# Etude de l'influence du nettoyage et de la désinfection et des procédés d'abattage en abattoir de volaille sur le niveau de résistance aux antibiotiques des campylobacters

Marie-Bénédicte Peyrat

▶ **To cite this version:**

Marie-Bénédicte Peyrat. Etude de l'influence du nettoyage et de la désinfection et des procédés d'abattage en abattoir de volaille sur le niveau de résistance aux antibiotiques des campylobacters. Autre [q-bio.OT]. Université Rennes 1, 2008. Français. NNT : . tel-00288961

**HAL Id: tel-00288961**

**https://theses.hal.science/tel-00288961**

Submitted on 19 Jun 2008

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° ORDRE : 3650
de la thèse

**THESE**

Présentée

**DEVANT L'UNIVERSITE DE RENNES 1**

pour obtenir

le grade de : **DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE RENNES 1**

Mention **: BIOLOGIE**

**PAR**

Marie-Bénédicte PEYRAT

Equipe d'accueil : AFSSA, LERMVD - Fougères

Ecole doctorale : Vie Agro Santé (VAS)

Composante universitaire : Rennes 1

# ÉTUDE DE L'INFLUENCE DU NETTOYAGE ET DE LA DESINFECTION ET DES PROCEDES D'ABATTAGE EN ABATTOIR DE VOLAILLES SUR LE NIVEAU DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DES CAMPYLOBACTERS

Soutenue le 11 janvier 2008 devant la commission d'Examen

**COMPOSITION DU JURY** :

| | |
|---|---|
| Pr. Gwennola Ermel, Université de Rennes 1 | Présidente |
| Pr. Georges Daube, Université de Liège, Belgique | Rapporteur |
| Pr. Jean Pierre Ganière, ENVN, Nantes | Rapporteur |
| Dr. Pierre Colin, ESMISAB, Brest | Examinateur |
| Dr. Christophe Soumet, AFSSA, Fougères | Co-directeur de thèse |
| Dr. Pascal Sanders, AFSSA, Fougères | Directeur de thèse |

# SOMMAIRE

**Liste des figures** ..... **10**

**Liste des tableaux** ..... **12**

**Abréviations** ..... **14**

**Introduction** ..... **16**

**Chapitre 1 : Revue bibliographique** ..... **19**

1 Description générale des campylobacters ..... 19
1.1 Taxonomie, phylogénie ..... 19
1.2 Morphologie des campylobacters ..... 19
1.3 Génome des campylobacters ..... 19
2 Détection et isolement des campylobacters ..... 20
2.1 Conditions générales de culture de campylobacter ..... 20
*2.1.1 Atmosphère ..... 20*
*2.1.2 Température ..... 20*
2.2 Méthodes de détection ..... 22
*2.2.1 Choix de la méthode en fonction de l'origine des prélèvements ..... 22*
*2.2.2 Enrichissement ..... 22*
*2.2.3 Technique de culture sélective des campylobacters ..... 22*
2.3 Identification des campylobacters ..... 24
*2.3.1 Aspect des cultures ..... 24*
*2.3.2 Identification au microscope ..... 24*
*2.3.3 L'identification phénotypique ..... 24*
*2.3.4 Identification de l'espèce par des méthodes de biologie moléculaire ..... 26*
*2.3.5 Milieux de conservation ..... 26*
2.4 Méthode de détection dans les aliments ..... 26
2.5 Difficultés de la détection des campylobacters ..... 26
3 Typage des campylobacters ..... 26
3.1 Objectifs des méthodes de typage ..... 26
*3.1.1 Objectifs généraux ..... 26*
*3.1.2 Critères de sélection d'une méthode de typage ..... 28*
3.2 Difficultés liées à l'étude des campylobacters ..... 29
*3.2.1 Grand nombre d'hôtes ..... 29*
*3.2.2 Maladie sporadique ..... 31*

