Mulla, D., Verweij, J.J., Levecke, B., Tannich, E., Clark, C.G., Stensvold, C.R. (2013b) Diversity and distribution of *Blastocystis* sp. subtypes in non-human primates. *Parasitology* 140: 966–971
- Alfellani, M.A., Stensvold, C.R., Vidal-Lapiedra, A., Onuoha, E.S., Fagbenro-Beyioku, A.F., Clark, C.G. (2013c) Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop* 126: 11–18
- Alinaghizade, A., Mirjalali, H., Mohebbali, M., Stensvold, C.R., Rezaeian, M. (2017) Inter- and intra-subtype variation of *Blastocystis* subtypes isolated from diarrheic and non-diarrheic patients in Iran. *Infect Genet Evol* 50: 77–82
- Allain, V., Chemaly, M., Laisney, M.J., Rouxel, S., Quesne, S., Le Bouquin, S. (2014) Prevalence of and risk factors for *Campylobacter* colonisation in broiler flocks at the end of the rearing period in France. *Br Poult Sci* 55: 452–459
- Alpigiani, I., J. C. Abrahantes, V. Michel, A. Huneau-Salaün, M. Chemaly, L. J. Keeling, A. Gervelmeyer, C. Bacci, F. Brindani, S. Bonardi, S., Berthe, F. (2017) Associations between animal welfare indicators and *Campylobacter* spp. in broiler chickens under commercial settings: A case study. *Prev Vet Med* 147: 186–193
- Altekruse, S.F., Stern, N.J., Fields, P.I., Swerdlow, D.L. (1999) *Campylobacter jejuni*—An emerging foodborne pathogen. *Emerg Infect Dis* 5: 28–35
- Alter, T., Scherer, K. (2006) Stress response of *Campylobacter* spp. and its role in food processing. *J Vet Med Ser B* 53: 351–357
- Andersen, L.O., Stensvold, C.R. (2016) *Blastocystis* in Health and Disease: Are We Moving from a Clinical to a Public Health Perspective? *J Clin Microbiol* 54: 524–528
- Angelici, M.C., Nardis, C., Scarpelli, R., Ade, P. (2018) *Blastocystis hominis* transmission by non-potable water: a case report in Italy. *ISN* 41: 173-177

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Anuar, T.S., Ghani, M.K.A., Azreen, S.N., Salleh, F.M., Moktar, N. (2013) *Blastocystis* infection in Malaysia: Evidence of waterborne and human-to-human transmissions among the Proto-Malay, Negrito and Senoi tribes of Orang Asli. *Parasit Vectors* 6: 40
- Arisue, N., Hashimoto, T., Yoshikawa, H. (2003) Sequence heterogeneity of the small subunit ribosomal RNA genes among *Blastocystis* isolates. *Parasitology* 126: 1–9
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, JM., Bertalan, M., Borrueil, N., Casellas, F., Fernandez, L. (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473: 174–180
- Audebert, C., Even, G., Cian, A., The *Blastocystis* Investigation Group, Loywick, A., Merlin, S., Viscogliosi, E., Chabé, M. (2016) Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Sci Rep* 6: 25255
- Bacon, D.J., Alm, R.A., Burr, D.H., Hu, L., Kopecko, D.J., Ewing, C.P., Trust, T.J., Guerry, P. (2000) Involvement of a Plasmid in Virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect Immun* 68: 4384–4390
- Bacon, D.J., Alm, R.A., Hu, L., Hickey, T.E., Ewing, C.P., Batchelor, R.A., Trust, T.J., Guerry, P. (2002) DNA Sequence and Mutational Analyses of the pVir Plasmid of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect Immun* 70: 6242–6250
- Badparva, E., Sadraee, J., Kheirandish, F. (2015) Genetic diversity of *Blastocystis* isolated from cattle in Khorramabad, Iran. *Jundishapur J Microbiol* 8: e14810
- Bahrndorff, S., Rangstrup-Christensen, L., Nordentoft, S., Hald, B. (2013) Foodborne disease prevention and broiler chickens with reduced *Campylobacter* infection. *Emerg Infect Dis* 19: 425–430
- Baillon, M.L.A., Vliet, A.H.M. van, Ketley, J.M., Constantinidou, C., Penn, C.W. (1999) An iron-regulated Alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) confers aerotolerance and oxidative stress resistance to the microaerophilic pathogen *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* 181: 4798–4804
- Baldursson, S., Karanis, P. (2011) Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Res* 45: 6603-6614
- Banaticla, J.E.G., Rivera, W.L. (2011) Detection and subtype identification of *Blastocystis* isolates from wastewater samples in the Philippines. *J Water Health* 9: 128

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Barbosa, C.V., Barreto, M.M., Andrade, R. de J., Sodré, F., Levy, C.M. d'Avila-, Peralta, J.M., J.M., Igreja, R.P., de Macedo, H.W., Santos, H.L.C. (2018) Intestinal parasite infections in a rural community of Rio de Janeiro (Brazil): Prevalence and genetic diversity of *Blastocystis* subtypes. *PLoS ONE* 13: e0193860
- Bart, A., Wentink-Bonnema, E.M., Gilis, H., Verhaar, N., Wassenaar, C.J., Vugt, M. van Vugt, M., Goorhuis, A., Van Gool, T. (2013) Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infect Dis* 13: 389
- Batista, M.W., Pierrotti, L.C., Abdala, E., Clemente, W.T., Girao, E.S., Rosa, D.R.T., Ianhez, L.E, Bonazzi, P.R., Lima, A.S., Fernandes, P.F.C.B.C., Padua-Neto, M.V., Bacchella, T., Oliveira, A.P.P., Viana, C.F.G., Ferreira, M.S., Shikanai-Yasuda, M.A. (2011) Endemic and opportunistic infections in Brazilian solid organ transplant recipients. *Trop Med Int Health* 16: 1134–1142
- Beery, J.T., Hugdahl, M.B. (1988) Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*. *Appl Env Microbiol* 54: 2365-2370
- Beghini, F., Pasolli, E., Truong, T.D., Putignani, L., Cacciò, S.M., Segata, N. (2017) Large-scale comparative metagenomics of *Blastocystis*, a common member of the human gut microbiome. *The ISME Journal* 11: 2848–2863
- Begum, S., Sekar, M., Gunaseelan, L., Gawande, M., Suganya, G., Malar, P.A.S., Karthikeyan, A. (2015) Molecular identification of *Campylobacter jejuni* and *coli* from chicken, calves and dogs to determine its potential threat on human being. *Vet World* 8: 1420–1423
- Belloc, C., Magras, C., Fourichon, C., Federighi, M. (2004) Epidémiologie descriptive de *Campylobacter* spp chez le porc : portage et typologie des souches isolées en élevage et dans les viandes. *Journ Rech Porc* 36: 359–364
- Belova, L.M., Kostenko, L.A. (1990) *Blastocystis galli* sp. n. (Protista: Rhizopoda) from the intestines of domestic hens. *Parazitologiya* 24: 164–168
- Bergamo do Bomfilm, T.C., Machado do Couto, M.C. (2013) Morphological diagnosis and occurrence of *Blastocystis* spp. obtained from the stool samples of domestic bird species commercialized in municipal markets. *J Parasitol Vector Biol* 5: 20-26

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Berndtson, E., Emanuelson, U., Engvall, A., Danielsson-Tham, M.L. (1996a) A 1-year epidemiological study of campylobacters in 18 Swedish chicken farms. *Prev Vet Med* 26: 167–185
- Berndtson, E., Danielsson-Tham, M.L., Engvall, A. (1996b) *Campylobacter* incidence on a chicken farm and the spread of *Campylobacter* during the slaughter process. *Int J Food Microbiol* 32: 35–47
- Biswas, D., Fernando, U.M., Reiman, C.D., Willson, P.J., Townsend, H.G.G., Potter, A.A., Allan, B.J. (2007) Correlation between *in vitro* secretion of virulence-associated proteins of *Campylobacter jejuni* and colonization of chickens. *Curr Microbiol* 54: 207–212
- Black, R.E., Levine, M.M., Clements, M.L., Hughes, T.P., Blaser, M.J. (1988) Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J Infect Dis* 157: 472–479
- Böhm-Gloning, B., Knobloch, J., Walderich, B. (1997) Five subgroups of *Blastocystis* from symptomatic and asymptomatic patients revealed by restriction site analysis of PCR-amplified 16S-like rDNA. *Trop Med Int Health* 2: 771–778
- Bolton, D.J. (2015) *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiol* 48: 99–108
- Boorom, K.F., Smith, H., Nimri, L., Viscogliosi, E., Spanakos, G., Parkar, U., Li, L.H., Zhou, X.N., Ok, Ü.Z., Leelayoova, S., et al. (2008) Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasit Vectors* 1: 40
- Boreham, P.F., Stenzel, D.J. (1993) *Blastocystis* in humans and animals: morphology, biology, and epizootiology. *Adv Parasitol* 32: 1-70
- Bouwknegt, M., van de Giessen, A.W., Dam-Deisz, W.D.C., Havelaar, A.H., Nagelkerke, N.J.D., Henken, A.M. (2004) Risk factors for the presence of *Campylobacter* spp. in Dutch broiler flocks. *Prev Vet Med* 62: 35–49
- Bradbury, R.S., Barbé, B., Jacobs, J., Jallow, A.T., Camara, K.C., Colley, M., Wegmüller, R., Jasse, B., Cham, Y., Baldeh, I., et al. (2015) Enteric pathogens of food sellers in rural Gambia with incidental finding of *Myxobolus* species (Protozoa: Myxozoa). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 109: 334–339

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Branco, N., Leal, D.A.G., Franco, R.M.B. (2012) A Parasitological Survey of Natural Water Springs and Inhabitants of a Tourist City in Southeastern Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 12: 410–417
- Caradonna, T., Marangi, M., Del Chierico, F., Ferrari, N., Reddel, S., Bracaglia, G., Normanno, G., Putignani, L., Giangaspero, A. (2017) Detection and prevalence of protozoan parasites in ready-to-eat packaged salads on sale in Italy. *Food Microbiology* 67: 67–75
- Castillo Neyra, R., Vegosen, L., Davis, M.F., Price, L., Silbergeld, E.K. (2012) Antimicrobial-resistant bacteria: an unrecognized work-related risk in food animal production. *Saf Health Work* 3: 85–91
- CDC (2018) *Campylobacter*. <https://www.cdc.gov/campylobacter/index.html>
- Cha, W., Mosci, R., Wengert, S.L., Singh, P., Newton, D.W., Salimnia, H., Lephart, P., Khalife, W., Mansfield, L.S., Rudrik, J.T., et al. (2016) Antimicrobial Susceptibility Profiles of Human *Campylobacter jejuni* Isolates and Association with Phylogenetic Lineages. *Front Microbiol* 7:589
- Chabé, M., Lokmer, A., Ségurel, L. (2017) Gut Protozoa: Friends or Foes of the Human Gut Microbiota? *Trends in Parasitology* 33: 925–934
- Chamovitz, B.N., Hartstein, A.I., Alexander, S.R., Terry, A.B., Short, P., Katon, R. (1983) *Campylobacter jejuni*-associated hemolytic-uremic syndrome in a mother and daughter. *Pediatrics* 71: 253–256
- Chandramathi, S., Suresh, K., Anita, Z.B., Kuppusamy, U.R. (2012) Infections of *Blastocystis hominis* and microsporidia in cancer patients: are they opportunistic? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 106: 267–269
- Chandramathi, S., Suresh, K., Sivanandam, S., Kuppusamy, U.R. (2014) Stress Exacerbates Infectivity and Pathogenicity of *Blastocystis hominis*: In Vitro and In Vivo Evidences. *PLoS ONE* 9: e94567
- Chandrasekaran, H., Govind, S.K., Panchadcharam, C., Bathmanaban, P., Raman, K., Thergarajan, G. (2014) High lipid storage in vacuolar forms of subtype 6 *Blastocystis* sp. in ostrich. *Parasit Vectors*.7: 469
- Chang, C., Miller, J.F. (2006) *Campylobacter jejuni* colonization of mice with limited enteric flora. *Infect Immun* 74: 5261–5271

