

CARACTERISATION DES SOUCHES DE *CAMPYLOBACTER* spp. ISOLEES DANS LA FILIERE DE PRODUCTION DU POULET LABEL ROUGE.

Rivoal Katell, Gorin Stéphane, Salvat Gilles et Ermel Gwennola

Centre National d'Etudes Vétérinaire et Alimentaire. Unité de recherche Hygiène et Qualité des Produits
Avicoles et Porcins, Beaucemaine - B.P 53
22440 Ploufragan

Résumé

Dans le cadre d'une étude portant sur les élevages avicoles Label Rouge, nous avons entrepris le suivi épidémiologique d'un de ces élevages pendant les 81 jours obligatoires, afin de déterminer les voies de contamination par *Campylobacter* des animaux. Les souches récoltées hebdomadairement ont été biotypées puis certaines ont été caractérisées par des méthodes de biologie moléculaire. 57 souches de *C.jejuni*, 196 de *C.coli* et 6 *C.lari* ont été analysées par RAPD avec l'amorce Camp 3881. Cette technique a donné des profils différents pour chaque espèce mais pas de discrimination intra-espèce. Par contre, la technique RFLP/ECP avec l'enzyme de restriction *Sma* I s'est montrée plus discriminante. Nous avons pu mettre en évidence 4 profils de *C.coli* sur 36 souches testées et 5 profils de *C.jejuni* sur les 34 testés. Les 6 souches de *C.lari* ont quant à eux donné un seul profil. La contamination en *Campylobacter* des animaux s'est montrée variable. Au début, des souches de *C.coli* sont en majorité isolées, ensuite en fin d'élevage ce sont des souches de *C.jejuni* qui ont été retrouvées chez les animaux. La technique RFLP/ECP nous permet de dire que les souches de *C.jejuni* montrent des caractéristiques identiques à des souches de *C.jejuni* isolées dans la terre. Le parcours peut donc être un facteur de contamination des poulets.

Introduction

Durant ces 20 dernières années, les *Campylobacter* thermophiles (principalement, *C.jejuni* et *C.coli*) ont été reconnus comme étant une cause majeure de gastro-entérite chez l'homme. Dans plusieurs pays occidentaux, l'incidence des campylobactérioses est même supérieure à celle des salmonelloses (Rapport de l'OMS de 1989 confirmé lors d'une consultation de cette organisation en 1994 à Bilthoven). La transmission de *Campylobacter* à l'homme se fait principalement par ingestion de viande contaminée et notamment de volailles. Les productions avicoles joueraient ainsi un rôle essentiel dans la dissémination de ces microorganismes, les volailles arrivant presque toutes contaminées à l'abattoir.

La détermination des voies de contamination est primordiale, afin de mettre en place un plan de maîtrise.

Malgré les diverses études épidémiologiques menées ces dernières années sur le sujet, l'origine de l'infection des poulaillers par *Campylobacter* reste indéterminée. Mais des points forts se dégagent de ces différentes études. La transmission verticale semble en effet pouvoir être éliminée (Van de Giessen *et al.*, 1992). Une étude de Shanker *et al.* en 1986 montrait déjà que les oeufs et les poussins provenant de poules infectées par *Campylobacter* étaient eux exempts de ce microorganisme. Mais ce sujet reste toujours

