

# Détection de *Yersinia enterocolitica* sur les amygdales de porcs à l'abattoir : prévalence et méthodes

Marc FONDREVEZ, Annie LABBE, Emmanuelle HOUARD, Philippe FRAVALO, François MADEC, Martine DENIS

AFSSA, Unité HQPAP, BP 53, 22440 Ploufragan

m.fondrevez@ploufragan.afssa.fr

Cette étude a été réalisée pour obtenir des données sur la prévalence de *Yersinia enterocolitica* (Ye) chez les porcs à l'abattoir et pour évaluer la méthode de détection.

De janvier à mars 2009, 900 écouvillonnages d'amygdales de porc ont été réalisés dans un abattoir breton à raison de 20 porcs échantillonnés par lot, soit 45 lots au total. Les écouvillons ont été placés dans 10 ml de bouillon PSB et 1 ml a été transféré dans 9 ml de bouillon ITC. Après 48h d'incubation à 25°C, un isolement sur gélose CIN a été réalisé à partir du PSB, et des isollements sur gélose SSDC et gélose CIN ont été réalisés à partir de l'ITC. Après 24h à 30°C, 4 colonies caractéristiques au maximum par boîte ont été isolées sur milieu YeCM pour garder les Ye pathogènes (colonies avec centre rouge et bord translucide). En parallèle, des tests biochimiques décrits dans la norme ISO 10273 ont été réalisés pour confirmer les isolats comme étant *Yersinia* et pour identifier le biotype de ces isolats.

Les 3 voies de détection ont permis d'isoler un total de 373 souches supposées être des biotypes pathogènes après l'isolement sur YeCM. Sur les 900 écouvillons d'amygdales, 179 (19,8%;  $IC_{95\%}$  [16,6-23,2]) étaient positifs et 36 lots de porcs sur les 45 (80%;  $IC_{95\%}$  [65,4-94,6]) ont au moins un écouvillon positif. Sur les 179 écouvillons positifs, seulement 3 étaient positifs par les trois voies. Par la voie ITC-SSDC, 4% ( $IC_{95\%}$  [0,7-7,3]) des écouvillons et 37,8% ( $IC_{95\%}$  [23,2-52,4]) des lots étaient positifs. Par la voie PSB-CIN, 5,1% ( $IC_{95\%}$  [1,8-8,4]) des écouvillons et 51,1% ( $IC_{95\%}$  [36,5-65,7]) des lots étaient positifs. Par la voie ITC-CIN, 14,2% ( $IC_{95\%}$  [10,9-17,4]) des écouvillons et 66,7% ( $IC_{95\%}$  [52,1-81,3]) des lots étaient positifs. La concordance entre les 3 voies était faible (coefficient Kappa de Fleiss < à 0,4). Parmi les 373 souches, 80,2%, et 19,8% sont respectivement du biotype 4, et biotype 2 ou 3. Ces pourcentages sont quasiment identiques pour les 3 voies.

Cette étude montre que l'isolement sur gélose CIN après un enrichissement en ITC, suivi par un isolement sur YeCM est une méthode adéquate pour isoler les *Yersinia enterocolitica* pathogènes à partir d'amygdales. Par cette voie, la prévalence est de 14,2% des porcs dans l'abattoir considéré, en hiver. Une étude sur plusieurs abattoirs et sur l'année permettrait d'apprécier la prévalence de ce germe chez le porc en France.

## Detection of *Yersinia enterocolitica* on pigs tonsils : method and prevalence

This study was conducted to obtain preliminary data about the presence of *Yersinia enterocolitica* (Ye) in French slaughtered pigs and to evaluate detection methods.

From January to March 2009, 900 tonsil swabs were taken from pigs in one slaughterhouse in Brittany, France; 45 batches of pigs were considered with 20 pigs sampled per batch. The swabs were vortexed in 10ml PSB broth and 1ml was transferred in 9 ml ITC broth. After 48h at 25°C, PSB enrichment was streaked on CIN plates and ITC enrichment on SSDC and CIN plates. After 24h at 30°C, a maximum of 4 typical colonies per plate were streaked on chromogenic medium YeCM plate to keep pathogenic Ye isolates. In parallel, biochemical assays were realized to confirm the isolates as *Yersinia* and to determine the biotype as described in the ISO 10273 method.