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Chapman, S., Thompson, C., Wilcox, A., Russell K. (2009) What is your diagnosis? Rectal scraping from a dog with diarrhea. *Vet Clin Pathol* 38: 59-62
- Chen, X.Q., Singh, M., Ho, L.C., Tan, S.W., Ng, G.C., Moe, K.T., Yap, E.H. (1997) Description of a *Blastocystis* species from *Rattus norvegicus*. *Parasitol Res* 83: 313–318
- Cian, A., El Safadi, D., Nourrisson, C., Fréalle, E., Dutoit, E., Wawrzyniak, I., Gantois, N., Delbac, F., Chabé, M., Certad, G., Poirier, P., Viscogliosi, E. (2016) *Blastocystis*, un protozoaire entérique émergent. *Feuillets de Biologie* 331: 55-68
- Cian, A., El Safadi, D., Osman, M., Moriniere, R., Gantois, N., Benamrouz-Vanneste, S., Delgado-Viscogliosi, P., Guyot, K., Li, L.L., Monchy, S., et al. (2017) Molecular Epidemiology of *Blastocystis* sp. in Various Animal Groups from Two French Zoos and Evaluation of Potential Zoonotic Risk. *PLoS ONE* 12: e0169659
- Clark, C.G., Van der Giezen, M., Alfellani, M.A., Stensvold, C.R. (2013) Recent developments in *Blastocystis* research. *Adv Parasitol* 82: 1–32
- Clark, C.G., Berry, C., Walker, M., Petkau, A., Barker, D.O.R., Guan, C., Reimer, A., Taboada, E.N. (2016) Genomic insights from whole genome sequencing of four clonal outbreak *Campylobacter jejuni* assessed within the global *C. jejuni* population. *BMC Genomics* 17: 990
- Cody, A.J., McCarthy, N.D., Jansen van Rensburg, M., Isinkaye, T., Bentley, S.D., Parkhill, J., Dingle, K.E., Bowler, I.C.J.W., Jolley, K.A., Maiden, M.C.J. (2013) Real-time genomic epidemiological evaluation of human *Campylobacter* isolates by use of whole-genome multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 51: 2526–2534
- Colles, F.M., Maiden, M.C.J. (2012) *Campylobacter* sequence typing databases: applications and future prospects. *Microbiology* 158: 2695–2709
- Conlan, A.J.K., Line, J.E., Hiett, K., Coward, C., Van Diemen, P.M., Stevens, M.P., Jones, M.A., Gog, J.R., Maskell, D.J. (2011) Transmission and dose-response experiments for social animals: a reappraisal of the colonization biology of *Campylobacter jejuni* in chickens. *J R Soc Interface* 8: 1720–1735
- Coyle, C.M., Varughese, J., Weiss, L.M., Tanowitz HB. (2012) *Blastocystis*: to treat or not to treat... *Clin Infect Dis* 54: 105–110

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Cruz Licea, V., Plancarte Crespo, A., Morán Álvarez, C., Valencia Rojas, S., Rodriguez Sasnchez, G., Vega Franco, L. (2003) *Blastocystis hominis* among food vendors in xochimilco markets. *Rev Latinoam Microbiol* 45: 12–5
- Dabboussi, F., Alam, S., Mallat, H., Hlais, S., Hamze, M. (2012) Preliminary study on the prevalence of *Campylobacter* in childhood diarrhoea in north Lebanon. *EMHJ* 18: 1225-1228
- D’Alfonso, R., Santoro, M., Essi, D., Monsia, A., Kaboré, Y., Glé, C., Di Cave, D., Sorge, R.P., Di Cristanziano, V., Berrilli, F. (2017) *Blastocystis* in Côte d’Ivoire: molecular identification and epidemiological data. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 36: 2243–2250
- Deckert, A.E., Taboada, E., Mutschall, S., Poljak, Z., Reid-Smith, R.J., Tamblyn, S., Morrell, L., Seliske, P., Jamieson, F.B., Irwin, R., et al. (2014) Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* human and chicken isolates from two health units. *Foodborne Pathog Dis* 11: 150–155
- Denis, M., C. Soumet, K. Rivoal, G. Ermel, D. Blivet, G. Salvat, Colin, P. (1999) Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Lett Appl Microbiol* 29: 406–410
- Denoëud, F., Roussel, M., Noel, B., Wawrzyniak, I., Da Silva, C., Diogon, M., Viscogliosi, E., Brochier-Armanet, C., Couloux, A., Poulain, J., et al. (2011) Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biol* 12: R29
- Dhillon, A.S., Shivaprasad, H.L., Schaberg, D., Wier, F., Weber, S., Bandli, D. (2006) *Campylobacter jejuni* infection in broiler chickens. *Avian Dis* 50: 55–58
- Dingle, K.E., Colles, F.M., Wareing, D.R.A., Ure, R., Fox, A.J., Bolton, F.E., Bootsma, H.J., Willems, R.J.L., Urwin, R., Maiden, M.C.J. (2001) Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 39: 14–23
- Dogan, N., Aydin, M., Tuzemen, N.U., Dinleyici, E.C., Oguz, I., Dogruman-Al, F. (2017) Subtype distribution of *Blastocystis* spp. isolated from children in Eskisehir, Turkey. *Parasitol Int* 66: 948–951
- Doyle, L. (1944) A *vibrio* associated with swine dysentery. *Am J Vet Res* 5: 3–5
- Doyle, L.P. (1948) The etiology of swine dysentery. *Am J Vet Res* 9: 50–51

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Eberhart-Phillips, J., Walker, N., Garrett, N., Bell, D., Sinclair, D., Rainger, W., Bates, M. (1997) Campylobacteriosis in New Zealand: results of a case-control study. *J Epidemiol Community Health* 51: 686–691
- EFSA (2010) Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008. *EFSA J* 8: 1503
- EFSA (2011) Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain: *Campylobacter* in broiler meat. *EFSA J* 9: 2105
- EFSA, and ECDC (2015) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA J* 13: 3991
- EFSA, and ECDC (2016) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J*. 14: 4634
- EFSA, and ECDC (2017) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA J* 15: 5077
- El Safadi, D., Meloni, D., Poirier, P., Osman, M., Cian, A., Gaayeb, L., Wawrzyniak, I., Delbac, F., El Alaoui, H., Delhaes, L., Dei-Cas, E., Mallat, H., Dabboussi, F., Hamze, M., Viscogliosi, E. (2013) Molecular epidemiology of *Blastocystis* in Lebanon and correlation between subtype 1 and gastrointestinal symptoms. *Am J Trop Med Hyg* 88: 1203–1206
- El Safadi, D., Gaayeb, L., Meloni, D., Cian, A., Poirier, P., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Dabboussi, F., Delhaes, L., Seck, M., et al. (2014) Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infect Dis* 14: 164
- El Safadi, D., Cian, A., Nourrisson, C., Pereira, B., Morelle, C., Bastien, P., Bellanger, A.P., Botterel, F., Candolfi, E., Desoubeaux, G., et al. (2016). Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. from a large-scale multi-center study in France. *BMC Infectious Diseases* 16: 451
- Ellis-Iversen, J., Jorgensen, F., Bull, S., Powell, L., Cook, A.J., Humphrey, T.J. (2009) Risk factors for *Campylobacter* colonisation during rearing of broiler flocks in Great Britain. *Prev Vet Med* 89: 178–184



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Ellis-Iversen, J., Ridley, A., Morris, V., Sowa, A., Harris, J., Atterbury, R., Sparks, N., Allen, V. (2012) Persistent environmental reservoirs on farms as risk factors for *Campylobacter* in commercial poultry. *Epidemiol Infect* 140: 916–924
- Ellström, P., Feodoroff, B., Hänninen, M.L., Rautelin, H. (2013) Characterization of clinical *Campylobacter jejuni* isolates with special emphasis on lipooligosaccharide locus class, putative virulence factors and host response. *Int J Med Microbiol* 303: 134–139
- Ellström, P., Feodoroff, B., Hänninen, M.L., Rautelin, H. (2014) Lipooligosaccharide locus class of *Campylobacter jejuni*: sialylation is not needed for invasive infection. *Clin Microbiol Infect* 20: 524–529
- Eme, L., Gentekaki, E., Curtis, B., Archibald, J.M., Roger, A.J. (2017) Lateral Gene Transfer in the Adaptation of the Anaerobic Parasite *Blastocystis* to the Gut. *Current Biology* 27: 807–820
- Eroglu, F., Koltas, I.S. (2010) Evaluation of the transmission mode of *B. hominis* by using PCR method. *Parasitol Res* 107: 841–845
- Escherich, T. (1886) Ueber das Vorkommen von Vibrionen im Darmcanal und den Stuhlgängen der Säuglinge (On the existence of vibrios in the intestines and feces of babies). *Münch Med Wochenschr* 33: 815–817
- Evans, S.J., Sayers, A.R. (2000) A longitudinal study of *Campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain. *Prev Vet Med* 46: 209–223
- Fadlallah, S., El Hajj, R., El Hage, J., Nasser, Z., Ghosn, N., Ammar, W., Matar, G.M. (2018) Molecular epidemiology and antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* from caeca and carcass of poultry in Lebanon. *ACTA Sci Microbiol* 1: 63–70
- Faïs, T., Delmas, J., Serres, A., Bonnet, R., Dalmasso, G. (2016) Impact of CDT toxin on human diseases. *Toxins* 8: 220
- Farah Haziqah, M.T., Chandrawathani, P., Mohd Zain, S.N., Suresh Kumar, G., Hemalatha, C., Premaalatha, B. (2014) A preliminary study of *Blastocystis* sp. isolated from chicken in Perak and Selangor, *MJVR* 5: 21-25
- Fathy, FM. (2011). A study on *Blastocystis hominis* in food-handlers: diagnosis and potential pathogenicity. *J Egypt Soc Parasitol* 41: 433–453

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Fayer, R., Santin, M., Macarisin, D. (2012) Detection of concurrent infection of dairy cattle with *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* by molecular and microscopic methods. *Parasitol Res* 111: 1349–1355
- Feodoroff, B., Ellström, P., Hyytiäinen, H., Sarna, S., Hänninen, M.L., Rautelin, H. (2010) *Campylobacter jejuni* isolates in Finnish patients differ according to the origin of infection. *Gut Pathog* 2: 22
- Ferrero, R.L., Lee, A. (1988) Motility of *Campylobacter jejuni* in a viscous environment: Comparison with conventional rod-shaped bacteria. *Microbiology* 134: 53–59
- Forsell, J., Granlund, M., Samuelsson, L., Koskiniemi, S., Edebro, H., Evengård, B. (2016) High occurrence of *Blastocystis* sp. subtypes 1-3 and *Giardia intestinalis* assemblage B among patients in Zanzibar, Tanzania. *Parasit Vectors* 9: 370
- Forsell, J., Bengtsson-Palme, J., Angelin, M., Johansson, A., Evengård, B., Granlund, M. (2017) The relation between *Blastocystis* and the intestinal microbiota in Swedish travellers. *BMC Microbiol* 17: 231
- Fréalles, E., El Safadi, D., Cian, A., Aubry, E., Certad, G., Osman, M., Wacrenier, A., Dutoit, E., Creusy, C., Dubos, F., et al. (2015) Acute *Blastocystis*-associated appendicular peritonitis in a child, Casablanca, Morocco. *Emerg. Infect. Dis* 21: 91-94
- Furukawa, I., Ishihara, T., Teranishi, H., Saito, S., Yatsuyanagi, J., Wada, E., Kumagai, Y., Takahashi, S., Konno, T., Kashio, H., et al. (2017) Prevalence and characteristics of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail poultry meat in Japan. *Jpn J Infect Dis* 70: 239–247
- García-Sánchez, L., Melero, B., Jaime, I., Hänninen, M.L., Rossi, M., Rovira, J. (2017) *Campylobacter jejuni* survival in a poultry processing plant environment. *Food Microbiol* 65: 185–192
- Garénaux, A., Jugiau, F., Rama, F., de Jonge, R., Denis, M., Federighi, M., Ritz, M. (2008) Survival of *Campylobacter jejuni* strains from different origins under oxidative stress conditions: effect of temperature. *Curr Microbiol* 56: 293–297
- Ge, Z., Schauer, D.B., Fox, J.G. (2008) *In vivo* virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cell Microbiol* 10: 1599–1607