*3.2.3 Diversité génétique et instabilité génétique ..... 31*
3.3 Méthodes phénotypiques utilisées pour le typage de campylobacter ..... 31
*3.3.1 Biotypage ..... 31*
*3.3.2 Sérotypage ..... 32*
*3.3.3 Lysotypage : typage par les phages ..... 32*
*3.3.4 Intérêts et inconvénients des méthodes de phénotypage ..... 32*
3.4 Méthodes génotypiques utilisées pour le typage de campylobacter ..... 32
*3.4.1 L'électrophorèse en champ pulsé (Pulse field gel electrophoresis PFGE) ..... 33*
*3.4.2 Méthodes basées sur la technique de la PCR ..... 33*
*3.4.3 Le ribotypage ..... 35*
*3.4.4 Séquençage nucléotidique ..... 35*
*3.4.5 Technique de séquence des loci multiples (Multi locus sequence typing MLST) ..... 35*
*3.4.6 Puces à ADN ..... 37*
3.5 Comparaison des méthodes de typage phénotypique et génétique ..... 37
3.6 Perspectives des méthodes de typage de campylobacter ..... 37
4 Infection des volailles et contamination des denrées alimentaires issues des volailles par campylobacter ..... 38
4.1 Dans les élevages ..... 38
*4.1.1 Infection des lots de volailles par campylobacter ..... 38*
*4.1.2 Prévalence de la contamination des élevages ..... 39*
*4.1.3 Mesures de contrôle des campylobacters en élevages ..... 40*
4.2 Contamination des volailles pendant le transport ..... 41
*4.2.1 Etude de la contamination des lots de volailles par des souches de campylobacter présentes initialement dans les caisses de transport ..... 41*
*4.2.2 Mesure de contrôle des campylobacters pendant le transport à l'abattoir ..... 42*
4.3 Contamination des carcasses pendant les procédés d'abattage ..... 42
*4.3.1 Description du procédé d'abattage des volailles (Lehuraux 1997) ..... 42*
*4.3.2 Contamination des carcasses pendant l'abattage et l'éviscération ..... 44*
*4.3.3 Mesures de contrôle des campylobacters dans les abattoirs de volailles ..... 45*
4.4 Mécanismes de survie des campylobacters pendant les étapes d'abattage et dans les aliments ..... 50
*4.4.1 Les formes viables non cultivables (VNC) ..... 50*
*4.4.2 La formation de biofilm ..... 51*
*4.4.3 Survie dans les protozoaires ..... 51*
*4.4.4 Les autres mécanismes de survie ..... 51*
*4.4.5 Avantages conférés par la plasticité génomique des campylobacters ..... 53*
*4.4.6 Contribution de la viande de volaille aux infections humaines à campylobacter ..... 53*
5 Epidémiologie des infections à campylobacter chez l'homme ..... 55
5.1 Dose infectieuse pour l'homme ..... 55
5.2 Sources de la contamination humaine par les campylobacters ..... 55

*5.2.1 Modes de transmission des campylobacters à l'homme ... 55*
5.3 Symptômes cliniques ... 57
*5.3.1 Entérite à campylobacter ... 57*
*5.3.2 Complications et séquelles ... 58*
5.4 Incidence de la maladie ... 60
5.5 Impact économique des infections à campylobacter chez l'homme ... 61
5.6 Réglementation relative à campylobacter ... 61
*5.6.1 Textes européens ... 61*
*5.6.2 Textes français ... 62*
6 Résistance des campylobacters aux antibiotiques ... 62
6.1 Définition de la résistance ... 62
6.2 Détection de la résistance aux antibiotiques ... 63
*6.2.1 Méthodes d'étude de la résistance aux antibiotiques ... 63*
6.3 Mécanismes de résistance aux antibiotiques décrits chez campylobacter ... 70
*6.3.1 Résistances intrinsèques ... 70*
*6.3.2 Résistances acquises ... 72*
6.4 Utilisation des antibiotiques chez la volaille ... 74
*6.4.1 Objectifs de l'utilisation des antibiotiques chez la volaille ... 74*
*6.4.2 Molécules antibiotiques utilisées en élevage de volailles ... 74*
*6.4.3 Quantité d'antibiotiques distribuée aux volailles ... 76*
*6.4.4 Relation entre l'utilisation des antibiotiques et la résistance aux antibiotiques des campylobacters isolés chez la volaille ... 76*
*6.4.5 Relations entre la résistance aux antibiotiques chez les souches d'origine aviaire et les souches isolées chez l'homme ... 78*
*6.4.6 Conséquences de la résistance aux antibiotiques des campylobacters sur les symptômes observés lors d'infection chez l'homme ... 80*
6.5 Plan de surveillance de la résistance aux antibiotiques chez campylobacter ... 80
*6.5.1 Objectifs des plans de surveillance ... 80*
*6.5.2 Plan de surveillance français de campylobacter ... 80*
*6.5.3 Plans de surveillance européens ... 82*
7 Résistances bactériennes aux désinfectants ... 84
7.1 Définitions ... 84
7.2 Mécanismes d'action des désinfectants ... 84
*7.2.1 Mécanismes généraux ... 84*
*7.2.2 Mécanisme d'action des ammoniums quaternaires ... 86*
*7.2.3 Mécanisme d'action des produits chlorés ... 86*
7.3 Facteurs influençant l'efficacité des désinfectants ... 86
*7.3.1 Concentration et temps de contact ... 86*
*7.3.2 Le type de microorganisme ... 88*
*7.3.3 Importance du nettoyage ... 88*