discuté, notamment dans une étude de Pearson *et al.* en 1996. Par ailleurs, des études expérimentales ont montré que dans des conditions naturelles les *Campylobacter* pénétraient très difficilement dans l'oeuf (Neil *et al.*, 1985; Clark et Bueschkens, 1986). La possibilité de transmission d'un lot contaminé au lot suivant, par des bactéries restées présentes dans le bâtiment, semble également pouvoir être écartée. En effet, les caractéristiques de survie et de croissance de *Campylobacter*, en particulier leur sensibilité à l'oxygène et à une atmosphère sèche, ainsi que les exigences de nettoyage, désinfection et vide sanitaire (minimum 3 semaines) demandées à ces élevages Label rendent très peu probable la persistance de *Campylobacter* dans le bâtiment d'une bande à l'autre. L'alimentation pourrait également être un vecteur contaminant des volailles : il a en effet été démontré que la contamination des volailles par *Campylobacter* par de l'aliment artificiellement contaminé était possible (Al Obaïdi, 1988). Mais la mise en évidence de *Campylobacter* dans de l'aliment n'a jamais été faite dans un élevage. Cette voie semble donc très peu probable mais reste à vérifier. L'eau a également souvent été citée comme voie possible de contamination des poulaillers. Mais la présence de *Campylobacter* dans des échantillons d'eau est difficile à montrer par les méthodes classiques. De plus, la présence de formes viables mais non cultivables (forme coccoïde) a souvent été rapportée mais le rôle joué par celles-ci est incertain.

L'hypothèse que nous avons retenue pour cette étude est la contamination du poulailler par des *Campylobacter* présents dans l'environnement extérieur au bâtiment. Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, nous avons entrepris le suivi épidémiologique d'un élevage Label Rouge pendant les 81 jours obligatoires de ce type d'élevage. Les souches récoltées (à l'intérieur et à l'extérieur) ont été identifiées biochimiquement et certaines caractérisées par une électrophorèse en Champs Pulsés (ECP) et par Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).

1. Matériels et Méthodes

1.1. Récolte des prélèvements - Isolement des *Campylobacter*

L'étude porte sur un poulailler de 400 m² avec un parcours herbeux de un hectare. L'élevage comporte 4 300 animaux (11 poulets au m²). La durée de l'élevage est de 81 jours. La sortie sur le parcours s'effectuant lorsque les poulets sont âgés de 42 jours. Une série de prélèvements a été effectuée hebdomadairement pendant 3 mois.

Le jour de la mise en place. 52 prélèvements comportant :

- des chiffonnettes du sol du magasin, des parois de porte, des parois des trappes de sortie sur la parcours et des pipettes.
- des échantillons de litière, d'aliment et d'eau (du réseau et des pipettes).
- des fonds de boîtes transportant les animaux en provenance du couvoir,
- des prélèvements de terre autour du bâtiment (près des portes) et sur le parcours.

ont été effectués.

Les semaines suivantes, le nombre de prélèvements a été ramené à 43. Deux sortes de prélèvements ont été réalisés :

- des prélèvements d'environnement :
 - chiffonnettes du sol du magasin et des parois des trappes à l'intérieur et à l'extérieur du bâtiment,
 - litière en profondeur,
 - terre aux portes du bâtiment et sur le parcours,
 - fèces bovines et fientes d'étourneaux,
- des prélèvements sur les poulets : échantillons de fientes obtenus par pression cloacale (4 lots de 10 animaux).

La recherche des *Campylobacter* thermotolérants a été faite selon la norme internationale ISO 10272.

Les milieux de culture utilisés étaient le milieu d'enrichissement de Preston et les milieux d'isolement de Virion et de Karmali.

1.2. Identifications biochimiques des *Campylobacter*

L'identification biochimique des *Campylobacter*s a été faite selon les tests classiques: oxydase, catalase, résistance/sensibilité à l'acide nalidixique et à la céfalotine, test de l'urée, la non fermentation des sucres, la réduction des nitrates, le test de la DNase. L'espèce *C. jejuni* a été caractérisée par l'hydrolyse de l'hippurate, *C. lari* par le test au TMAO. Le biotypage des différentes espèces a été fait selon le schéma de Lior (1984).