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Gentekaki, E., Curtis, B.A., Stairs, C.W., Klimeš, V., Eliáš, M., Salas-Leiva, D.E., Herman, E.K., Eme, L., Arias, M.C., Henrissat, B., et al. (2017) Extreme genome diversity in the hyper-prevalent parasitic eukaryote *Blastocystis*. *PLoS Biology* 15: e2003769
- Gharst, G., Oyarzabal, O.A., Hussain, S.K. (2013) Review of current methodologies to isolate and identify *Campylobacter* spp. from foods. *J Microbiol Methods* 95: 84–92
- Gil, G.S., Chaudhari, S., Shady, A., Caballes, A., Hong, J. (2016) *Blastocystis* sp. infection mimicking *Clostridium difficile* colitis. *Case Rep Infect Dis* 2016: 1–2
- Goe, A.M., Heard, D.J., Easley, J.R., Weeden, A.L., Childress, A.L., Wellehan, J.F. (2016) *Blastocystis* sp. and *Blastocystis ratti* in a Brazilian porcupine (*Coendou prehensilis*) with diarrhea. *J Zoo Wildl Med* 47: 640–644
- Gradel, K.O., Nielsen, H.L., Schönheyder, H.C., Ejlersen, T., Kristensen, B., Nielsen, H. (2009) Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after *Salmonella* or *Campylobacter* gastroenteritis. *Gastroenterology* 137: 495–501
- Gregory, E., Barnhart, H., Dreesen, D.W., Stern, N.J., Corn, J.L. (1997) Epidemiological study of *Campylobacter* spp. in broilers: source, time of colonization, and prevalence. *Avian Dis* 41: 890–898
- Greige, S., El Safadi, D., Bécu, N., Gantois, N., Pereira, B., Chabé, M., Benamrouz-Vanneste, S., Certad, G., El Hage, R., Chemaly, M., et al (2018) Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. isolates from poultry in Lebanon and evidence of zoonotic potential. *Parasit Vectors* 11: 389
- Gripp, E., Hlahla, D., Didelot, X., Kops, F., Maurischat, S., Tedin, K., Alter, T., Ellerbroek, L., Schreiber, K., Schomburg, D., et al. (2011) Closely related *Campylobacter jejuni* strains from different sources reveal a generalist rather than a specialist lifestyle. *BMC Genomics* 12: 584
- Guerry, P. (2007) *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol* 15: 456–461
- Guglielmetti, P., Cellesi, C., Figura, N., Rossolini, A. (1989) Family outbreak of *Blastocystis hominis* associated gastroenteritis. *Lancet* 2: 1394

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Gundogdu, O., Bentley, S.D., Holden, M.T., Parkhill, J., Dorrell, N., Wren, B.W. (2007) Re-annotation and re-analysis of the *Campylobacter jejuni* NCTC11168 genome sequence. *BMC Genomics* 8: 162
- Hajj Semaan, E., Dib, H., Mrad, R., Chami, C., Jalkh, R. (2014) Dynamic of *Campylobacter* species contamination along a poultry slaughtering chain. *Ital J Food Saf* 3: 2246
- Hald, B., Skovgard, H., Pedersen, K., Bunkenborg, H. (2008) Influxed insects as vectors for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Danish broiler houses. *Poult Sci* 87: 1428–1434
- Hald, B., Sommer, H.M., Skovgård, H. (2007) Use of fly screens to reduce *Campylobacter* spp. introduction in broiler houses. *Emerg Infect Dis* 13: 1951–1953
- Hamze, M., Dabboussi, F., Al-Ali, K., Ourabi, L. (2004) Prevalence of infection by intestinal parasites in north Lebanon: 1997-2001. *East Mediterr Health J* 10: 343-348
- Han, T.H., Park, S.H., Chung, J.Y., Jeong, H.W., Jung, J., Lee, J.I., Hwang, Y.O., Kim, I.Y., Lee, J.H., Jung, K. (2018) Detection of Pathogenic Viruses in the Ambient Air in Seoul, Korea. *Food Environ Virol* 10: 327–332
- Hanninen, M.L., Haajanen, H., Pummi, T., Wermundsen, K., Katila, M.L., Sarkkinen, H., Miettinen, I., Rautelin, H. (2003) Detection and typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and analysis of indicator organisms in three waterborne outbreaks in Finland. *Appl Environ Microbiol* 69: 1391–1396
- Havelaar, A.H., De Wit, M.A. Van Koningsveld, R., Van Kempen, E. (2000) Health burden in the Netherlands due to infection with thermophilic *Campylobacter* spp. *Epidemiol Infect* 125: 505–522
- Hazeleger, W.C., Wouters, J.A., Rombouts, F.M., Abee, T. (1998) Physiological Activity of *Campylobacter jejuni* far below the minimal growth temperature. *Appl Environ Microbiol* 64: 3917–3922
- Hazeleger, W.C., Bolder, N.M., Beumer, R.R., Jacobs-Reitsma, W.F. (2008) Darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) and their larvae as potential vectors for the transfer of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B Variant Java between successive broiler flocks. *Appl Environ Microbiol* 74: 6887–6891

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Helenbrook, W.D., Shields, W.M., Whipps, C.M. (2015) Characterization of *Blastocystis* species infection in humans and mantled howler monkeys, *Alouatta palliata aequatorialis*, living in close proximity to one another. *Parasitol Res* 114: 2517–2525
- Helms, M., Vastrup, P., Gerner-Smidt, P., Mølbak, K. (2003) Short and long term mortality associated with foodborne bacterial gastrointestinal infections: registry based study. *BMJ* 326: 357
- Hermans, D., Pasmans, F., Messens, W., Martel, A., Van Immerseel, F., Rasschaert, G., Heyndrickx, M., Van Deun, K., Haesebrouck, F. (2012) Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni*. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 12: 89–98
- Heuer, O.E., Pedersen, K., Andersen, J.S., Madsen, M. (2001) Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler flocks. *Lett Appl Microbiol* 33: 269–274
- Heydari-Hengami, M., Hamed, Y., Najafi-ASL, M., Sharifi-Sarasiabi, K. (2018) Prevalence of Intestinal Parasites in Food Handlers of Bandar Abbas, Southern Iran. *Iran J Public Health* 47: 111–118
- Ho, L.C., Jeyaseelan, K., Singh, M. (2001) Use of the elongation factor-1 $\alpha$  gene in a polymerase chain reaction-based restriction-fragment-length polymorphism analysis of genetic heterogeneity among *Blastocystis* species. *Mol Biochem Parasitol* 112: 287–291
- Hoevers, J., Holman, P., Logan, K., Hommel, M., Ashford, R., Snowden, K. (2000) Restriction-fragment-length polymorphism analysis of small-subunit rRNA genes of *Blastocystis hominis* isolates from geographically diverse human hosts. *Parasitol Res* 86: 57–61
- Horn, B., Lake, R. (2013) Incubation period for campylobacteriosis and its importance in the estimation of incidence related to travel. *Eurosurveillance* 18: 20602
- Hue, O., Le Bouquin, S., Laisney, M.J., Allain, V., Lalande, F., Petetin, I., Rouxel, S., Quesne, S., Gloaguen, P.Y., Picherot, M., et al. (2010) Prevalence of and risk factors for *Campylobacter* spp. contamination of broiler chicken carcasses at the slaughterhouse. *Food Microbiol* 27: 992–999
- Hue, O., V. Allain, M. J. Laisney, S. Le Bouquin, F. Lalande, I. Petetin, S. Rouxel, S. Quesne, P. Y. Gloaguen, M. Picherot, et al. (2011) *Campylobacter* contamination of broiler caeca and

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- carcasses at the slaughterhouse and correlation with *Salmonella* contamination. *Food Microbiol* 28: 862–868
- Hugdahl, M.B., Beery, J.T., Doyle, M.P. (1988) Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 56: 1560-1566
- Humphrey, T., O'Brien, S., Madsen, M. (2007) Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. *Int J Food Microbiol* 117: 237–257
- Hunter, P.R., Gaston, M.A. (1988) Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 26: 2465–2466
- Hussein, E.M., Hussein, A.M., Eida, M.M., Atwa, M.M. (2008) Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitol Res* 102: 853-860
- Iguchi, A., Ebisu, A., Nagata, S., Saitou, Y., Yoshikawa, H., Iwatani, S., Kimata, I. (2007) Infectivity of different genotypes of human *Blastocystis hominis* isolates in chickens and rats. *Parasitol Int* 56: 107-112
- Iovine, N.M. (2013) Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. *Virulence* 4: 230–240
- Ithoi, I., Jali, A., Mak, J.W., Wan Sulaiman, W.Y., Mahmud, R. (2011) Occurrence of *Blastocystis* in Water of Two Rivers from Recreational Areas in Malaysia. *J Parasitol Res* 2011: 1–8
- ISO (2017) Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Campylobacter* spp. Partie 1: Méthode de recherche. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:10272:-2:ed-1:v1:fr>.
- Jacobs-Reitsma, W.F., Van de Giessen, A.W., Bolder, N.M., Mulder, R.W.A.W. (1995) Epidemiology of *Campylobacter* spp. at two Dutch broiler farms. *Epidemiol Infect* 114: 413-421
- Jacobs-Reitsma, W.F. (1997) Aspects of epidemiology of *Campylobacter* in poultry. *Vet Q* 19: 113–117
- Jalallou, N., Irvani, S., Rezaeian, M., Alinaghizade, A., Mirjalali, H. (2017) Subtypes Distribution and Frequency of *Blastocystis* sp. Isolated from Diarrheic and Non-diarrheic Patients. *Iran J Parasitol* 12: 63–68

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Janarthanan, S., Khoury, N., Antaki, F. (2011) An unusual case of invasive *Blastocystis hominis* infection. *Endoscopy* 43: E185–E186
- Jeon, B., Muraoka, W.T., Zhang, Q. (2010) Advances in *Campylobacter* biology and implications for biotechnological applications. *Microb Biotechnol* 3: 242–258
- Johnsen, G., Kruse, H., Hofshagen, M. (2006) Genetic diversity and description of transmission routes for *Campylobacter* on broiler farms by amplified-fragment length polymorphism. *J Appl Microbiol* 101: 1130–1139
- Jones, M., 2nd, Ganac, R., Hiser, G., Hudson, N., Le, A., Whipps, C. (2008) Detection of *Blastocystis* from stool samples using real-time PCR. *Parasitol Res* 103: 551-557
- Jones, F.S., Orcutt, M., Little, R.B. (1931) Vibrios (*Vibrio jejuni*, N.sp.) associated with intestinal disorders of cows and calves. *J Exp Med* 53: 853–863
- Jonsson, M.E., Chriél, M., Norström, M., Hofshagen, M. (2012) Effect of climate and farm environment on *Campylobacter* spp. colonisation in Norwegian broiler flocks. *Prev Vet Med* 107: 95–104
- Kaczmarek, A., Gołąb, E., Żarnowska-Prymek, H., Rawska, A., Jańczak, D., Lewicki, A., Wesołowska, M., Rozej-Bielicka, W., Cielecka, D., Sałamatın, R. (2017) Genetic diversity of *Blastocystis hominis* sensu lato isolated from humans in Poland. *Problems of infections* 71: 539–546
- Kalousova, B., Piel, AK., Pomajbikova, K., Modry, D., Stewart, FA., Petrzekova, KJ. (2014) Gastrointestinal parasites of savanna chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in Ugalla, Tanzania. *Int J Primatol* 35: 463-475
- Kanungpean, D., Kakuda, T., Takai, S. (2011) Participation of CheR and CheB in the chemosensory response of *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* 157: 1279–1289
- Kapperud, G., Skjerve, E., Vik, L., Hauge, K., Lysaker, A., Aalmen, I., Ostroff, S.M., Potter, M. (1993) Epidemiological investigation of risk factors for *Campylobacter* colonization in Norwegian broiler flocks. *Epidemiol Infect* 111: 245–256
- Karadag, G., Tamer, GS., Dervisoglu, E. (2013) Investigation of intestinal parasites in dialysis patients. *Saudi Med J* 34: 714-718

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Karaman, U., Koloren, Z., Ayaz, E., Demirel, E., Seferoglu, O. (2017) The Protozoa and helminths in the water of Terme and Kocaman Boroughs of Samsun Province. *J Turgut Ozal Med Cent* 24: 472-6
- Karenlampi, R., Rautelin, H., Hakkinen, M., Hanninen, M.L. (2003) Temporal and geographical distribution and overlap of penner heat-stable serotypes and pulsed-field gel electrophoresis genotypes of *Campylobacter jejuni* isolates collected from humans and chickens in Finland during a Seasonal Peak. *J Clin Microbiol* 41: 4870–4872
- Karenlampi, R., Rautelin, H., Schonberg-Norio, D., Paulin, L., Hanninen, M.L. (2007) Longitudinal study of Finnish *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates from humans, using Multilocus Sequence Typing, including comparison with epidemiological data and isolates from poultry and cattle. *Appl Environ Microbiol* 73: 148–155
- Katsarou-Katsari, A., Vassalos, CM., Tzanetou, K., Spanakos, G., Papadopoulou, C., Vakalis, N. (2008) Acute urticaria associated with amoeboid forms of *Blastocystis* sp. subtype 3. *Acta Derm Venereol* 88: 80-81
- Khademvatan, S., Masjedizadeh, R., Rahim, F., Mahbodfar, H., Salehi, R., Yousefi-Razin, E., Foroutan, M. (2017) Blastocystis and irritable bowel syndrome: Frequency and subtypes from Iranian patients. *Parasitol Int* 66: 142–145
- Khalifa, A.M., El Temsahy, M.M., Abou El Naga, I.F. (2001) Effect of ozone on the viability of some protozoa in drinking water. *J Egypt Soc Parasitol* 31: 603– 616
- Kirk, M.D., Pires, S.M., Black, R.E., Caipo, M., Crump, J.A., Devleeschauwer, B., Döpfer, D., Fazil, A., Fischer-Walker, C.L., Hald, T., et al. (2015) World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: A data synthesis. *Plos Med* 12: e1001921
- Klančnik, A., Guzej, B., Jamnik, P., Vučković, D., Abram, M., Možina, S.S. (2009) Stress response and pathogenic potential of *Campylobacter jejuni* cells exposed to starvation. *Res Microbiol* 160: 345–352
- Koloren, Z., Gulabi, B.B., Karanis, P. (2018) Molecular identification of *Blastocystis* sp. subtypes in water samples collected from Black sea, Turkey. *Acta Trop* 180: 58-68