The 3 detection ways allowed to isolate a total of 373 strains suspected to be pathogenic Ye. 179 tonsil swabs out of 900 (19.8%;  $CI_{95\%}$  [16.6-23.2]) were positive and 36 pig batches out of 45 (80%;  $CI_{95\%}$  [65.4-94.6]) had at least one positive swab. Out of the 179 positive tonsil swabs, only 3 were positive in the 3 detection ways. Through the ITC-SSDC way, 4% ( $CI_{95\%}$  [0.7-7.3]) of tonsil swabs and 37.8% ( $CI_{95\%}$  [23.2-52.4]) of the batches were positive. Through the PSB-CIN way, 5.1% ( $CI_{95\%}$  [1.8-8.4]) of tonsil swabs and 51.1% ( $CI_{95\%}$  [36.5-65.7]) of the batches were positive. Through the ITC-CIN way, 14.2% ( $CI_{95\%}$  [10.9-17.4]) of the tonsil swabs and 66.7% ( $CI_{95\%}$  [52.1-81.3]) of the batches were positive. The agreement between the 3 ways of Ye detection is weak (Fleiss' Kappa coefficient < to 0.4). 80.2% and 19.8% of the pathogenic strains were biotype 4 and biotype 2 or 3. These percentages were almost identical for the 3 detection ways.

This study showed that the ITC-CIN way followed by a streaking on YeCM can be the best option to isolate pathogenic *Yersinia enterocolitica* from tonsil swabs. Through this way, the prevalence is about 14.2% in the sole slaughterhouse tested, during winter. A one-year study in several slaughter-houses will allow to better estimate the prevalence of these bacteria in pigs in France.

## INTRODUCTION

En 2007, le nombre de yersinioses humaines signalées en Europe était de 8 792 cas, plaçant l'agent zoonotique *Yersinia* à la 3<sup>ème</sup> place des cas d'entérites humaines, derrière *Campylobacter* et *Salmonella* (EFSA, 2009). *Yersinia enterocolitica* est l'espèce la plus retrouvée dans les cas humains et est isolée dans 93,8% des cas confirmés. La bactérie est aussi détectée chez les porcs et dans la viande de porc. Les porcs sont porteurs sains et ils hébergent *Yersinia enterocolitica* dans la cavité orale, plus particulièrement sur la langue, les amygdales, les nœuds lymphatiques et ils excrètent les germes dans leurs selles (Nesbakken *et al.*, 2003). La prévalence de *Yersinia enterocolitica* dans les amygdales de porc retrouvées par les méthodes bactériologiques est généralement supérieure à 30% dans les autres pays européens (52% en Finlande en 2007 (EFSA, 2009) ; 34% en Suisse (Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2007)).

La détection de *Yersinia enterocolitica* à partir de matrices alimentaires peut être réalisée au moyen de la norme ISO 10273, mais Magras *et al.* (2008) et Labbé *et al.* (2009) ont reporté des difficultés à isoler *Yersinia enterocolitica* par la méthode décrite dans cette norme.

Cette étude a été réalisée pour obtenir des données sur le portage de *Yersinia enterocolitica* (Ye) par les porcs français à l'abattoir et pour évaluer des méthodes de détection.

## 1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1. Ecouvillonnage des amygdales

De janvier à mars 2009, 900 écouvillonnages d'amygdales de porc ont été réalisés dans un abattoir breton. 45 lots de porcs (5 lots par semaine) ont été considérés à raison de 20 porcs par lot. La tête du porc a été retirée de la carcasse juste avant le premier choc froid et les amygdales ont été écouvillonnées au moyen d'écouvillons en coton.