1.3. Caractérisations moléculaires des *Campylobacter*

1.3.1. RAPD avec l'amorce CAMP 3881

. Extraction de l'ADN

L'extraction a été faite par des kits rapides : Fisher Genomic. Les bactéries sont incubées pendant 18 à 24 heures sur gélose Karmali en atmosphère microaérophile puis reprises dans du tampon TN (Tris HCl 10mM pH 7.6 NaCl 1M). Après lavage par centrifugation, la densité optique ($\lambda = 600\text{nm}$) est ajustée à 12 (Spectrophotomètre UV 160A Shimadzu). Le protocole suivi est celui fourni avec les kits Fisher.

. PCR

L'amorce utilisée est l'amorce Camp 3881 (AAC GCG CAA C). La solution ADN précédemment obtenue est diluée au 1/50^{ème} dans du tampon TE (Tris HCl 10mM pH 7.6 EDTA 1mM). Un volume réactionnel de 15 μl est obtenu en mélangeant 1.6 μl de dNTP à 2.5 mM, 0.2 μl de BSA 100X, 2 μl de tampon 10X à 35 mM, 0.4 μl d'amorce Camp 3881 à 50 μM , 10.6 μl d'eau et 0.2 μl d'enzyme Taq polymérase à 5U/ μl (Boehringer). 5 μl d'échantillon d'ADN dilué sont ajoutés. L'amplification de l'ADN est faite par un appareil PERKIN ELMER 9600. Une dénaturation est réalisée pendant 2 min à 95°C, puis 3 cycles de (94°C 1min, 36°C 2 min, 72°C 2min 30) suivi de 40 cycles (94°C 15 sec, 56°C 45 sec, 72°C 1min) et finalement 72 °C pendant 10 min.

Ensuite, une électrophorèse est effectuée avec 10 μl sur gel d'agarose (1.5%) en présence de bromure d'éthidium dans un champ électrique de 2V/cm pendant 5h30. Le gel est photographié sous illumination UV.

1. 3. 2. RFLP : Digestion par Sma I et ECP

. Extraction en blocs d'agarose

Des cultures de 18 à 24 heures sur gélose Karmali sont mises en suspension dans 2 ml de TN. Après 2 lavages par centrifugation, la densité optique ($\lambda = 600$) de la suspension bactérienne est ajustée à 2.6 nm. 500 μ l de cette suspension sont mélangés à 500 μ l d'agarose à 1% dans du TN puis des blocs de 100 μ l sont coulés dans des moules spéciaux. Après solidification, ces blocs sont incubés dans une solution de lyse (EDTA 0.5M pH 8, Lauroyl Sarcosine 1%, Protéinase K 1mg/ml) pendant 48 heures à 50°C sous agitation. Après rinçage dans du TE, ils sont mis à 37°C pendant 2 heures sous agitation dans une solution de Pefabloc à 2mM. Une série de lavages dans du TE est effectuée. Les blocs sont conservés à 4°C dans du TE.

. Digestion enzymatique

Un quart de bloc est utilisé. Après une période d'équilibration dans le tampon adapté à l'enzyme, les blocs d'ADN sont digérés par l'enzyme *Sma* I pendant 5 heures.

. Electrophorèse à Champs Pulsés

L'électrophorèse est réalisée à l'aide d'un appareil CHEF DR III (Biorad) et d'un gel à 1% dans du TBE 0.5X (Tris 45mM Acide Borique 45mM EDTA 1mM) pendant 22 heures dans un champ électrique de 6V/Cm, un angle de 120°, un temps initial de 5 sec et un temps final de 40 sec.

Le gel est ensuite révélé par trempage dans un bain de bromure d'éthidium (0.5 μ g/ml) et photographié sous illumination UV.

2. Résultats et Discussion

2.1. Etude prospective

Au jour de la mise en place, tous les échantillons se sont révélés négatifs sauf 3 prélèvements de terre du parcours où des *C.coli* et des *C.jejuni* de biotype I ainsi que des *C.lari* ont été mis en évidence.