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Koltas, I.S., Akyar, I., Elgun, G., Kocagoz, T. (2014) Feconomics®; a new and more convenient method, the routine diagnosis of intestinal parasitic infections. *Parasitol Res* 113: 2503-2508
- Konkel, M.E., Klena, J.D., Rivera-Amill, V., Monteville, M.R., Biswas, D., Raphael, B., Mickelson, J. (2004) Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *J Bacteriol* 186: 3296–3303
- Krause-Gruszczynska, M., Van Alphen, L.B., Oyarzabal, O.A., Alter, T., Hänel, I., Schliephake, A., König, W., van Putten, J.P.M., Konkel, M.E., Backert, S. (2007) Expression patterns and role of the CadF protein in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol Lett* 274: 9–16
- Kumarasamy, V., Roslani, AC., Rani, K.U., Kumar Govind, S. (2014) Advantage of using colonic washouts for *Blastocystis* detection in colorectal cancer patients. *Parasit Vectors* 3: 162
- Kurniawan, A., Karyadi, T., Dwintasari, S., Sari, I., Yuniastuti, E., Djauzi, S., Smith, H.V. (2009) Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhoea in Jakarta, Indonesia. *Tran. R So. Tro. Me. Hyg* 103: 892-898
- Lee, I.L., Tan, T.C., Tan, P.C., Nanthiney, D.R., Biraj, M.K., Surendra, K.M., Suresh, K.G. (2012) Predominance of *Blastocystis* sp. subtype 4 in rural communities, Nepal. *Parasitol Res* 110: 1553–1562
- Lee, H., Lee, S.H., Seo, M.G., Kim, H.Y., Kim, J.W., Lee, Y.R., Kim, J.H., Kwon, O.D., Kwak, D. (2018). Occurrence and genetic diversity of *Blastocystis* in Korean cattle. *Vet Parasitol* 258: 70–73
- Lee, M.G., Stenzel, D.J. (1999) A survey of *Blastocystis* in domestic chickens. *Parasitol Res* 85: 109-117
- Leelayoova, S., Siripattanapipong, S., Thathaisong, U., Naaglor, T., Taamasri, P., Piyaraj, P., Mungthin, M. (2008) Drinking water: a possible source of *Blastocystis* spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 79: 401–406
- Lepczynska, M., Chen, W.C., Dzika, E. (2015) Mysterious chronic urticarial caused by *Blastocystis* spp.? *Int. J. Dermatol* 55: 259-266

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Lepczyńska, M., Białkowska, J., Dzika, E., Piskorz-Ogórek, K., Korycińska, J. (2017) *Blastocystis*: how do specific diets and human gut microbiota affect its development and pathogenicity? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 36: 1531–1540
- Levesque, S., Frost, E., Arbeit, R.D., Michaud, S. (2008) Multilocus Sequence Typing of *Campylobacter jejuni* isolates from humans, chickens, raw milk, and environmental water in Quebec, Canada. *J Clin Microbiol* 46: 3404–3411
- Levy, A.J. (1946) A Gastro-enteritis outbreak probably due to a bovine strain of *Vibrio*. *Yale J Biol Med* 18: 243-258
- Li, J., Deng, T., Li, X., Cao, G., Li, X., Yan, Y. (2013) A rat model to study *Blastocystis* subtype 1 infections. *Parasitol Res* 112: 3537–3541
- Li, L.H., Zhou, X.N., Du, Z.W., Wang, X.Z., Wang, L.B., Jiang, JY., Yoshikawa, H., Steinmann, P., Utzinger, J., Wu, Z., Chen, J.X., Chen, S.H., Zhang, L. (2007a) Molecular epidemiology of human *Blastocystis* in a village in Yunnan province, China. *Parasitol Int* 56: 281-286
- Li, L.H., Zhang, X.P., Lv, S., Zhang, L., Yoshikawa, H., Wu, Z., Steinmann, P., Utzinger, J., Tong, X.M., Chen, S.H., Zhou, X.N. (2007b) Cross-sectional surveys and subtype classification of human *Blastocystis* isolates from four epidemiological settings in China. *Parasitol Res* 102: 83–90
- Lin, J. (2009) Novel approaches for *Campylobacter* control in poultry. *Foodborne Pathog Dis* 6: 755–765
- Llanes, R., Somarriba, L., Velázquez, B., Núñez, F.A., Villafranca, C.M. (2016) Low prevalence of *Vibrio cholerae* O1 versus moderate prevalence of intestinal parasites in food-handlers working with health care personnel in Haiti. *Pathog Glob Health* 110: 30–32
- Llarena, A.K., Huneau, A., Hakkinen, M., Hänninen, M.L. (2015) Predominant *Campylobacter jejuni* sequence types persist in Finnish chicken production. *Plos ONE* 10: e0116585
- Llarena, A.K., Taboada, E., Rossi, M. (2017) Whole-genome sequencing in epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections. *J Clin Microbiol* 55: 1269–1275
- Loman, N.J., Pallen, M.J. (2015) Twenty years of bacterial genome sequencing. *Nat Rev Microbiol* 13: 787–794

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Louwen, R., Heikema, A., Van Belkum, A., Ott, A., Gilbert, M., Ang, W., Endtz, H.P., Bergman, M.P., Nieuwenhuis, E.E. (2008) The Sialylated Lipooligosaccharide Outer Core in *Campylobacter jejuni* Is an Important Determinant for Epithelial Cell Invasion. *Infect Immun* 76: 4431–4438
- Lyngstad, T.M., Jonsson, M.E., Hofshagen, M., Heier, B.T. (2008) Risk factors associated with the presence of *Campylobacter* species in Norwegian broiler flocks. *Poult Sci* 87: 1987–1994
- Maas, L., Dorigo-Zetsma, J.W., Groot, C.J. de, Bouter, S., Plötz, F.B., Ewijk, B.E. van (2014) Detection of intestinal protozoa in paediatric patients with gastrointestinal symptoms by multiplex real-time PCR. *Clinical Microbiology and Infection* 20: 545–550
- Malheiros, A.F., Stensvold, C.R., Clark, C.G., Braga, G.B., Shaw, J.J. (2011) Molecular characterization of *Blastocystis* obtained from members of the indigenous Tapirapé ethnic group from the Brazilian Amazon region, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 85: 1050–1053
- Man, S.M. (2011) The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8: 669–685
- Mangen, M.J.J., Havelaar, A.H., Bernsen, R.A.J.A.M., Van Koningsveld, R., De Wit, G.A. (2005) The costs of human *Campylobacter* infections and sequelae in the Netherlands: A DALY and cost-of-illness approach. *Acta Agric Scand Sect C - Food Econ* 2: 35–51
- Marinou, I., Bersimis, S., Ioannidis, A., Nicolaou, C., Mitrousia-Ziouva, A., Legakis, N.J., Chatzipanagiotou, S. (2012) Identification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from animal sources. *Front Microbiol* 3: 58
- Mattiucci, S., Crisafi, B., Gabrielli, S., Paoletti, M., Cancrini, G. (2016) Molecular epidemiology and genetic diversity of *Blastocystis* infection in humans in Italy. *Epidemiol Infect* 144: 635–646
- McDowell, S.W.J., Menzies, F.D., McBride, S.H., Oza, A.N., McKenna, J.P., Gordon, A.W., Neill, S.D. (2008) *Campylobacter* spp. in conventional broiler flocks in Northern Ireland: Epidemiology and risk factors. *Prev Vet Med* 84: 261–276
- McFadyean, J., Stockman, S. (1913) Report of the departmental committee appointed by the board of agriculture and fisheries to inquire into epizootic abortion. Part III. Abortion in sheep. HMSO., London UK., P:1-64

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Meloni, D., Poirier, P., Mantini, C., Noel, C., Gantois, N., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Chabe, M., Delhaes, L., Dei-Cas, E., Fiori, P.L., El Alaoui, H., Viscogliosi, E. (2012) Mixed human intra- and inter-subtype infections with the parasite *Blastocystis* sp. *Parasitol Int* 61: 719–722
- Mezher, Z., Saccares, S., Marcianò, R., De Santis, P., Rodas, E.M.F., De Angelis, V., Condoleo, R. (2016) Occurrence of *Campylobacter* spp. in poultry meat at retail and processing plants' levels in central Italy. *Ital J Food Saf* 5: 5495
- Mihaljevic, R.R., Sikic, M., Klancnik, A., Brumini, G., Mozina, S.S., Abram, M. (2007) Environmental stress factors affecting survival and virulence of *Campylobacter jejuni*. *Microb Pathog* 43: 120–125
- Miljkovic-Selimovic, B., Babic, T., Kocic, B., Matkic, A., Ristic, L. (2014) Identification of *Campylobacter* species isolates with phenotypic methods and polymerase chain reaction. *Srp Arh Celok Lek* 142: 708–712
- Miljkovic-Selimovic, B., Babic, T., Kocic, B., Ristic, L., Milenkovic, T., Bogdanovic, D. (2017) Comparative genomic fingerprinting for the subtyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* biotypes. *Srp Arh Celok Lek* 145: 492–497
- Mirjalali, H., Abbasi, M.R., Naderi, N., Hasani, Z., Mirsamadi, E.S., Stensvold, C.R., Balaii, H., Asadzadeh Aghdaei, H., Zali, M.R. (2017) Distribution and phylogenetic analysis of *Blastocystis* sp. subtypes isolated from IBD patients and healthy individuals in Iran. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 36: 2335–2342
- Mirza, H., Tan K.S (2009) *Blastocystis* exhibits inter- and intra-subtype variation in cysteine protease activity. *Parasitol Res* 104: 355–361
- Mirza, H., Wu, Z., Kidwai, F., Tan, F.S.W. (2011a) A metronidazole-resistant isolate of *Blastocystis* spp. is susceptible to nitric oxide and downregulates intestinal epithelial inducible nitric oxide synthase by a novel parasite survival mechanism. *Infect immun* 79: 5019-5026
- Mirza, H., Teo, J.D.W., Upcroft, J., Tan, K.S.W. (2011b) A rapid, high-throughput viability assay for *Blastocystis* spp. reveals metronidazole resistance and extensive subtype-dependent variations in drug susceptibilities. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 637-648
- Moe, K.T., Singh, M., Howe, J., Ho, L.C., Tan, S.W., Ng, G.C., Chen, X.Q., Yap, E.H. (1996) Observations on the ultrastructure and viability of the cystic stage of *Blastocystis hominis* from human feces. *Parasitol Res* 82: 439–444

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Mohamed, R.T., El-Bali, M.A., Mohamed, A.A., Abdel-Fatah, M.A., EL-Malky, M.A., Mowafy, N.M., Zaghlool, D.A., Bakri, R.A., Al-Harthi, S.A. (2017) Subtyping of *Blastocystis* sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Makkah, Saudi Arabia. *Parasit Vectors* 10: 174
- Monteville, M.R. (2003) Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiology* 149: 153–165
- Moore, J.E., Barton, M.D., Blair, I.S., Corcoran, D., Dooley, J.S.G., Fanning, S., Kempf, I., Lastovica, A.J., Lowery, C.J., Matsuda, M., et al. (2006) The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Microbes Infect* 8: 1955–1966
- Moreno, Y., Moreno-Mesonero, L., Amorós, I., Pérez, R., Morillo, J.A., Alonso, J.L. (2018) Multiple identification of most important waterborne protozoa in surface water used for irrigation purposes by 18S rRNA amplicon-based metagenomics. *Int J Hyg Environ Heal* 221: 102–111
- Mori, M., Kuwabara, S., Yuki, N. (2012) Fisher syndrome: clinical features, immunopathogenesis and management. *Expert Rev Neurother* 12: 39–51
- Muhamadali, H., Weaver, D., Subaihi, A., AlMasoud, N., K. Trivedi, D., I. Ellis, D., Linton, D., Goodacre, R. (2016) Chicken, beams, and *Campylobacter*: rapid differentiation of foodborne bacteria via vibrational spectroscopy and MALDI-mass spectrometry. *Analyst* 141: 111–122
- Mullner, P., Spencer, S.E.F., Wilson, D.J., Jones, G., Noble, A.D., Midwinter, A.C., Collins-Emerson, J.M., Carter, P., Hathaway, S., French, N.P. (2009) Assigning the source of human campylobacteriosis in New Zealand: A comparative genetic and epidemiological approach. *Infect Genet Evol* 9: 1311–1319
- Mullner, P., Collins-Emerson, J.M., Midwinter, A.C., Carter, P., Spencer, S.E.F., Van Der Logt, P., Hathaway, S., French, N.P. (2010) Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* in a geographically isolated country with a uniquely structured poultry industry. *Appl Environ Microbiol* 76: 2145–2154
- Nachamkin, I. (2007) *Campylobacter jejuni*. *Food Microbiol Fundam Front* 3rd ed. ASM Press, Wash DC, 237–248