### 1.2. Détection

Chaque écouvillon a été placé dans un tube contenant 10 ml de bouillon PSB puis, après une étape d'agitation, 1 ml du bouillon a été transféré dans 9 ml de bouillon ITC (Biorad, USA). Après 48h à 25°C, le bouillon PSB ainsi enrichi a été isolé sur gélose CIN (Oxoid, USA) et le bouillon ITC sur géloses SSDC (Oxoid, USA). En addition à la méthode décrite par la norme ISO, le bouillon ITC a été également isolé sur gélose CIN.

Après une incubation à 30°C pendant 24h, quatre colonies caractéristiques au maximum par gélose (CIN et SSDC) ont été isolées sur la gélose chromogène YeCM (Weagant, 2008) dans le but de ne conserver que les isolats de Ye présumés pathogènes (colonies de type « red bullseye »). Chaque isolat « red bullseye » a été cultivé sur gélose PCA à 30°C pendant 24h, en vue des tests biochimiques et de la conservation de la souche à -80°C dans du bouillon glycérolé peptoné.

### 1.3. Confirmation biochimique et biotypage des isolats

Des tests biochimiques (dégradation positive du glucose et négative pour le lactose sur le milieu Kligler en tube, dégradation de l'urée, pas de désamination du tryptophane)

ont été réalisés pour confirmer l'appartenance des isolats au genre *Yersinia*. Le biotypage de *Yersinia enterocolitica* pathogènes a été réalisé au moyen de 3 tests spécifiques (Esculine, xylose et tréhalose) tel que décrits dans la norme ISO 10273.

## 2. RESULTATS

Quatre cent soixante huit (468) colonies caractéristiques ont été sélectionnées à partir des géloses SSDC et CIN ; 87 sur CIN à partir du bouillon PSB, 108 sur SSDC à partir du bouillon ITC et 273 du CIN à partir de l'ITC (Tableau 1).

Après isolement sur la gélose YeCM et confirmation par les tests biochimiques, 373 des 468 isolats ont été considérés comme *Yersinia enterocolitica* pathogènes. Au total, 51, 98 et 224 isolats Ye ont été conservés respectivement au travers des voies PSB-CIN, ITC-SSDC et ITC-CIN (Tableau 1).

Quand les 3 voies de détection sont considérés ensemble, 179 écouvillons d'amygdales sur les 900 (19,8% ;  $IC_{95\%}$  [16,6-23,2]) sont positifs et 36 lots de porc (80% ;  $IC_{95\%}$  [65,4-94,6]) ont au moins un écouvillon positif (tableau 1).

Par la voie ITC-SSDC, 4,2% ( $IC_{95\%}$  [0,3-7,4]) des écouvillons d'amygdale et 37,7% ( $IC_{95\%}$  [23,9-52,3]) des lots sont positifs. Par la voie PSB-CIN, 5,9% ( $IC_{95\%}$  [2,6-9,1]) des écouvillons d'amygdale et 48,9% ( $IC_{95\%}$  [34,3-63,5]) des lots sont positifs. Par la voie ITC-CIN, 14,1% ( $IC_{95\%}$  [10,8-17,3]) des écouvillons d'amygdale et 66,6% ( $IC_{95\%}$  [51,9-81,2]) des lots sont positifs.

Si les deux voies de la norme ISO 10273 sont considérés ensemble (PSB-CIN et ITC-SSDC), 9,0% ( $IC_{95\%}$  [5,7-12,3]) des écouvillons et 68,9% ( $IC_{95\%}$  [54,3-83,5]) des lots sont positifs.

**Tableau 1 :** Nombre d'isolats Ye, d'écouvillons d'amygdales et de lots de porc positifs selon les voies de détection.

Voies de détection	Norme ISO 10273		ITC-CIN	Les 3 voies
	PSB-CIN	ITC-SSDC		
Nbre de colonies typiques sur les géloses CIN ou SSDC	87	108	273	468
Nbre de Ye pathogéniques après YeCM et tests biochimiques	51	98	224	373
Nbre d'écouvillons positifs	46	38	128	179
Nbre de lots positifs	22	17	30	36

Selon le coefficient Kappa de Fleiss (Fleiss, 1971), la concordance entre les 3 voies de détection est de 0,23 ; cette valeur est considérée comme faible selon Landis et Koch (1977) (Tableaux 2a, 2b, 2 c et Tableaux 3a, 3b et 3c).