L'absence de *Campylobacter* dans les échantillons effectués à l'intérieur du bâtiment a conforté l'idée que les exigences de nettoyage, désinfection et de vide sanitaire ne permettaient pas la survie de ces microorganismes d'une bande à l'autre. De plus, le fait que les prélèvements faits sur les fonds de caisses de transport des poussins soient également négatifs confirme la très faible probabilité de transmission verticale.

Lors de la 2^{ème} semaine (les poulets étaient alors âgés de 8 jours), aucun échantillon n'a été retrouvé positif exceptés 2 prélèvements de terre du parcours qui comportaient des *C.coli* de biotype I et des *C.lari*.

Durant les 2 semaines suivantes, aucun échantillon n'a révélé la présence de *Campylobacter*, y compris ceux de terre. La 5^{ème} semaine, nous avons isolé des *C.jejuni* de biotype I des échantillons de fèces bovines.

Lors de la 6^{ème} série de prélèvements, les poulets alors âgés de 35 jours ont commencé à excréter des *Campylobacter* (3 pool sur 4 positifs). Des *Campylobacter* ont également été retrouvés dans des prélèvements effectués sur les trappes à l'intérieur du bâtiment ainsi que dans des fèces bovines et dans la terre du parcours. Les bactéries isolées des fientes des poulets sont des *C.coli* de biotype I et II. Celles isolées des trappes sont également des *C.coli* de biotype I. Nous y avons également isolé des *C.jejuni* I, comme dans les prélèvements de terre et de fèces bovines, avec une nette prédominance de *C.jejuni* pour ces derniers. La contamination à l'intérieur du bâtiment a donc eu lieu avant la sortie des poulets sur le parcours, cette sortie n'intervenant que la semaine suivante. La contamination ayant débuté, il fallait s'attendre à une propagation rapide à tout le poulailler et à tous les animaux, notamment par coprophagie.

Cela a été confirmé par les prélèvements (environnement et animaux) effectués les 2 semaines suivantes durant lesquelles des *C.coli* de biotype I, plus rarement de biotype II, et des *C.jejuni* de biotype I ont été isolés. La contamination étant maintenant généralisée, une dernière série de prélèvements a été réalisée le jour précédent le départ des poulets à l'abattoir. La contamination était toujours présente mais nous avons observé un changement : une augmentation des isollements de *C.jejuni* de biotype II.

2. 2. Caractérisation moléculaire

. RAPD

Les profils des 57 souches de *C.jejuni* obtenus avec la technique RAPD Camp 3881 étaient similaires. Le même type de résultats a été obtenu avec les 196 souches de *C.coli* testées. Cette amorce Camp 3881 qui avait donné des résultats satisfaisants avec des *Campylobacter* d'origine humaine n'a pas montré un pouvoir discriminant dans notre cas.

. RFLP/ECP

76 souches (36 *C.coli*, 34 *C.jejuni* et 6 *C.lari*) ont été analysées, les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

SOUCHES	Biotype	Origine(Date)	Profil ECP
C.coli 1,2,3,4,5,12,13,14,16	I	Terre (J0)	A
C.coli 13	I	Terre (J0)	B
C.coli 25	I	Terre (J0)	C
C.coli 47,48,49,55,57,59,123,130	I	Fientes (J35)	D
C.coli 74	I	Trappe (J35)	D
C.coli 56	II	Fientes (J35)	D
C.coli 450,453,454,520,526,532,538	I	Fientes (J49)	D
C.coli 490,495,500,510	I	Terre (J49)	D
C.coli 646,652,664	I	Fientes (J77)	D
C.coli 544,550	I	Terre (J77)	D
C.jejuni 6,10,18,19	I	Terre (J0)	A'
C.jejuni 37,41,43	I	Bouse (J28)	A'
C.jejuni 83,84,85,87,90,91,95	I	Terre (J35)	A'
C.jejuni 86,88,93,94	I	Terre (J35)	B'
C.jejuni 545,557,568	II	Terre (J77)	C'
C.jejuni 571,572,583,584,589,659,661	II	Fientes (J77)	C'
C.jejuni 579	I	Fientes (J77)	A'
C.jejuni 558	I	Terre (J77)	D'
C.jejuni 671	II	Bouse (J77)	E'
C.jejuni 684,685,687	II	Bouse (J84)	C'

Des profils spécifiques sont visualisés pour chaque espèce de *Campylobacter*. Ce type de résultats a déjà été observé, notamment par Yan *et al* en 1991.