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Nachamkin, I., Szymanski, M.C., Blaser, J.M. (2008) *Campylobacter*, 3rd ed. *ASM Press*, Wash DC USA
- Newell, D.G., Fearnley, C. (2003) Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 69: 4343–4351
- Newell, D.G., Elvers, K.T., Dopfer, D., Hansson, I., Jones, P., James, S., Gittins, J., Stern, N.J., Davies, R., Connerton, I., et al. (2011) Biosecurity-based interventions and strategies to reduce *Campylobacter* spp. on poultry farms. *Appl Environ Microbiol* 77: 8605–8614
- Nieves-Ramírez, M.E., Partida-Rodríguez, O., Laforest-Lapointe, I., Reynolds, L.A., Brown, E.M., Valdez-Salazar, A., Morán-Silva, P., RojasVelázquez, L., Morien, E., Parfrey, L.W. et al. (2018) Asymptomatic Intestinal Colonization with Protist *Blastocystis* Is Strongly Associated with Distinct Microbiome Ecological Patterns. *mSystems* 3: e00007-18
- Nobile, C., Costantino, G.A.,R., Bianco, A., Pileggi, C., Pavia, M. (2013) Prevalence and pattern of antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. in poultry meat in Southern Italy *Food Control* 32: 715–718
- Noel, C., Peyronnet, C., Gerbod, D., Edgcomb, V.P., Delgado-Viscogliosi, P., Sogin, M.L., Capron, M., Viscogliosi, E., Zenner, L. (2003) Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from different hosts based on the comparison of small-subunit rRNA gene sequences. *Mol Biochem Parasitol* 126: 119–123
- Noel, C., Dufernez, F., Gerbod, D., Edgcomb, V.P., Delgado-Viscogliosi, P., Ho, L.C., Singh, M., Wintjens, R., Sogin, M.L., Capron, M., et al. (2005) Molecular Phylogenies of *Blastocystis* Isolates from Different Hosts: Implications for Genetic Diversity, Identification of Species, and Zoonosis. *J Clin Microbiol* 43: 348–355
- Noor Azian, M.Y., San, Y.M., Gan, C.C., Yusri, M.Y., Nurulsyamzawaty, Y., Zuhaizam, A.H., Maslawaty, M.N., Norparina, I., Vythilingam, I. (2007) Prevalence of intestinal protozoa in an aborigine community in Pahang, Malaysia. *Trop Biomed* 24: 55–62
- Noradilah, S.A., Lee, I.L., Anuar, T.S., Salleh, F.M., Abdul Manap, S.N.A., Mohd Mohtar, N.S.H., Azrul, S.M., Abdullah, W.O., Moktar, N. (2016) Occurrence of *Blastocystis* sp. in water catchments at Malay villages and Aboriginal settlement during wet and dry seasons in Peninsular Malaysia. *PeerJ* 4: e2541

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Noradilah, S.A., Moktar, N., Anuar, T.S., Lee, I.L., Salleh, F.M., Manap, S.N.A.A. Mohtar, N.S.H.M., Azrul, S.M., Abdullah, W.O., Nordin, A., et al. (2017) Molecular epidemiology of blastocystosis in Malaysia: does seasonal variation play an important role in determining the distribution and risk factors of *Blastocystis* subtype infections in the Aboriginal community? *Parasit Vectors* 10: 360
- Olkkola, S., Culebro, A., Juntunen, P., Hänninen, M.L., Rossi, M. (2016) Functional genomics in *Campylobacter coli* identified a novel streptomycin resistance gene located in a hypervariable genomic region. *Microbiology* 162: 1157–1166
- On, S.L.W., Nielsen, E.M., Engberg, J., Madsen, M. (1998) Validity of *Sma*I-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *Sal*I, *Kpn*I, and *Bam*HI polymorphisms: evidence of identical clones infecting humans, poultry, and cattle. *Epidemiol Infect* 120: 231–237
- Osman, M., Bories, J., El Safadi, D., Poirel, M.T., Gantois, N., Benamrouz-Vanneste, S., Delhaes, L., Hugonnard, M., Certad, G., Zenner, L., Viscogliosi, E. (2015) Prevalence and genetic diversity of the intestinal parasites *Blastocystis* sp. and *Cryptosporidium* spp. in household dogs in France and evaluation of zoonotic transmission risk. *Vet Parasitol* 214: 167–170
- Osman, M., El Safadi, D., Cian, A., Benamrouz, S., Nourrisson, C., Poirier, P., Pereira, B., Razakandrainibe, R., Pinon, A., Lambert, C., et al. (2016) Prevalence and Risk Factors for Intestinal Protozoan Infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among Schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLoS Negl Trop Dis* 10: e0004496
- Paboriboune, P., Phoumindr, N., Borel, E., Sourinphoumy, K., Phaxayaseng, S., Luangkhot, E., Sengphilom, B., Vansilalom, Y., Odermatt, P., Delaporte E., Etard, J.F., Rabodonirina, M. (2014) Intestinal parasitic infections in HIV-infected patients, Lao People's Democratic Republic. *PLoS One* 9: e91452
- Palyada, K., Threadgill, D., Stintzi, A. (2004) Iron acquisition and regulation in *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* 186: 4714–4729
- Parkar, U., Traub, R.J., Kumar, S., Mungthin, M., Vitali, S., Leelayoova, S., Morris, K., Thompson, R.C.A. (2007) Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. *Parasitology* 134: 359–367

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Parkar, U., Traub, R.J., Vitali, S., Elliot, A., Levecke, B., Robertson, I., Geurden, T., Steele, J., Drake, B., Thompson, R.C.A. (2010) Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Vet Parasitol* 169: 8–17
- Parkhill, J., Wren, B.W., Mungall, K., Ketley, J.M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R.M., Feltwell, T., Holroyd, S., et al. (2000) The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 403: 6
- Payot, S., Bolla, J.M., Corcoran, D., Fanning, S., Mégraud, F., Zhang, Q. (2006) Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Microbes Infect* 8: 1967–1971
- Pearson, A.D., Greenwood, M., Healing, T.D., Rollins, D., Shahamat, M., Donaldson, J., Colwell, R.R. (1993) Colonization of broiler chickens by waterborne *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 59: 987–996
- Pearson, A.D., Greenwood, M.H., Feltham, R.K., Healing, T.D., Donaldson, J., Jones, D.M., Colwell, R.R. (1996) Microbial ecology of *Campylobacter jejuni* in a United Kingdom chicken supply chain: intermittent common source, vertical transmission, and amplification by flock propagation. *Appl Environ Microbiol* 62: 4614–4620
- Pergola, S., Franciosini, M. P., Comitini, F., Ciani, M., De Luca, S., Bellucci, S., Menchetti, L., Casagrande Proietti, P. (2017) Genetic diversity and antimicrobial resistance profiles of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolated from broiler chicken in farms and at time of slaughter in central Italy. *J Appl Microbiol* 122: 1348–1356
- de Perio, M.A., Niemeier, R.T., Levine, S.J., Gruszynski, K., Gibbins, J.D. (2013) *Campylobacter* infection in poultry-processing workers, Virginia, USA, 2008–2011. *Emerg Infect Dis* 19: 286–288
- Pickett, C.L., Whitehouse, C.A. (1999) The cytolethal distending toxin family. *Trends Microbiol* 7: 292–297
- Pitkänen, T., Miettinen, I.T., Nakari, U.M., Takkinen, J., Nieminen, K., Siitonen, A., Kuusi, M., Holopainen, A., Hänninen, M.L. (2008) Faecal contamination of a municipal drinking water distribution system in association with *Campylobacter jejuni* infections. *J Water Health* 6: 365–376



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Poirier, P., Wawrzyniak, I., Albert, A., El Alaoui, H., Delbac, F., Livrelli, V. (2011) Development and Evaluation of a Real-Time PCR Assay for Detection and Quantification of *Blastocystis* Parasites in Human Stool Samples: Prospective Study of Patients with Hematological Malignancies. *J Clin Microbiol* 49: 975–983
- Popruk, S., Udonsom, R., Koompaong, K., Mahittikorn, A., Kusolsuk, T., Ruangsittichai, J., Palasuwan, A. (2015) Subtype Distribution of *Blastocystis* in Thai-Myanmar Border, Thailand. *Korean J Parasitol* 53: 13–19
- Potter, R.C., Kaneene, J.B., Hall, W.N. (2003) Risk factors for sporadic *Campylobacter jejuni* infections in rural Michigan: A prospective case–control study. *Am J Public Health* 93: 2118–2123
- Poulsen, C.S., Efunshile, A.M., Nelson, J.A., Stensvold, C.R. (2016) Epidemiological Aspects of *Blastocystis* Colonization in Children in Ilero, Nigeria. *Am J Trop Med Hyg* 95: 175–179
- Preston, A., Mandrell, R.E., Gibson, B.W., Apicella, M.A. (1996) The lipooligosaccharides of pathogenic gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol* 22: 139–180
- Puthia, M.K., Vaithilingam, A., Lu, J., Tan, K.S.W. (2005) Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. *Parasitol Res* 97: 386–389
- Puthia, M.K., Sio, S.W.S., Lu, J., Tan, K.S.W. (2006) *Blastocystis ratti* Induces Contact-Independent Apoptosis, F-Actin Rearrangement, and Barrier Function Disruption in IEC-6 Cells. *Infect Immun* 74: 4114–4123
- Puthia, M.K., Lu, J., Tan, K.S.W. (2008) *Blastocystis ratti* Contains Cysteine Proteases That Mediate Interleukin-8 Response from Human Intestinal Epithelial Cells in an NF- $\kappa$ B-Dependent Manner. *Eukaryot Cell* 7: 435–443
- Rajabally, Y.A., Durand, M.C., Mitchell, J., Orlikowski, D., Nicolas, G. (2015) Electrophysiological diagnosis of Guillain–Barré syndrome subtype: could a single study suffice? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 86: 115–119
- Rajamanikam, A., Kumar, S., Samudi, C., Kudva, M. (2018) Exacerbated symptoms in *Blastocystis* sp.-infected patients treated with metronidazole: two case studies. *Parasitol Res* 117: 2585–2590

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Ramírez, J.D., Sánchez, L.V., Bautista, D.C., Corredor, A.F., Flórez, A.C., Stensvold, C.R. (2014) *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infect Genet Evol* 22: 223–228
- Ramírez, J.D., Sánchez, A., Hernández, C., Flórez, C., Bernal, M.C., Giraldo, J.C., Reyes, P., López, M.C., García, L., Cooper, P.J., et al. (2016) Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. *Infect Genet Evol* 41: 32–35
- Refregier-Petton, J., Rose, N., Denis, M., Salvat, G. (2001) Risk factors for *Campylobacter* spp. contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. *Prev Vet Med* 50: 89–100
- Revez, J., Llarena, A.K., Schott, T., Kuusi, M., Hakkinen, M., Kivistö, R., Hänninen, M.L., Rossi, M. (2014b) Genome analysis of *Campylobacter jejuni* strains isolated from a waterborne outbreak. *BMC Genomics* 15: 768
- Revez, J., Zhang, J., Schott, T., Kivisto, R., Rossi, M., Hanninen, M.L. (2014a) Genomic variation between *Campylobacter jejuni* isolates associated with milk-borne-disease outbreaks. *J Clin Microbiol* 52: 2782–2786
- Rezaei Riabi, T., Mirjalali, H., Haghighi, A., Rostami Nejad, M., Pourhoseingholi, M.A., Poirier, P., Delbac, F., Wawrzyniak, I., Zali, M.R. (2018) Genetic diversity analysis of *Blastocystis* subtypes from both symptomatic and asymptomatic subjects using a barcoding region from the 18S rRNA gene. *Infect Genet Evol* 61: 119–126
- Ribas, A., Jollivet, C., Morand, S., Thongmalayvong, B., Somphavong, S., Siew, C.C., Ting, P.J., Suputtamongkol, S., Saensombath, V., Sanguankiat, S., et al. (2017) Intestinal Parasitic Infections and Environmental Water Contamination in a Rural Village of Northern Lao PDR. *Korean J Parasitol* 55: 523–532
- Richard, R., Ithoi, I., Abd Majid, M., Wan Sulaiman, W., Tan, T., Nissapatorn, V., Lim, Y. (2016) Monitoring of Waterborne Parasites in Two Drinking Water Treatment Plants: A Study in Sarawak, Malaysia. *Int. J. Environ. Res. Pub He* 13: 641
- Rivero-Rodríguez, Z., Hernández, A., Bracho, Á., Salazar, S., Villalobos, R. (2013) Prevalence of intestinal microsporidia and other intestinal parasites in hiv positive patients from Maracaibo, Venezuela. *Biomedica* 33: 538-545

