

Évaluation du portage gastrique en *Campylobacter sp.* des porcs charcutiers à l'abattoir

A.ROSSERO, n'G. KOFFI, Marie-France PILET, Florence JUGIAU, M. FEDERIGHI, Catherine MAGRAS

I.N.R.A.-E.N.V.N. - Unité Associée d'Hygiène Alimentaire,
École Nationale Vétérinaire, route de Gachet, BP 40706, 44307 Nantes Cedex 03

Évaluation du portage gastrique en *Campylobacter sp.* des porcs charcutiers à l'abattoir.

Une étude du portage gastrique en *Campylobacter sp.* a été réalisée sur 12 lots de 10 porcs charcutiers issus de 12 élevages différents provenant des régions Bretagne et Pays de Loire. Pour chaque animal trois prélèvements de l'estomac ont été effectués à l'abattoir. L'identification des souches de *Campylobacter* a été effectuée par des tests biochimiques ainsi que par une méthode d'amplification génique. Soixante cinq porcs (54%) étaient porteurs de *Campylobacter sp.* Néanmoins des variations dans le taux de contamination des élevages ont été observées. Les souches isolées ont toutes été identifiées comme appartenant à l'espèce *C. coli* par le test PCR.

Study of *Campylobacter sp.* gastric infection in pigs at slaughterhouse.

Twelve groups of 10 pigs, bred in 12 different farms in western France (Bretagne, Pays de Loire) were studied at slaughterhouse for *Campylobacter sp.* gastric infection. Gastric specimens were obtained from each animal. Identification of *Campylobacter* was performed by biochemical tests and polymerase chain reaction method (PCR). Sixty five pigs (54%) were positives for *Campylobacter sp.* Although various contamination rates of the farms were observed. All isolated strains were identified as *Campylobacter coli* by PCR method.

INTRODUCTION

Les *Campylobacter* sont des bactéries à coloration de Gram négative, mobiles, spiralées, à caractère mésophile, se développant toutes à 37°C. Parmi les 16 espèces répertoriées aujourd'hui, la plupart sont qualifiées de thermotolérantes. Elles ont en effet la particularité de pouvoir se développer également à 42°C. C'est à l'intérieur de ce groupe que se trouvent les 4 espèces d'intérêt en hygiène des aliments impliquées dans les toxi-infections. Par ordre de fréquence d'isolement chez les sujets infectés, ces 4 espèces sont : *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* et *C. upsaliensis*.

Les *Campylobacter* sont actuellement considérés comme l'une des causes majeures de gastro-entérite chez l'homme. Leur prévalence égale, voire dépasse, celle d'autres germes entéro-pathogènes tels *Salmonella* (WOODWARD communication personnelle, LCDC Ottawa). Le portage intestinal sain chez les animaux d'élevage conduit à l'existence de nombreux réservoirs animaux. Parmi ceux-ci, les volailles constituent le plus important (jusqu'à 100 % des animaux sont porteurs), viennent ensuite les réservoirs porcins et bovins. Pour l'espèce porcine, une étude réalisée dans un abattoir Hollandais fait état de 78,6 % de porcs porteurs de *Campylobacter* au niveau intestinal (OOSTEROM et al. 1983). D'une manière générale dans la plupart des travaux consacrés à cette espèce, *Campylobacter coli* est plus fréquemment isolé que les autres *Campylobacter* (FEDERIGHI et al., 1996). Différentes études ont également montré une contamination par les *Campylobacter* de leurs carcasses, de leurs abats (le foie) et des produits transformés (viande hâchée, chair à saucisse) (ADESIYUN et al., 1992 ; COLIN, 1985 ; KWIATEK et al., 1990 ; LAMMERDING et al., 1988 ; LAMMERDING et al., 1985 ; STERN 1981).