7.4 Définition de la résistance aux désinfectants ... 88
*7.4.1 Résistance, sensibilité diminuée, moindre sensibilité ... 88*
*7.4.2 Pseudo-résistance, adaptation et tolérance ... 90*
7.5 Méthodes d'études de la résistance aux désinfectants ... 90
*7.5.1 Mesure de la concentration minimale bactéricide (CMB) ... 90*
*7.5.2 Mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI) ... 91*
*7.5.3 Difficultés de l'étude de la résistance des bactéries aux désinfectants ... 91*
7.6 Mécanismes de résistance bactérienne aux désinfectants ... 92
*7.6.1 Résistance intrinsèque des différents groupes bactériens ... 93*
*7.6.2 Mécanismes de résistance acquise aux désinfectants ... 93*
7.7 Résistance de campylobacter aux désinfectants ... 95
8 Facteurs de modulation de la résistance aux antibiotiques ... 96
8.1 Origine des gènes de résistance aux antibiotiques ... 96
8.2 Facteurs environnementaux ... 98
*8.2.1 Les stress environnementaux autres que les désinfectants ... 98*
*8.2.2 Liaison entre la résistance aux désinfectants et la résistance aux antibiotiques ... 99*
8.3 Biofilm et résistance aux antibiotiques ... 101
9 Conclusion et hypothèse ... 101

**Chapitre 2 : Matériels et méthodes ... 102**

1 Etude épidémiologique ... 102
1.1 Protocole de l'étude épidémiologique ... 102
*1.1.1 Objectifs de l'étude ... 102*
*1.1.2 Définitions des populations étudiées ... 102*
*1.1.3 Définition de l'échantillon étudié ... 104*
*1.1.4 Justification du choix des abattoirs ... 104*
1.2 Réalisation pratique de l'étude : prélèvements en abattoirs ... 104
*1.2.1 Caractéristiques des abattoirs visités ... 104*
*1.2.2 Prélèvements réalisés ... 106*
1.3 Analyse statistique ... 114
*1.3.1 Analyse multidimensionnelle descriptive ... 114*
*1.3.2 Comparaison des niveaux de résistance observés ... 114*
2 Méthodes de laboratoire ... 117
2.1 Isolement des campylobacters ... 117
*2.1.1 Traitement des prélèvements et phase d'enrichissement ... 117*
*2.1.2 Milieux sélectifs utilisés ... 118*
*2.1.3 Isolement ... 118*
*2.1.4 Conservation des isolats de campylobacter ... 118*
2.2 Détermination de l'espèce *C. jejuni* et *C. coli* par amplification génique (PCR) ... 118