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Rivoal, K., Denis, M., Salvat, G., Colin, P., Ermel, G. (1999) Molecular characterization of the diversity of *Campylobacter* spp. isolates collected from a poultry slaughterhouse: analysis of cross-contamination. *Lett Appl Microbiol* 29: 370–374
- Roberts, I.S. (1996) The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 50: 285–315
- Roberts, J.A., Cumberland, P., Sockett, P.N., Wheeler, J., Rodrigues, L.C., Sethi, D., Roderick, P.J. (2003) The study of infectious intestinal disease in England: socio-economic impact. *Epidemiol Infect* 130: 1–11
- Roberts, T., Barratt, J., Harkness, J., Ellis, J., Stark, D. (2011) Comparison of Microscopy, Culture, and Conventional Polymerase Chain Reaction for Detection of *Blastocystis* sp. in Clinical Stool Samples. *Am J Trop Med Hyg* 84: 308–312
- Roberts, T., Stark, D., Harkness, J., Ellis, J. (2013) Subtype distribution of *Blastocystis* isolates identified in a Sydney population and pathogenic potential of *Blastocystis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32: 335–343
- Roberts, T., Stark, D., Harkness, J., Ellis, J. (2014) Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathog* 6: 17
- Rodrigues, L.C., Cowden, J.M., Wheeler, J.G., Sethi, D., Wall, P.G., Cumberland, P., Tompkins, D.S., Hudson, M.J., Roberts, J.A., Roderick, P.J. (2001) The study of infectious intestinal disease in England: risk factors for cases of infectious intestinal disease with *Campylobacter jejuni* infection. *Epidemiol Infect* 127: 185–193
- Rojas-Velázquez, L., Morán, P., Serrano-Vázquez, A., Fernández, L.D., Pérez-Juárez, H., Poot-Hernández, A.C., Portillo, T., González, E., Hernández, E., Partida-Rodríguez, O., et al. (2018) Genetic Diversity and Distribution of *Blastocystis* Subtype 3 in Human Populations, with Special Reference to a Rural Population in Central Mexico. *BioMed Res Int* 2018: 7
- Rollins, D.M., Colwell, R.R. (1986) Viable but non-culturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl Environ Microbiol* 52: 531–538
- Ruau, C.G., Stang, B.V. (2014) Prevalence of *Blastocystis* in shelter-resident and client-owned companion animals in the US Pacific Northwest. *PLoS ONE* 9: e107496

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Sahin, O., Kassem, I.I., Shen, Z., Lin, J., Rajashekara, G., Zhang, Q. (2015) *Campylobacter* in Poultry: Ecology and Potential Interventions. *Avian Dis* 59: 185–200
- Sails, A.D., Swaminathan, B., Fields, P.I. (2003) Clonal complexes of *Campylobacter jejuni* identified by multilocus sequence typing correlate with strain associations identified by multilocus enzyme electrophoresis. *J Clin Microbiol* 41: 4058–4067
- Salehi, R., Haghghi, A., Stensvold, C.R., Kheirandish, F., Azargashb, E., Raeghi, S., Kohansal, C., Bahrami, F. (2017) Prevalence and subtype identification of *Blastocystis* isolated from humans in Ahvaz, Southwestern Iran. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 10: 235–241
- Salim, H.R., Kumar, G.S., Vellayan, S., Mak, J.W., Anuar, A.K., Init, I., Vennila, G.D., Saminathan, R., Ramakrishnan, K. (1999) *Blastocystis* in animal handlers. *Parasitol Res* 85: 1032–1033
- Sanchez-Aguillon, F., Lopez-Escamilla, E., Velez-Perez, F., Martinez-Flores, W.A., Rodriguez-Zulueta, P., Martinez-Ocaña, J., Martinez-Hernandez, F., Romero-Valdovinos, M., Maravilla, P. (2013) Parasitic infections in a Mexican HIV/AIDS cohort. *J Infect Dev Ctries* 7: 763-766
- Sánchez, A., Munoz, M., Gómez, N., Tabares, J., Segura, L., Salazar, Á., Restrepo, C., Ruíz, M., Reyes, P., Qian, Y., et al. (2017) Molecular Epidemiology of *Giardia*, *Blastocystis* and *Cryptosporidium* among Indigenous Children from the Colombian Amazon Basin. *Front Microbiol* 8: 248
- Sankur, F., Ayturan, S., Malatyali, E., Ertabaklar, H., Ertug, S. (2017) The Distribution of *Blastocystis* Subtypes among School-aged Children in Mugla, Turkey. *Iran J Parasitol* 12: 580–586
- Santín, M., Gómez-Muñoz, M.T., Solano-Aguilar, G., Fayer, R. (2011) Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitol Res* 109: 205–212
- Santos, H.J., Rivera, W.L. (2013) Comparison of direct fecal smear microscopy, culture, and polymerase chain reaction for the detection of *Blastocystis* sp. in human stool samples. *Asian Pac J Trop Med* 6: 780-784

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M. (2011) Foodborne illness acquired in the United States - Major pathogens. *Emerg Infect Dis* 17: 7–15
- Scanlan, P.D. (2012) *Blastocystis*: past pitfalls and future perspectives. *Trends Parasitol.* 28: 327-334
- Scanlan, P.D., Stensvold, CR. (2013) *Blastocystis*: getting to grips with our guileful guest. *Trends Parasitol* 29: 523-529
- Scanlan, P.D., Stensvold, C.R., Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H.G.H.J., De Vos, W.M., O’Toole, P.W., Cotter, P.D. (2014) The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiol Ecol* 90: 326–330
- Scanlan, P.D., Stensvold, C.R., Cotter, P.D. (2015) Development and Application of a *Blastocystis* Subtype-Specific PCR Assay Reveals that Mixed-Subtype Infections Are Common in a Healthy Human Population. *Appl Environ Microbiol* 81: 4071–4076
- Scanlan, P.D., Knight, R., Song, S.J., Ackermann, G., Cotter, P.D. (2016) Prevalence and genetic diversity of *Blastocystis* in family units living in the United States. *Infect Genet Evol* 45: 95–97
- Scanlan, P., Hill, C., Ross, R., Ryan, C., Stanton, C., Cotter, P.D. (2018) The intestinal protist *Blastocystis* is not a common member of the healthy infant gut microbiota in a Westernized country (Ireland). *Parasitology* 145: 1274-1278
- Schulze, F., Hänel, I., Borrmann, E. (1998) Formation of cytotoxins by enteric *Campylobacter* in humans and animals. *Zent.bl. Bakteriol* 288: 225–236
- Scicluna, SM., Tawari, B., Clark, CG. (2006) DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist* 157: 77-85
- Sebald, M., Veron, M. (1963) Teneur en bases de l’ADN et classification des vibrions. *Ann Inst Pasteur* 105: 897–910
- Seyer, A., Karasartova, D., Ruh, E., Güreşer, A.S., Turgal, E., Imir, T., Ozkan, A.T. (2017) Epidemiology and Prevalence of *Blastocystis* spp. in North Cyprus. *Am J Trop Med Hyg* 96: 1164–1170

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Sheppard, S.K., Dallas, J.F., Strachan, N.J.C., MacRae, M., McCarthy, N.D., Wilson, D.J., Gormley, F.J., Falush, D., Ogden, I.D., Maiden, M.C.J., et al. (2009) *Campylobacter* genotyping to determine the source of human infection. *Clin Infect Dis* 48: 1072–1078
- Sheppard, S.K., Maiden, M.C.J. (2015) The Evolution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7: a018119
- Shulman, S.T., Moel, D. (1983) *Campylobacter* infection. *Pediatrics* 72: 437
- Sifré, E., Salha, B.A., Ducournau, A., Floch, P., Chardon, H., Mégraud, F., Lehours, P. (2015) EUCAST recommendations for antimicrobial susceptibility testing applied to the three main *Campylobacter* species isolated in humans. *J Microbiol Methods* 119: 206–213
- Silberman, J.D., Sogin, M.L., Leipe, D.D., Clark, C.G. (1996) Human parasite finds taxonomic home. *Nature* 380: 398–398
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P.A., Teixeira, P. (2011) *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: A review. *Front Microbiol* 2: 1-12
- Singh, M., Ho, L.C., Yap, A.L.L., Ng, G.C., Tan, S.W., Moe, K.T., Yap, E.H. (1996) Axenic culture of reptilian *Blastocystis* isolates in monophasic medium and speciation by karyotypic typing. *Parasitol Res* 82: 165–169
- Sinniah, B., Sabaridah, I., Soe, M.M., Sabitha, P., Awang, I.P.R., Ong, G.P., Hassan, A.K.R. (2012) Determining the prevalence of intestinal parasites in three Orang Asli (Aborigines) communities in Perak, Malaysia. *Trop Biomed* 29: 200–206
- Skirrow, M.B. (1977) *Campylobacter* enteritis: a “new” disease. *Br Med J* 2: 9–11
- Smith, T., Taylor, M.S. (1919) Some morphological and biological characters of the Spirilla (*Vibrio fetus*, N. Sp.) associated with disease of the fetal membranes in cattle. *J Exp Med* 30: 299–311
- Snelling, W.J., Matsuda, M., Moore, J.E., Dooley, J.S.G. (2005) *Campylobacter jejuni*. *Lett Appl Microbiol* 41: 297–302
- Stafford, R.J., Schluter, P., Kirk, M., Wilson, A., Unicomb, L., Ashbolt, R., Gregory, J., OzFoodNet Working Group. (2007) A multi-centre prospective case-control study of *Campylobacter* infection in persons aged 5 years and older in Australia. *Epidemiol Infect* 135: 978–988

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Stensvold, R., Brillowska-Dabrowska, A., Nielsen, H.V., Arendrup, M.C. (2006) Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *J Parasitol* 92: 1081-1087
- Stensvold, C.R., Suresh, G.K., Tan, K.S., Thompson, R.A., Traub, R.J., Viscogliosi, E., Yoshikawa, H., Clark, C.G. (2007a) Terminology for *Blastocystis* subtypes—a consensus. *Trends Parasitol* 23: 93–96
- Stensvold, C.R., Arendrup, M.C., Jespersgaard, C., Mølbak, K., Nielsen, H.V. (2007b) Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagn Microbiol Infect Dis* 59: 303–307
- Stensvold, C.R., Lewis, H.C., Hammerum, A.M., Porsbo, L.J., Nielsen, S.S., Olsen, K.E.P., Arendrup, M.C., Nielsen, H.V., Mølbak, K. (2009) *Blastocystis*: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. *Epidemiol Infect* 137: 1655–1663
- Stensvold, C.R., Ahmed, U.N., Andersen, L.O., Nielsen, H.V. (2012) Development and Evaluation of a Genus-Specific, Probe-Based, Internal-Process-Controlled Real-Time PCR Assay for Sensitive and Specific Detection of *Blastocystis* spp. *J Clin Microbiol* 50: 1847–1851
- Stensvold, C.R., Clark, C.G. (2016) Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitol Int* 65: 763–771
- Stensvold, C.R., Giezen, M. van der (2018) Associations between Gut Microbiota and Common Luminal Intestinal Parasites. *Trends Parasitol* 34: 369–377
- Stenzel, D.J., Cassidy, M.F., Boreham, P.F.L. (1994) Morphology of *Blastocystis* sp. from domestic birds. *Parasitol Res* 80: 131-7
- Stenzel, D.J., Boreham, P.F. (1996) *Blastocystis hominis* revisited. *Clin Microbiol Rev* 9: 563–584
- Storz, G., Imlay, J.A. (1999) Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol* 2: 188-194
- Strachan, N.J.C., MacRae, M., Thomson, A., Rotariu, O., Ogden, I.D., Forbes, K.J. (2012) Source attribution, prevalence and enumeration of *Campylobacter* spp. from retail liver. *Int J Food Microbiol* 153: 234–236