Les opérations de préparation de ces viandes à l'abattoir, et particulièrement l'éviscération, avec la section du tube digestif au niveau de l'estomac (cardia) peuvent contribuer très largement à la contamination externe des carcasses, des surfaces, des équipements et des outils. Si le portage intestinal en *Campylobacter* des porcs a été bien étudié, à notre connaissance, il n'en est pas de même de leur portage stomacal. Or celui-ci pourrait constituer une source de contamination moins maîtrisable à l'abattoir du fait de la pratique de l'éviscération. Notre étude a pour objectif d'évaluer le portage stomacal en *Campylobacter sp.* des porcs charcutiers, au moment de leur abattage et de caractériser ce portage par rapport aux 4 espèces de *Campylobacter* reconnues responsables de maladies alimentaires chez l'homme.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Réalisation des prélèvements stomacaux sur les porcs

1.1.1. Échantillonnage des animaux

Les prélèvements ont été effectués sur la chaîne d'abattage juste après l'éviscération, sur des porcs charcutiers en fin d'engraissement. Les prélèvements d'estomac ont été réalisés sur un total de 120 porcs, répartis en 12 lots de 10 animaux. Les lots sont constitués d'animaux, issus d'un même

élevage, et choisis au hasard sur la chaîne d'abattage parmi les animaux de cet élevage. Les élevages provenaient des régions Bretagne et Pays de Loire.

1.1.2. Prélèvement au niveau de l'estomac

Trois prélèvements ont été effectués au niveau de l'estomac :

- un en région péri-cardiale (site 1)
- un en région fundique (site 2).
- un en région pylorique (site 3).

Les prélèvements ont été placés dans un milieu de transport, acheminés sous régime du froid jusqu'au laboratoire et traités dans les heures suivantes (au maximum 24 heures).

2. RECHERCHE DES *CAMPYLOBACTER* THERMOTOLÉRANTS

Protocole d'isolement des *Campylobacter* à partir des prélèvements

Chacun des trois prélèvements d'un estomac est homogénéisé par malaxage, dans 3 ml de bouillon de Preston. Quelques gouttes de la suspension ainsi obtenue sont déposées respectivement sur deux boîtes de chacun des milieux suivants : gélose chocolat (Biokar), milieu gélosé de Skirrow (Oxoid), milieu gélosé de Karmali (Biokar). Les boîtesensemencées sont placées en incubation en atmosphère microaérobie à 37°C et 42°C, et lues toutes les 24 heures, au maximum jusqu'au sixième jour. Après incubation, chaque colonie suspecte repérée sur une boîte est prélevée pour réaliser une coloration de Gram, un état frais et des tests biochimiques rapides (recherche de l'activité oxydase, catalase et uréase). Toute colonie présentant les caractéristiques morphologiques et biochimiques des *Campylobacter* est repiquée afin d'isoler la souche. Chaque souche isolée est ensuite conservée à -80°C pour l'identification de l'espèce bactérienne.

3. IDENTIFICATION DES SOUCHES DE *CAMPYLOBACTER SP.* ISOLÉES

L'identification des souches de *Campylobacter sp.* est effectuée d'une part par des tests biochimiques, d'autre part par une méthode d'amplification génique en chaîne PCR (Polymerase Chain Reaction).

3.1. Identification biochimique

Toutes les souches bactériennes isolées, spiralées et à coloration de Gram négative, font l'objet d'une identification par les tests biochimiques suivants :

- recherche de l'activité oxydase
- recherche de l'activité catalase
- hydrolyse de l'hippurate
- sensibilité à la céphalotine
- sensibilité à l'acide nalidixique

Ces tests permettent en effet de distinguer les 4 espèces majeures de *Campylobacter* thermotolérants (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*) (tableau 1). Ces tests sont

ceux préconisés par la norme NF ISO 10272 "méthode horizontale pour la recherche des *Campylobacter* thermotolérants dans les aliments".

Tableau 1 - Tests d'identification des 4 espèces de *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*).