Le test du Kappa de Cohen (Cohen, 1960) permet de montrer un total désaccord entre la norme ISO 10273 et la méthode ITC-CIN (-0,61).

**Tableau 2a :** concordance entre les voies PSB-CIN et ITC-SSDC pour la détection d'Ye sur les écouvillons d'amygdale

		ITC-SSDC		
		positif	Négatif	
PSB-CIN	Positif	3	43	46
	Négatif	35	819	854
Total		38	862	900

**Tableau 2b** : Concordance entre les voies PSB-CIN et ITC-CIN pour la détection d'Ye sur les écouillons d'amygdale

		ITC-CIN		
		Positif	Négatif	
PSB-CIN	Positif	14	32	46
	Négatif	114	740	854
Total		128	772	900

**Tableau 2c** : Concordance entre les voies ITC-SSDC et ITC-CIN pour la détection d'Ye sur les écouillons d'amygdale

		ITC-CIN		
		positif	Négatif	
ITC-SSDC	Positif	19	19	38
	Négati	109	753	862
Total		128	772	900

**Tableau 3a** : Concordance entre les voies PSB-CIN et ITC-SSDC pour la détection d'Ye au niveau des lots de porc

		ITC-SSDC		
		positif	Négatif	
PSB-CIN	Positif	8	14	22
	Négatif	9	14	23
Total		17	28	45

**Tableau 3b** : Concordance entre les voies PSB-CIN et ITC-CIN pour la détection d'Ye au niveau des lots de porc

		ITC-CIN		
		Positif	Négatif	
PSB-CIN	Positif	17	5	22
	Négatif	13	10	23
Total		30	15	45

**Tableau 3c** : Concordance entre les voies ITC-SSDC et ITC-CIN pour la détection d'Ye au niveau des lots de porc

		ITC-CIN		
		Positif	Négatif	
ITC-SSDC	Positif	16	1	17
	Négatif	14	14	28
Total		30	15	45

Sur les 373 isolats Ye, 80,2% sont du biotype 4 et 19,8% des biotypes 2 ou 3.

Ces pourcentages sont toutefois conservés quelle que soit la voie de détection considérée (Tableau 4).

**Tableau 4** : Pourcentage des différents biotypes des isolats de Ye pathogènes selon la voie de détection.

Voies de détection	PSB-CIN	ITC-SSDC	ITC-CIN	les 3 Voies
Biotype 4	80,4	79,6	80,4	80,2
Biotype 2 or 3	19,6	20,4	19,6	19,8

### 3. DISCUSSION

Dans cette étude, deux étapes ajoutées à la norme ISO 10273 ont permis d'améliorer la détection de *Yersinia enterocolitica* à partir des amygdales. La première était de faire un isolement sur CIN à partir du bouillon d'enrichissement ITC et la seconde était un isolement sur la gélose YeCM des colonies suspectées comme étant *Yersinia enterocolitica* sur les géloses CIN ou SSDC. Cette étape a permis de supprimer 20,3% des isolats conservés à partir des géloses CIN et SSDC.

La prévalence, proportion de porcs positifs, au final était de 9,0% par la norme ISO et de 14,1% par la méthode ITC-CIN.

En se basant sur ces résultats, l'utilisation de la gélose YeCM après ITC-CIN apparaît comme une très bonne option pour isoler *Yersinia enterocolitica* pathogènes à partir des écouillons d'amygdales de porc.