*2.2.1 Préparation des échantillons à partir d'une colonie bactérienne isolée sur milieu gélosé 118*
*2.2.2 Préparation du mélange PCR ..... 120*
*2.2.3 Conditions des cycles PCR ..... 120*
*2.2.4 Electrophorèse des acides nucléiques ..... 120*
2.3 Mesure de la résistance aux antibiotiques ..... 120
*2.3.1 Antibiotiques testés ..... 120*
*2.3.2 Préparation des suspensions bactériennes pour la mesure des CMI (figure 22) ..... 122*
*2.3.3 Mesure de la concentration minimale inhibitrice par une méthode de dilution en milieu gélosé 122*
2.4 Mesure des CMI des désinfectants ..... 124
*2.4.1 Désinfectants testés ..... 124*
*2.4.2 Dilution en milieu gélosé ..... 124*
*2.4.3 Diffusion en milieu gélosé ..... 124*
2.5 Typage moléculaire des campylobacters par PCR-RFLP des gènes polymorphes P*fla*/*gyr*A et *fla*A d'après (Ragimbeau, Salvat et al. 1998) ..... 128
*2.5.1 Préparation de l'ADN bactérien pour la PCR ..... 128*
*2.5.2 Conditions de la PCR multiplex des gènes gyrA et pflA ..... 128*
*2.5.3 Conditions de la PCR du gène flaA ..... 130*
*2.5.4 Séparation des produits amplifiés par électrophorèse en gel d'agarose ..... 130*
*2.5.5 Analyse par restriction enzymatique des produits de la PCR Multiplex et électrophorèse 130*
*2.5.6 Séparation des fragments PCR digérés par une électrophorèse en gel d'agarose à 2.5 % 131*
*2.5.7 Analyse des profils d'électrophorèse ..... 131*

**Chapitre 3. Résultats préliminaires : méthodologie de l'étude de la sensibilité aux désinfectants ..... 132**

1 Introduction ..... 132
2 Diminution des pas de dilution des solutions désinfectantes ..... 134
2.1 Sélection des souches ..... 134
2.2 Gammes de dilutions étudiées ..... 134
*2.2.1 Chlorure de benzalkonium ..... 134*
*2.2.2 Chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium ..... 134*
2.3 Courbes de distribution des CMI avec des pas de dilution réduits ..... 134
2.4 Intérêt de la diminution des pas de dilution des molécules désinfectantes pour l'étude de la sensiblité aux antibiotiques ..... 136
3 Utilisation de molécules désinfectantes dans le milieu sélectif de Virion ..... 136
3.1 Principe ..... 136

3.2 Méthode ..... 136
*3.2.1 Comparaison des CMI en milieu de Karmali par rapport à la GMH ..... 136*
*3.2.2 Comparaison des CMI en milieu de Virion par rapport à la GMH ..... 136*
*3.2.3 Choix de la concentration de chlorure de benzalkonium ajoutée dans le milieu de Virion 138*
3.3 Résultats ..... 138
3.4 Conclusion : intérêt des milieux sélectifs contenant un désinfectant pour la sélection des bactéries résistantes aux désinfectants ..... 138
4 Mesure de la CMI de l'hypochlorite de sodium par la méthode de diffusion en milieu gélosé .... 140
4.1 Souches de campylobacter utilisées ..... 140
4.2 Courbes des diamètres d'inhibition ..... 140
4.3 Distribution des diamètres ..... 140
4.4 Intérêts et inconvénients de la mesure des diamètres d'inhibition ..... 140
5 Conclusion et conséquences pour la suite de l'étude ..... 141

**Chapitre 4. Isolement de *Campylobacter jejuni* après nettoyage et désinfection dans les abattoirs de volailles : analyse d'une source potentielle de contamination des carcasses ..... 142**

1 Introduction ..... 142
2 Publication ..... 143
2.1 Résumé ..... 143
2.2 Article soumis à International Journal of Food Microbiology le 08 juin 2007 ..... 143
3 Perspectives ..... 169
3.1 Critique de la méthode de phénotypage utilisée ..... 169
3.2 Mise en évidence de la survie des campylobacters aux opérations de nettoyage et désinfection dans les abattoirs de volailles ..... 170

**Chapitre 5. Caractérisation phénotypique et génotypique des isolats de *Campylobacter jejuni* collectés après nettoyage et désinfection dans les abattoirs de volailles ..... 172**

1 Introduction ..... 172
2 Publication ..... 173
2.1 Résumé ..... 173
2.2 Article accepté dans Veterinary Microbiology ..... 173
3 Perspectives ..... 188
3.1 Intérêt d'une étude quantitative : dénombrement des campylobacters dans les prélèvements 188
3.2 Génotypage des souches isolées avant nettoyage et désinfection ..... 188
3.3 Etude de la survie des campylobacters et résistance aux opérations de nettoyage et de désinfection dans les abattoirs ..... 189