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

3.2. Identification des souches par une méthode d'amplification en chaîne (PCR)

Toutes les souches bactériennes isolées, spiralées et à coloration de Gram négative, font l'objet d'une identification par une technique PCR permettant d'identifier *Campylobacter coli* et *Campylobacter jejuni*.

3.2.1. Extraction de l'ADN des souches de *Campylobacter* : Méthode par ébullition

À partir d'une culture sur milieu gélosé, on réalise dans un tube à hémolyse, une suspension de la souche bactérienne, de densité 1 sur l'échelle de Mac Farland dans 1 ml d'eau bidistillée stérile. Les tubes sont placés pendant 10 minutes dans une casserole d'eau bouillante. Après centrifugation 5 min à 15000 g, le surnageant est récupéré puis conservé en aliquots à -20 °C

3.2.2. Amplification génique

Campylobacter coli et *Campylobacter jejuni* sont identifiés par amplification de deux séquences d'ADN génomique, l'une de 258 paires de base codant pour de l'ARN ribosomique, et l'autre de 358 paires de base. Pour chacune de ces 2 espèces recherchées on dispose d'un couple d'amorces dont les séquences (STONNET et GUESDON, 1993) sont :

- pour *Campylobacter coli* :
CC1 : 5'-ATA-TTT-CCA-AGC-GCT-ACT-CCC-C-3'
CC2 : 5'-CAG-GCA-GTG-TGA-TAG-TCA-TGG-G-3'
- pour *Campylobacter jejuni* :
CJ1 : 5'-GAA-TGA-AAT-TTT-AGA-ATG-GGG-3'
CJ2 : 5'-GAT-ATG-TAT-GAT-TTT-TAT-CCT-GC-3'

La réaction d'amplification a été réalisée dans un thermocycleur AmpliTron II, dans un volume de 50 µl., dont la composition est :

- pour *C. coli* : Tampon PCR 10X sans MgCl₂ : 1 mM ; MgCl₂ 25 mM : 2,5 mM ; Amorces CC1 : 1 µM ; Amorces CC2 : 1 µM ; dNTPs 10 mM : 0.2 mM ; Taq (5u/µl Sigma) : 1 unité / 50 µl

- pour *C. jejuni* : Tampon PCR 10X sans MgCl₂ : 1 mM ; MgCl₂ 25 mM : 1.5 mM ; Amorces CJ1 : 1 µM ; Amorces CJ2 : 1 µM ; dNTPs 10 mM : 0.2 mM ; Taq (5u/µl Sigma) : 1 unité / 50 µl

Les conditions d'amplification étaient les suivantes : 94 °C, 5 min ; (94 °C, 1 min ; 57 °C, 1 min ; 72 °C, 1 min) 30 cycles ; 72 °C, 10 min ; Refroidissement et maintien à 4 °C

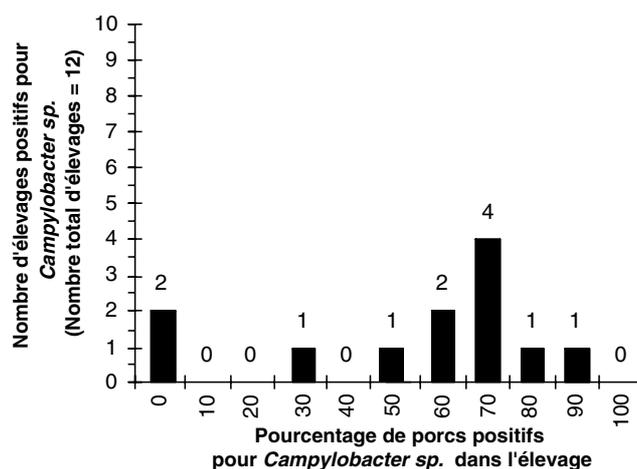
4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1. Un portage élevé en *Campylobacter* sp.