Dans cette étude, 19,8% des écouillons d'amygdales au total étaient positifs pour *Yersinia enterocolitica*. Cette valeur est faible par rapport à celles affichées par d'autres pays, 52% en Finlande (EFSA, 2009) et 34% en Suisse (Fredriksson-Ahomaa et al., 2007). Une étude sur plusieurs abattoirs et sur l'année devra permettre de mieux apprécier la prévalence de ce germe chez le porc en France

Le principal biotype pathogène retrouvé lors de cette étude est le biotype 4 (80,2%), suivi des biotypes 2 ou 3 (19,8%). Le biotype 4 est aussi le biotype le plus commun retrouvé dans d'autres pays européens (Bonardi et al., 2003, Korte et al., 2004; Fredriksson-Ahomaa et al., 2007).

Cette répartition des biotypes observée lors de cette enquête est similaire à celle obtenue dans le cas des yersiniose humaines en France en 2007 (78,8% de biotype 4, 21,2% de biotype 2 ou 3; Carniel et al., 2007). Le rôle potentiel des porcs comme réservoir des *Yersinia enterocolitica* pathogènes pour les humains nécessitera des études supplémentaires.

### CONCLUSION

Cette étude montre que l'isolement sur gélose CIN après un enrichissement en ITC, suivi par un isolement sur YeCM est une méthode adéquate pour isoler les *Yersinia enterocolitica* pathogènes à partir d'amygdales. Par cette voie, la prévalence est de 14,2% pour un abattoir lors de prélèvements conduits en hiver. Une étude sur plusieurs abattoirs et sur l'année permettrait de mieux apprécier la prévalence de ce germe chez le porc en France.

### REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué dans le cadre d'un doctorat financé par l'AFSSA et l'ARED Région Bretagne, ainsi que par un support financier AAP-CBB du Conseil Régional de Bretagne.

Les auteurs tiennent à remercier le Dr. E. Carniel de l'Institut Pasteur de Paris pour la fourniture de souches humaines, les responsables de l'abattoir qui ont accepté de participer à cette étude, et le Pr. Lieven de Zutter de l'université de Gand (Belgique) pour les conseils techniques.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bonardi S., Brindani F., Pizzin G., Lucidi L., D'Incau M., Liebana E., Morabito S., 2003. Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* 0157 in pigs in slaughter in Italy. *Int. J. Food Microbiol.*, 85, 101-110.
- Carniel E., Guinet F., Leclercq A., Savin C., 2007. Rapport Annuel d'Activités Centre National de Référence pour la peste et autres yersinioses, 19 pages.
- Cohen J., 1960. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement*, 20, 37-46.
- EFSA, 2009. Community report on trends & sources of zoonoses and zoonotic agents in the EU in 2007. *The EFSA Journal*, 223 pages.
- Fleiss J. L., 1971. Measuring nominal scale agreement among many raters. *Psychological Bulletin*, 76, 378-382.
- Fredriksson-Ahomaa M., Stolle A., Stephan R., 2007. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered at a Swiss abattoir. *Int. J. Food Microbiol.*, 119, 207-12.
- Korte T., Fredriksson-Ahomaa M., Niskanen T., Korkeala H., 2004. Low prevalence of yadA-positive *Yersinia enterocolitica* in sows. *Foodborne Pathog. Dis.*, 1, 45-52.
- Labbé A., Fondrevez M., Houdayer C., Salvat G., Denis M., 2009. Detection of *Yersinia enterocolitica* on pig tonsils. Congress MED-VET-NET, Spain, 3-6 juin 2009.
- Landis J. R., Koch G. G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33., 159-174.
- Magras C., Vallée T., Leclercq A., Fosse J., 2008. Détection de *Yersinia enterocolitica* sur carcasses de porc: premiers résultats. *Journées Rech. Porcine*, 40, 79-80.
- Nesbakken T., Eckner K., Hoidal H. K., Rotterud O. J., 2003. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp. in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering, and dressing procedures. *Int. J. Food Microbiol.*, 80, 231-40.
- Weagant S. D., 2008. A new chromogenic agar medium for detection of potentially virulent *Yersinia enterocolitica*. *J. Microbiol. Methods*, 72, 185-90.