**Chapitre 6. Comparaison des niveaux de résistance aux antibiotiques et aux désinfectants de *C. jejuni* et *C. coli* avant et après les procédés d'abattage dans les abattoirs de volailles..... 191**

1 Introduction ..... 191
2 Matériels et méthodes ..... 191
2.1 Prélèvements et souches de campylobacters utilisés pour l'étude ..... 191
2.2 Mesure de la résistance aux antibiotique et aux désinfectants ..... 192
*2.2.1 Dilution en milieu gélosé ..... 192*
*2.2.2 Mesure de la résistance ..... 192*
2.3 Analyse statistique ..... 194
*2.3.1 Analyse en correspondance multiple ..... 194*
*2.3.2 Tests de comparaisons ..... 194*
3 Résultats ..... 194
3.1 Déséquilibre du plan de prélèvement ..... 194
3.2 Isolement des campylobacters dans les prélèvements ..... 194
*3.2.1 Espèces de campylobacter isolées ..... 194*
*3.2.2 Analyse par lot de volaille ..... 196*
3.3 Niveaux de résistance observés par molécule d'antibiotique testée ..... 196
*3.3.1 Pour l'espèce C. jejuni ..... 196*
*3.3.2 Pour l'espèce C. coli ..... 196*
3.4 Comparaison des pourcentages de résistance aux antibiotiques observés ..... 200
*3.4.1 Comparaison des pourcentages de résistance avant (fientes)et après (peaux de cou) abattage des volailles ..... 200*
*3.4.2 Comparaison des pourcentages de résistance en fonction des abattoirs, du type de volaille et de la saison ..... 200*
3.5 Corrélations entre les différentes molécules testées. ..... 203
*3.5.1 Pour l'espèce C. jejuni ..... 203*
*3.5.2 Pour l'espèce C. coli ..... 203*
3.6 Variations de résistance qu'il est possible de mettre en évidence avec le plan de prélèvement 203
3.7 Analyse multidimensionnelle descriptive : analyse des correspondances multiples ..... 207
*3.7.1 Analyse des prélèvements positifs pour C. jejuni ..... 207*
*3.7.2 Analyse des variables abattoir, saison et nature du prélèvement ..... 207*
*3.7.3 Analyse des prélèvements animaux « fientes et peaux de cou » ..... 207*
*3.7.4 Conclusion de l'analyse en composantes multiples ..... 207*
4 Discussion ..... 208
4.1 Représentativité des prélèvements ..... 208
4.2 Comparaison de nos résultats avec le plan de surveillance des campylobacters d'origine aviaire en France ..... 208
*4.2.1 Niveau de contamination des prélèvements ..... 208*

*4.2.2 Proportion des espèces C. jejuni et C. coli dans les prélèvements..... 208*
*4.2.3 Pourcentages de résistance aux antibiotiques observés ..... 209*
4.3 Comparaison des pourcentages de résistance aux antibiotiques observés..... 209
*4.3.1 Mesure de la résistance aux antibiotiques ..... 209*
*4.3.2 Comparaison des pourcentages de résistance aux antibiotiques observés avant et après abattage des volailles..... 210*
*4.3.3 Influence des paramètres zootechniques sur les pourcentages de résistance observés 210*

**Conclusion ..... 211**

**Références bibliographiques ..... 214**

**ANNEXES ..... 228**

Annexe 1 :Questionnaire désinfectant ..... 229
Annexe 2. Composistion du neutralisant polyvalent de désinfection des chiffonnettes et désinfectants neutralisés ..... 231
Annexe 3 : Composition des différents milieux de culture utilisés pendant l'étude..... 232
Annexe 4 : Composition du neutralisant désinfectant ..... 237