Un porc a été considéré comme porteur (ou positif) de *Campylobacter* dès lors que, sur au moins une boîte, une colonie au moins présentait les caractéristiques morphologiques (bactéries spiralées mobiles) et les caractéristiques biochimiques (coloration de Gram négative, activités oxydase et catalase positives) spécifiques de ces bactéries. Un élevage a été déclaré positif en *Campylobacter* dès lors qu'au moins un porc a été déclaré positif.

Sur les 120 porcs analysés, 65 ont été détectés positifs en *Campylobacter* sp. L'analyse bactériologique de 2 séries n'a pas permis la mise en évidence d'un portage gastrique en *Campylobacter* des animaux. Ces résultats négatifs sont interprétés comme une absence de *Campylobacter* dans l'élevage au moment où ont été effectués les prélèvements. En effet, la méthode de bactériologie que nous avons utilisée, nous semble suffisamment sensible pour pouvoir détecter les *Campylobacter*. De plus ces 2 séries négatives n'ont pas été obtenues à la suite, ce qui exclut un éventuel problème technique (problème inhérent à la technique de prélèvement ou à la conservation durant le transport des prélèvements, composition anormale des milieux, problème d'étuves etc...). Les résultats de cette étude montrent donc une prévalence moyenne du portage gastrique en *Campylobacter* dans la population des porcs charcutiers de 54%. Mais, il est à noter au sein des élevages positifs, une très grande variation du taux d'animaux porteurs, allant de 30 % à 90 % (effet élevage significatif $p < 0,001$, test du χ^2) (figure 1). La prévalence moyenne des

Figure 1 - Nombre d'élevages positifs vs pourcentage de porcs positifs pour *Campylobacter* sp. dans l'élevage



porcs porteurs de *Campylobacter* dans un élevage contaminé reste néanmoins élevée avec 60,5% des animaux de l'élevage.

4.2. Caractérisation du portage stomacal de *Campylobacter sp.*

Nos résultats montrent que les porcs charcutiers sont porteurs de *Campylobacter sp.* au niveau de l'estomac. Or à notre connaissance et jusqu'à ce jour, seul un portage intestinal de ces bactéries a été mis en évidence. La technique de culture par ensemencement direct et séparé de chacun des 3 prélèvements effectués sur l'estomac du porc, que nous avons mis en oeuvre, devait permettre d'étudier une éventuelle "localisation préférentielle" des bactéries dans l'estomac. Néanmoins il n'a été montré aucune localisation préférentielle sur un site plutôt qu'un autre (effet "site" non significatif, $p > 0,05$). Cependant, le site 1 a permis de mettre en évidence le plus de porcs positifs mais son efficacité dans la détection des *Campylobacter* reste très moyenne avec seulement 70%. En revanche, l'association des sites 1 et 3 apparaît comme la plus efficace pour détecter les *Campylobacter* dans l'estomac des porcs. Aussi dans le contexte d'une analyse bactériologique sur un nombre réduit de sites, il apparaît qu'au minimum deux sites restent à prélever et de préférence les sites situés dans la région péri-cardiale (site 1) et dans la région pylorique (site 3). Enfin, cette absence de localisation préférentielle semble aller dans le sens d'un "passage" des *Campylobacter* dans l'estomac plutôt que d'une implantation dans la muqueuse. Une étude histologique permettrait d'étudier leur association ou non à la muqueuse gastrique.

4.3. Un portage en *Campylobacter coli*

Cent sept souches de *Campylobacter sp.* ont été isolées. L'identification par PCR au moyen d'amorces spécifiques a montré que toutes les souches isolées appartiennent à l'espèce *Campylobacter coli*. Nos résultats confirment donc la prédominance de cette espèce de *Campylobacter* chez le porc. Actuellement il existe peu de données bibliographiques expliquant cette prédominance. Les quelques hypothèses avancées pour expliquer chez le porc cette association préférentielle s'inspirent des travaux menés sur l'association préférentielle *C. jejuni*-volailles et *C. jejuni*-souris (chimiotactisme entre la bactérie et le mucus, adaptation aux conditions environnementales, existence de récepteurs spécifiques ... (LEE et al., 1986, NACHAMKIN et al., 1993).