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Studahl, A., Andersson, Y. (2000) Risk factors for indigenous *Campylobacter* infection: a Swedish case-control study. *Epidemiol Infect* 125: 269–275
- Suerbaum, S., Lohrengel, M., Sonnevend, A., Ruberg, F., Kist, M. (2001) Allelic diversity and recombination in *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* 183: 2553–2559
- Suresh, K., Smith, H. (2004) Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 23: 509–511
- Suresh, K., Smith, H.V., Tan, T.C. (2005) Viable *Blastocystis* Cysts in Scottish and Malaysian Sewage Samples. *Appl Environ Microbiol* 71: 5619–5620
- Szymanski, C.M., King, M., Haardt, M., Armstrong, G.D. (1995) *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 Cells. *Infect Immun* 63: 4295–4300
- Taboada, E.N., Ross, S.L., Mutschall, S.K., MacKinnon, J.M., Roberts, M.J., Buchanan, C.J., Kruczkiewicz, P., Jokinen, C.C., Thomas, J.E., Nash, J.H.E., et al. (2012) Development and validation of a comparative genomic fingerprinting method for high-resolution genotyping of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 50: 788–797
- Taboada, E.N., Clark, C.G., Sproston, E.L., Carrillo, C.D. (2013) Current methods for molecular typing of *Campylobacter* species. *J Microbiol Methods* 95: 24–31
- Tai, W.P., Hu, P.J., Wu, J., Lin, X.C. (2011) Six ulcerative colitis patients with refractory symptoms co-infective with *Blastocystis hominis* in China. *Parasitol Res* 108: 1207–1210
- Talhouk, R., El-Dana, R., Araj, G., Barbour, E., Hashwa, F. (1998) Prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular characterization of *Campylobacter* isolates recovered from humans and poultry in Lebanon. *J Med Liban* 46: 310–316
- Tan, K.S.W. (2004) *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. *Vet Parasitol* 126: 121–144
- Tan T.C, Suresh K.G (2006a) Amoeboid form of *Blastocystis hominis*-a detailed ultrastructural insight. *Parasitol Res*. 99: 737–742
- Tan T.C, Suresh K.G (2006b) Predominance of amoeboid forms of *Blastocystis hominis* in isolates from symptomatic patients. *Parasitol Res*. 98: 189–193
- Tan, T.C., Suresh, K.G., Thong, K.L., Smith, H.V. (2006) PCR fingerprinting of *Blastocystis* isolated from symptomatic and asymptomatic human hosts. *Parasitol Res* 99: 459–465



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Tan, K.S.W. (2008) New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev* 21: 639–665
- Tan, K., Mirza, H., Teo, J., Wu, B., A Macary, P. (2010) Current Views on the Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Curr Infect Dis Rep* 12: 28–35
- Tan, T.C., Tan, P.C., Sharma, R., Sugnaseelan, S., Suresh, K.G. (2013) Genetic diversity of caprine *Blastocystis* from Peninsular Malaysia. *Parasitol Res* 112: 85–89
- Takizawa, M.D., Falavigna, D.L., Gomes, M.L. (2009) Enteroparasitosis and their ethnographic relationship to food handlers in a tourist and economic center in Paraná, Southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 51: 31-35
- Tenkate, T.D., Stafford, R.J. (2001) Risk factors for *Campylobacter* infection in infants and young children: a matched case-control study. *Epidemiol Infect* 127: 399–404
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B. (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233–2239
- Termmathurapoj, S., Leelayoova, S., Aimpun, P., Thathaisong, U., Nimmanon, T., Taamasri, P., Mungthin, M. (2004) The usefulness of short-term in vitro cultivation for the detection and molecular study of *Blastocystis hominis* in stool specimens. *Parasitol Res.* 93: 445-447
- Thathaisong, U., Siripattanapipong, S., Mungthin, M., Pipatsatitpong, D., Tan-ariya, P., Naaglor, T., Leelayoova, S. (2013) Identification of *Blastocystis* Subtype 1 Variants in the Home for Girls, Bangkok, Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 88: 352–358
- Thépault, A., Méric, G., Rivoal, K., Pascoe, B., Mageiros, L., Touzain, F., Rose, V., Béven, V., Chemaly, M., Sheppard, S.K. (2017) Genome-wide identification of host-segregating epidemiological markers for source attribution in *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 83: e03085–16
- Thépault, A., Guyard-Nicodème, M., Rose, V., Quesne, S., Queguiner, M., Houard, E., Mégraud, F., Rivoal, K., Chemaly, M. (2018a) A representative overview of the genetic diversity and lipooligosaccharide sialylation in *Campylobacter jejuni* along the broiler production chain in France and its comparison with human isolates. *Int J Food Microbiol* 274: 20–30

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Thépault, A., Rose, V., Quesne, S., Poezevara, T., Béven, V., Hirchaud, E., Touzain, F., Lucas, P., Méric, G., Mageiros, L., et al. (2018b) Ruminant and chicken: important sources of campylobacteriosis in France despite a variation of source attribution in 2009 and 2015. *Sci Rep* 8: 9305
- Thépault, A., Poezevara, T., Quesne, S., Rose, V., Chemaly, M., Rivoal, K. (2018c) Prevalence of thermophilic *Campylobacter* in cattle production at slaughterhouse level in France and link between *C. jejuni* bovine strains and Campylobacteriosis. *Front Microbiol* 9: 471
- Torralbo, A., Borge, C., Allepuz, A., García-Bocanegra, I., Sheppard, S.K., Perea, A., Carbonero, A. (2014) Prevalence and risk factors of *Campylobacter* infection in broiler flocks from southern Spain. *Prev Vet Med* 114: 106–113
- Udonsom, R., Prasertbun, R., Mahittikorn, A., Mori, H., Changbunjong, T., Komalamisra, C., Pintong, A., Sukthana, Y., Popruk, S. (2018) *Blastocystis* infection and subtype distribution in humans, cattle, goats, and pigs in central and western Thailand. *Infect genet Evol* 65: 107-111
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., De Ley, J. (1991) Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* Taxonomy: Emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 41: 88–103
- Vandamme, P., Debruyne, L., De Brandt, E., Falsen, E. (2010) Reclassification of *Bacteroides ureolyticus* as *Campylobacter ureolyticus* comb. nov., and emended description of the genus *Campylobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 2016–2022
- Van de Giessen, A.W., Bloemberg, B.P.M., Ritmeester, W.S., Tilburg, J.J.H.C. (1996) Epidemiological study on risk factors and risk reducing measures for *Campylobacter* infections in Dutch broiler flocks. *Epidemiol Infect* 117: 245–250
- Van Gool, T., Weijts, R., Lommerse, E., Mank, T.G. (2003) Triple Faeces Test: an effective tool for detection of intestinal parasites in routine clinical practice. *European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication Of The European Society Of Clinical Microbiology* 22: 284–290
- Vegosen, L., Breyse, P.N., Agnew, J., Gray, G.C., Nachamkin, I., Sheikh, K., Kamel, F., Silbergeld, E. (2015) Occupational exposure to swine, poultry, and cattle and antibody biomarkers of *Campylobacter jejuni* exposure and autoimmune peripheral neuropathy. *PLoS One* 10: e0143587

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Vennila, G.D., Kumar, G.S., Anuar, A.K., Rajah, S., Saminathan, R., Sivanandan, S., Ramakrishnan, K. (1999) Irregular shedding of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 85: 162–164
- Vinzent, R., Dumas, J., Picard, N. (1947) Septicémie grave au cours de la grossesse due à un *Vibron*. Avortement consécutif. *Bull Acad Nat Med* 131: 90–92
- Viswanathan, M., Pearl, D.L., Taboada, E.N., Parmley, E.J., Mutschall, S.K., Jardine, C.M. (2017) Cluster analysis of *Campylobacter jejuni* genotypes isolated from small and medium-sized mammalian wildlife and bovine livestock from Ontario farms. *Zoonoses Public Health* 64: 185–193
- Vogelberg, C., Stensvold, C.R., Monecke, S., Ditzen, A., Stopsack, K., Heinrich-Grafe, U., Pohlmann, C. (2010) *Blastocystis* sp. subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms. *Parasitol Int* 59: 469-471
- Waldenström, J., Broman, T., Carlsson, I., Hasselquist, D., Achterberg, R.P., Wagenaar, J.A., Olsen, B. (2002) Prevalence of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter coli* in different ecological guilds and taxa of migrating birds. *Appl Environ Microbiol* 68: 5911–5917
- Wang, J., Gong, B., Yang, F., Zhang, W., Zheng, Y., Liu, A. (2018) Subtype distribution and genetic characterization of *Blastocystis* in pigs, cattle, sheep and goats in northeastern China's Heilongjiang Province. *Infect Genet Evol* 57: 171-176
- Wang, W., Cuttell, L., Bielefeldt-Ohmann, H., Inpankaew, T., Owen, H., Traub, R.J. (2013) Diversity of *Blastocystis* subtypes in dogs in different geographical settings. *Parasites Vect* 6: 215
- Wang, W., Owen, H., Traub, R.J., Cuttell, L., Inpankaew, T., Bielefeldt-Ohmann, H. (2014) Molecular epidemiology of *Blastocystis* in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia. *Vet Parasitol* 203: 264–269
- Wang, Y., Taylor, D.E. (1990) Natural transformation in *Campylobacter* species. *J Bacteriol* 172: 949–955
- Wawrzyniak, I., Poirier, P., Viscogliosi, E., Dionigia, M., Texier, C., Delbac, F., El Alaoui, H. (2013) *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther Adv Infect Dis* 1: 167–178

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Wawrzyniak, I., Courtine, D., Osman, M., Hubans-Pierlot, C., Cian, A., Nourrisson, C., Chabe, M., Poirier, P., Bart, A., Polonais, V., et al. (2015) Draft genome sequence of the intestinal parasite *Blastocystis* subtype 4-isolate WR1. *Genomics Data* 4: 22–23
- Wedderkopp, A., Rattenborg, E., Madsen, M. (2000) National surveillance of *Campylobacter* in broilers at slaughter in Denmark in 1998. *Avian Dis* 44: 993–999
- WHO (ed.) (2011) Guidelines for drinking-water quality. 4th ed., World Health Organization, Geneva
- Williams, L.K., Jørgensen, F., Grogono-Thomas, R., Humphrey, T.J. (2009) Enrichment culture for the isolation of *Campylobacter* spp: Effects of incubation conditions and the inclusion of blood in selective broths. *Int J Food Microbiol* 130: 131–134
- Williams, L.K., Sait, L.C., Cogan, T.A., JøRgensen, F., Grogono-Thomas, R., Humphrey, T.J. (2012) Enrichment culture can bias the isolation of *Campylobacter* subtypes. *Epidemiol Infect* 140: 1227–1235
- Wilson, D.J., Gabriel, E., Leatherbarrow, A.J.H., Cheesbrough, J., Gee, S., Bolton, E., Fox, A., Fearnhead, P., Hart, C.A., Diggle, P.J. (2008) Tracing the source of campylobacteriosis. *PLoS Genet* 4: e1000203
- Wong, K.H.S., Ng, G.C., Lin, R.T.P., Yoshikawa, H., Taylor, M.B., Tan, K.S.W. (2008) Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore. *Parasitol Res* 102: 663–670
- Wu, G., Yishu, X., Gaolu, C., Guangming, L.M.L., Jinglin, Z. (2000) Investigation of an epidemic outbreak of blastocystiasis. *Chin J Parasitol Dis Control* 13: 25-27
- Wu, B., Yin, J., Texier, C., Roussel, M., Tan, K.S.W. (2010) *Blastocystis* legumain is localized on the cell surface, and specific inhibition of its activity implicates a pro-survival role for the enzyme. *J Biol Chem* 285: 1790–1798
- Wu, Z., Mirza, H., Teo, J.D., Tan, K.S. (2014a) Strain-dependent induction of human enterocyte apoptosis by *Blastocystis* disrupts epithelial barrier and ZO-1 organization in a caspase 3- and 9-dependent manner. *Biomed Res Int* 2014: 11
- Wu, Z., Mirza, H., Tan, K.S. (2014b) Intra-subtype variation in enteroadhesion accounts for differences in epithelial barrier disruption and is associated with metronidazole resistance in *Blastocystis* subtype-7. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2885