Les 6 souches de *C.lari* isolés de prélèvements de terre au début de l'élevage présentent un profil identique par cette technique.

Pour les *C.coli*, 4 profils distincts ont été visualisés. Les souches provenant de prélèvements de terre réalisés aux alentours du bâtiment montrent 3 profils différents (A, B, C), tandis que le profil D regroupe les souches de *C.coli* isolées principalement dans les fientes prélevées directement sur les animaux. Il faut noter qu'à la fin de l'élevage ce profil est également isolé dans des prélèvements de terre. Cette technique, dans le cas présent, ne permet pas de différencier les souches de *C.coli* de biotype I de celles de biotype II.

En ce qui concerne les *C.jejuni*, 5 profils différents ont été observés. Le profil A' isolé dans des prélèvements de terre en début d'élevage (J0), avant la sortie des poulets sur le parcours, est également isolé dans des échantillons de fientes prélevés directement sur les animaux à la fin de l'élevage (J77). Le profil C' est aussi isolé dans ces deux types de prélèvements mais essentiellement à

la fin de la période d'élevage. Ce profil C' a également été trouvé dans la terre. Dans ce cas, comme dans le cas des souches de *C.coli* de profil D, rien ne permet d'affirmer que la terre est à l'origine de la contamination des animaux car la présence de ces profils a été observée le même jour.

Conclusion

La contamination en *Campylobacter* aux alentours du bâtiment était effective lors de la mise en place des animaux. Ceux-ci ont montré un portage en *Campylobacter* dès la 5^{ème} semaine d'élevage avant leur sortie sur le parcours. La RAPD avec l'amorce Camp 3881 n'a pas montré de pouvoir discriminant contrairement à la technique RFLP/ECP. Cette dernière a permis de montrer que les *C.coli* de l'extérieur et ceux présents chez les animaux ne sont pas identiques. Par contre, un profil de *C.jejuni* (A') isolé à J0 dans la terre a également été retrouvé chez les animaux, à la fin de l'élevage. Trois conclusions ressortent de cette étude. La contamination en *Campylobacter* peut évoluer, lors de la période d'élevage (augmentation notable d'isolements de *C.jejuni* de type II à la fin de l'élevage). De plus, il faut noter que les poulets peuvent être porteurs de souches différentes simultanément. D'autre part la terre peut pouvoir être un vecteur de contamination des animaux.

Références

- Al Obaïdi A.S.R., 1988. PhD thesis. University of Bristol.
- Clark A.G. and Buesckens D.H., 1985. Appl. Environ. Microbiol., 49 : 1467.
- Lior H., 1984. J. Clin. Microbiol. 20 : 636-640.
- Neil s., Campbell J.N. and O'Brien J.J., 1985. Av. Pathol. 14 : 313.
- Pearson A.D., Greenwood M.H., Fetham K.A., Healing T.D., Donalson J., Jones D.M. and Colwell R.R., 1996. Appl. Environ. Microbiol. 62. 12 : 4614-4620.
- Shanker S., Lee A. and Sorrell T.C., 1986. J. Hyg. 96 : 153.
- Van de Giessen A., Mazurier S.I., Jacobs-Reitsma W., Jansen W., Berkers P., Ritsmeester W., and Wernars K., 1992. Appl. Environ. Microbio., 58 : 1913-1917.
- Yan W., Chang T. and Taylor D.E., 1991. J. Infect. Dis. 163 : 1068-1072.