4.4. Évaluation des tests biochimiques et de la technique par PCR pour l'identification des *Campylobacter thermotolérants*

Dans 14 % des cas, l'identification par les tests biochimiques n'était pas en accord avec l'identification par la technique PCR. Dans 50 % des cas de non concordance du résultat entre les deux méthodes d'identification, c'est *Campylobacter jejuni* qui a été révélé par les tests biochimiques. Dans l'autre moitié des cas, à proportion égale, ce sont *Campylobacter lari* et *Campylobacter upsaliensis* qui ont été identifiés par les tests biochimiques. La distinction entre *Campylobacter jejuni* est délicate puisqu'elle repose essentiellement sur le test de l'hydrolyse de l'hippurate. Or ce test est considéré comme fiable dans seulement approximativement 90 % des cas. Notre résultat confirme l'ordre de grandeur de ce manque de fiabilité du test. La technique par amplification génique PCR a confirmé sa spécificité et sa rapidité pour traiter des lots importants d'échantillons.

Les difficultés d'interprétation des résultats des tests biochimiques, réalisés sur nos souches sauvages de *Campylobacter sp.*, nous amènent à considérer que l'identification par la technique PCR est plus fiable. Ainsi les souches apparues hippurate positives lors des tests biochimiques sont identifiées comme appartenant à l'espèce *C. coli*. Ce fait nous interroge sur l'existence potentielle de souches *C. coli* hippurate positives non décrites jusqu'alors et à notre connaissance. Des travaux complémentaires d'amplification du gène de l'hippuricase permettraient de vérifier cette hypothèse. Cet exemple met en évidence la nécessité du développement de méthodes moléculaires (mise au point de sondes nucléiques, connaissances approfondies du génome).

CONCLUSION

Cette étude met en évidence l'importance du portage en *Campylobacter sp.* chez le porc. En effet environ un porc sur deux est porteur de *Campylobacter coli*. Néanmoins le portage mis en évidence ne semble pas généralisé à tous les élevages que nous avons testés. Ce qui permet d'envisager l'existence de moyens de maîtrise lors de la production. Cette perspective nécessite une étude approfondie des facteurs de risque de contamination des animaux en élevage.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADESIYUN A. A., KAMINJOLO J. S., LOREGNARD R., KITSON-PIGGOTT W., 1992. Brit. Vet. J., 148, 547-556.
- COLIN P., 1985. Sciences des Aliments, 5, 127-132.
- FEDERIGHI M., MAGRAS C., PILET M. F., CAPPELIER J. M., 1996. V.P.C., 17, 283-285.
- KWIATEK K., WOJTON B., STERN N. J., 1990. J. Food Protect., 53, 127-130.
- LAMMERDING A. M., GARCIA M. M., MANN E. D., ROBINSON Y., DORWARD W. J., et al., 1988. J. Food Protect., 51, 47-52.
- LAMMERDING A. M., MANN E. D., ROBINSON Y., GARCIA M. M., DORWARD W. J., TRUSCOTT R. B., 1985. In : the third International Workshop on Campylobacter Infections, eds. Pearson, A. D., Skirrow, M. B., Lior, H. & Rowe, B. (Public Health Laboratory Service, Ottawa), pp. 107.
- LEE A., O'ROURKE J. L., BARRINGTON P. J., TRUST T. J., 1986. Infect. Immun., 51, 536-546.
- NACHAMKIN I., YANG X.-H., STERN N. J., 1993. Appl. Environ. Microbiol., 59, 1269-1273.
- OOSTEROM J., DEWILDE G. J. A., DE BOER E., DE BLAAUW L. H., KARMAN H., 1983. J. Food Protect., 46, 702-706.
- STERN N. J., 1981. J. Food Sci., 46, 1291.
- STONNET V., GUESDON J.-L., 1993. FEMS Immunology Med Microbiology, 7, 337-344.