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Xu, F., Zeng, X., Haigh, R.D., Ketley, J.M., Lin, J. (2010) Identification and characterization of a new ferric enterobactin receptor, CfrB, in *Campylobacter*. *J Bacteriol* 192: 4425–4435
- Yamasaki, S., Asakura, M., Tsukamoto, T., Faruque, S.M., Deb, R., Ramamurthy, T. (2006) Cytolethal distending toxin (cdt): genetic diversity, structure and role in diarrheal disease. *Toxin Rev* 25: 61–88
- Yan, W., Chang, N., Taylor, D.E. (1991) Pulsed-field gel electrophoresis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genomic DNA and its epidemiologic application. *J Infect Dis* 163: 1068–1072
- Yoshikawa, H., Hayakawa, A. (1996a) Morphological changes in the central vacuole of *Blastocystis hominis* during in vitro culture. *Protoplasma* 194: 63–68
- Yoshikawa, H., Hayakawa, A. (1996b) Freeze-fracture cytochemistry of membrane cholesterol in *Blastocystis hominis*. *Int J Parasitol* 26: 1111–1114
- Yoshikawa, H., Nagano, I., Wu, Z., Yap, E.H., Singh, M., Takahashi, Y. (1998) Genomic polymorphism among *Blastocystis hominis* strains and development of subtype-specific diagnostic primers. *Mol Cell Probes* 12: 153–159
- Yoshikawa, H., Abe, N., Iwasawa, M., Kitano, S., Nagano, I., Wu, Z., Takahashi, Y. (2000) Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health care facilities. *J. Clin. Microbiol* 38: 1324–1330
- Yoshikawa, H., Wu, Z., Nagano, I., Takahashi, Y. (2003) Molecular comparative studies among *Blastocystis* isolates obtained from humans and animals. *J Parasitol* 89: 585–594
- Yoshikawa, H., Yoshida, K., Nakajima, A., Yamanari, K., Iwatani, S., Kimata, I. (2004a) Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. *Parasitol Res* 94: 391–396
- Yoshikawa, H., Wu, Z., Kimata, I., Iseki, M., Ali, I.K.M.D., Hossain, M.B., Zaman, V., Haque, R., Takahashi, Y. (2004b) Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitol Res* 92: 22–29

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Yoshikawa, H., Abe, N., Wu, Z. (2004c) PCR-based identification of zoonotic isolates of *Blastocystis* from mammals and birds. *Microbiol Read Engl* 150: 1147–1151
- Yoshikawa, H., Wu, Z., Pandey, K., Pandey, B.D., Sherchand, J.B., Yanagi, T., Kanbara, H. (2009) Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from children and rhesus monkeys in Kathmandu, Nepal. *Vet Parasitol* 160: 295–300
- Yoshikawa, H., Iwamasa, A. (2016) Human *Blastocystis* subtyping with subtype-specific primers developed from unique sequences of the SSU rRNA gene. *Parasitology International* 65: 785–791
- Yoshikawa, H., Tokoro, M., Nagamoto, T., Arayama, S., Asih, P.B.S., Rozi, I.E., Syafruddin, D. (2016) Molecular survey of *Blastocystis* sp. from humans and associated animals in an Indonesian community with poor hygiene. *Parasitol Int* 65: 780–784
- Yowang, A., Tsaousis, AD., Chumphonsuk, T., Thongsin, N., Kullawong, N., Popluechai, S., Gentekaki, E. (2018) High diversity of *Blastocystis* subtypes isolated from asymptomatic adults living in Chiang Rai, Thailand. *Infect Genet Evol* 65: 270-275
- Zanzani, S.A., Gazzonis, A.L., Epis, S., Manfredi, M.T. (2016) Study of the gastrointestinal parasitic fauna of captive non-human primates (*Macaca fascicularis*). *Parasitol Res* 115: 307–312
- Zautner, A.E., Johann, C., Strubel, A., Busse, C., Tareen, A.M., Masanta, W.O., Lugert, R., Schmidt-Ott, R., Groß, U. (2014) Seroprevalence of campylobacteriosis and relevant post-infectious sequelae. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33: 1019–1027
- Zhao, S., Tyson, G.H., Chen, Y., Li, C., Mukherjee, S., Young, S., Lam, C., Folster, J.P., Whichard, J.M., McDermott, P.F. (2016) Whole-genome sequencing analysis accurately predicts antimicrobial resistance phenotypes in *Campylobacter* spp. *Appl Environ Microbiol* 82: 459–466
- Zhou, J., Zhang, M., Yang, W., Fang, Y., Wang, G., Hou, F. (2016) A seventeen-year observation of the antimicrobial susceptibility of clinical *Campylobacter jejuni* and the molecular mechanisms of erythromycin-resistant isolates in Beijing, China. *Int J Infect Dis* 42: 28–33
- Zierdt, C.H. (1991) *Blastocystis hominis*—past and future. *Clin Microbiol Rev* 4: 61–79

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

Zierdt, C.H., Rude, W.S., Bull, B.S. (1967) Protozoan Characteristics of *Blastocystis Hominis*. *Am J Clin Pathol* 48: 495–501

Zilbauer, M., Dorrell, N., Wren, B.W., Bajaj-Elliott, M. (2008) *Campylobacter jejuni*-mediated disease pathogenesis: an update. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 123–129

Zimmer, M., Barnhart, H., Idris, U., Lee, M.D. (2003) Detection of *Campylobacter jejuni* strains in the water lines of a commercial broiler house and their relationship to the strains that colonized the chickens. *Avian Dis* 47: 101–107

Zweifel, C., Scheu, K.D., Keel, M., Renggli, F., Stephan, R. (2008) Occurrence and genotypes of *Campylobacter* in broiler flocks, other farm animals, and the environment during several rearing periods on selected poultry farms. *Int J Food Microbiol* 125: 182–187

# *Annexes*

---



## Annexe 1



RESEARCH ARTICLE

### Molecular Epidemiology of *Blastocystis* sp. in Various Animal Groups from Two French Zoos and Evaluation of Potential Zoonotic Risk

Amandine Cian<sup>1</sup>\*, Dima El Safadi<sup>1,2</sup>\*, Marwan Osman<sup>1,2</sup>\*, Romain Moriniere<sup>3</sup>, Nausicaa Gantois<sup>1</sup>, Sadia Benamrouz-Vanneste<sup>1,4</sup>, Pilar Delgado-Viscogliosi<sup>1</sup>, Karine Guyot<sup>1</sup>, Luen-Luen Li<sup>5</sup>, Sébastien Monchy<sup>5</sup>, Christophe Noël<sup>6</sup>, Philippe Poirier<sup>7</sup>, Céline Nourrisson<sup>7</sup>, Ivan Wawrzyniak<sup>7</sup>, Frédéric Delbac<sup>7</sup>, Stéphanie Bosc<sup>3</sup>, Magali Chabé<sup>1</sup>, Thierry Petit<sup>8</sup>, Gabriela Certad<sup>1,9</sup>, Eric Viscogliosi<sup>1\*</sup>

# ANNEXES

**Table 3.** Compilation of data in both the present study and in the literature at the time of publication relative to the *Blastocystis* sp. STs identified in different animal groups worldwide (modified and completed from Stensvold et al. [24] and Alfellani et al. [32]).

Host	<i>Blastocystis</i> sp. STs																	Mixed ST/ Untypable	Ref.		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17			NMASTs*	
<b>EUTHERIA</b>																					
<b>HUMANS (total)</b>	882	343	1399	318	9	89	118	10	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	225	[19]
<b>NON-HUMAN PRIMATES</b>																					
<b>Hominidae</b>	34	27	27	0	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	[32]
	13	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	4	[33]
	1	2	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Present study
<b>Hylobatidae</b>	12	8	3	0	2	0	0	7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	[32]
	2	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	Present study
<b>Cercopithecoidea</b>	76	48	73	0	4	0	0	1	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	19	[32]
	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[33]
	54	67	33	0	1	0	34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[43]
	7	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Present study
<b>Cebidae</b>	10	7	12	1	0	0	0	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	[32]
	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Present study
<b>Lemuridae</b>	4	2	0	4	0	0	0	3	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	[32]
	2	3	0	3	1	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Present study
<b>Others<sup>b</sup></b>	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[6]
	0	0	0	0	0	0	0	47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[44]
	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Present study
<b>Total</b>	223	178	157	11	32	0	36	84	0	2	7	0	5	0	4	0	0	0	0	28	
<b>CARNIVORA</b>																					
	8	3	6	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[19]
	11	1	0	2	1	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[51]
	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[70]
	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[6]
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	[52]
	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[37]
	1	2	4	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	[54]
	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Present study
<b>Total</b>	24	24	20	8	4	7	3	0	0	8	0	0	0	2	0	0	0	0	0	10	
<b>ARTIODACTYLA</b>																					
<b>Bovidae</b>	2	0	4	0	12	0	0	0	0	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[24]
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[26]
	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	[28]
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	[36]
	44	0	8	0	0	30	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[55]
	1	0	1	0	3	0	1	0	0	19	0	0	0	3	1	0	0	0	0	14	[19]
	12	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[6]
	0	0	4	0	11	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	[56]

(Continued)

## ANNEXES

Table 3. (Continued)

Host	<i>Blastocystis</i> sp. STs																Mixed ST/ Untypable	Ref.			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16			17	NMASTs <sup>a</sup>	
	0	0	1	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	Present study
Subtotal	59	0	26	0	26	34	31	0	0	69	0	0	0	10	1	0	0	0	0	22	
Suidae	150	7	6	0	54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[24]
	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[26]
	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	[26]
	3	0	2	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[33]
	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[19]
	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[71]
	9	0	7	0	217	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	[30]
	43	39	0	0	73	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[57]
Subtotal	205	46	15	0	377	2	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	
Others <sup>c</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[24]
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	[25]
	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	[33]
	5	0	6	0	21	0	0	0	0	8	0	0	2	3	1	0	0	0	0	7	[19]
	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	4	0	0	0	0	0	0	0	Present study
<b>Total</b>	<b>269</b>	<b>46</b>	<b>47</b>	<b>1</b>	<b>424</b>	<b>36</b>	<b>39</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>80</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>17</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>48</b>	
PERISSOSACTYLA																					
	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[19]
	0	1	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	Present study
<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	
PROBOSCIDEA																					
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	0	0	[19]
	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Present study
<b>Total</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>15</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
RODENTIA																					
	0	0	4	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	[19]
	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[6]
	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[57]
	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	Present study
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>17</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	
CHIROPTERA																					
	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Present study
MARSUPIALIA																					
	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0	2	0	0	0	0	0	[19]
	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[6]
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	Present study
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>25</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	
AVES																					
Anseriformes	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[19]
Galliformes	3	2	0	0	0	11	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	[19]
	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[57]

(Continued)

## ANNEXES

Table 3. (Continued)

Host	Blastocystis sp. STs																	Mixed ST/ Untypable	Ref.		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17			NMASTs <sup>a</sup>	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	Present study
Passeriformes	0	0	0	0	0	0	47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[6]
Others <sup>b</sup>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Present study
Ratites	0	2	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[19]
	0	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	[63]
	0	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Present study
Unidentified	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[19]
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>25</b>	<b>75</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>31</b>	
<b>SQUAMATA</b>																					
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	[67]
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	[20]
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Present study
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	
<b>TESTUDINATA</b>																					
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	[68]
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	[67]
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	[20]
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	Present study
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>0</b>	
<b>AMPHIBIA</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	[67]
<b>INSECTA</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	[22]
	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Present study
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	
<b>Grand total excluding humans</b>	<b>526</b>	<b>259</b>	<b>238</b>	<b>55</b>	<b>468</b>	<b>68</b>	<b>153</b>	<b>109</b>	<b>0</b>	<b>90</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>11</b>	<b>19</b>	<b>21</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>34</b>	<b>122</b>		

<sup>a</sup> Non Mammalian and Avian STs<sup>b</sup> Including Atelidae and Pitheciidae<sup>c</sup> Including Tragulidae, Giraffidae and Camelidae<sup>d</sup> Including Phoenicopteriformes

doi:10.1371/journal.pone.0169659.t003

dogs compared to domestic dogs could be attributed to greater exposure to fecal material from human and non-human hosts in their environment. Consequently, and in agreement with the present data, carnivores and especially Canidae do not seem to represent a significant source of *Blastocystis* sp. infection in humans [37,51].

Regarding artiodactyls, representatives of 5 families were sampled in our survey. Of the 21 samples sequence-positive for *Blastocystis* sp. by qPCR in this animal group, three presented mixed infections by two different STs (all with ST10 and ST14). Therefore, a total of 24 isolates were subtyped, and more than half of them (58.3%) belonged to ST10 (Table 2). The remaining isolates were identified as ST14 (33.3%), ST13 (4.2%) and ST3 (4.2%). Interestingly, three of the four families of Artiodactyla screened in our study (Camelidae, Giraffidae and Bovidae) were infected by ST10 and/or ST14. The fourth family, Tragulidae, was represented by a single