# LISTE DES FIGURES

Figure 1. Arbre phylogénique des espèces du genre *Campylobacter* sp. et des bactéries proches sur la comparaison des séquences des gènes de l'ARNr 16S d'après On (2005)..... 18
Figure 2. Photographie au microscope électronique de *C. jejuni* (Ng, Sherburne et al. 1985)..... 18
Figure 3. Visualisation des produits de la PCR multiplex pour la recherche et l'identification du genre *Campylobacter* sp. et des espèces *C. jejuni* et *C. coli* (Denis, Soumet et al. 1999)..... 25
Figure 4. Représentation schématique du mode opératoire de la méthode de référence de recherche des campylobacter dans les aliments (selon la norme NF-ISO 10272)..... 27
Figure 5. Sites et niveaux de contaminations des carcasses à l'abattoir et stress subis par les campylobacters d'après Dromigny (2007) ..... 49
Figure 6. Mode de transmission des campylobacters à l'homme d'après Dromigny (2007) ..... 54
Figure 7. Incidence des infections à campylobacter dans sept pays industrialisés de 1980 à 1998 d'après (Anonymous 2004) ..... 59
Figure 8. Mécanismes de résistance aux antibiotiques d'après Sundsfjord, Simonsen et al.(2004).... 71
Figure 9. Répartition des ventes par famille d'antibiotiques chez la volaille (Anonymous 2006) ..... 75
Figure 10. Voies de transmission des bactéries pathogènes ou non sensibles et résistantes aux antibiotiques entre les animaux et l'homme d'après Phillips, Casewell et al. (2004) ..... 77
Figure 11. Comparaison des pourcentages de résistance de *Campylobacter jejuni* dans les prélèvements de poulets de chair (ceaca) et de viande de poulet de chair d'après (DANMAP 1999; DANMAP 2001; DANMAP 2002; DANMAP 2003; DANMAP 2004; DANMAP 2005) ..... 81
Figure 12. Sites d'action des molécules antiseptiques et désinfectantes selon les micro-organismes, d'après (Cremieux, Freney et al. 1995)..... 85
Figure 13. Activité d'un composé halogéné sur *Candida albicans* d'après Bessems (1998) ..... 87
Figure 14. Activité d'un composé halogéné sur différents microorganismes d'après Bessems (1998) 87
Figure 15. Essai en suspension pour l'évaluation de l'efficacité bactéricide d'un produit selon la norme AFNOR NFT 72-300..... 89
Figure 16. Carte de la localisation des élevages de volailles de chair en 2004 et des abattoirs visités (source Agreste 2004)..... 103
Figure 17. Schéma récapitulatif des prélèvements réalisés sur les volailles..... 107
Figure 18. Schéma récapitulatif des prélèvements réalisés dans les caisses de transport..... 108
Figure 19. Schéma récapitulatif des prélèvements sur la chaîne d'abattage ..... 109
Figure 20. Synthèse des prélèvements réalisés ..... 113
Figure 21. Isolement des campylobacters à partir des prélèvements réalisés en abattoir..... 116
Figure 22. Préparation des suspensions bactériennes pour la mesure de CMI ..... 121
Figure 23. Préparation des géloses contenant les antibiotiques ou les désinfectants..... 123
Figure 24. Diffusion en milieu gélosé pour l'étude de la sensibilité à l'hypochlorite de sodium..... 126
Figure 25. Distribution des CMI des souches de *C. jejuni* pour le chlorure de benzalkonium (gamme de dilutions de 2 en 2)..... 133

Figure 26. Distribution des CMI des souches de *C. jejuni* pour le chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium (CDDA) (gamme de dilutions de 2 en 2) ..... 133
Figure 27. Courbes de distribution des CMI du chlorure de benzalkonium (pas de dilution réduits).. 135
Figure 28. Courbes de distribution des CMI du chlorure de didécyl-diméthyl ammonium (pas de dilutions réduits) ..... 135
Figure 29. Distribution des CMI du chlorure de benzalkonium en fonction du milieu d'isolement..... 137
Figure 30. Diamètres d'inhibition pour *C. jejuni*..... 139
Figure 31. Diamètres d'inhibition pour *C. coli*..... 139
Figure 32. Analyse de la résistance dans les prélèvements contenant des isolats de l'espèce *C. jejuni* ..... 204
Figure 33. Analyse des variables « abattoir », « saison » et nature du prélèvement ..... 205
Figure 34. Analyse des prélèvements fientes et peaux de cou en fonction des variables « abattoirs » et « saisons » ..... 206

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Composition des principaux milieux solides et liquides pour les campylobacters thermotolérants d'après Corry, Post et al. (1995) ..... 21
Tableau 2. Caractéristiques phénotypiques des espèces du genre *Campylobacter* (Megraud 2000) . 23
Tableau 3. Gènes, séquences et taille des produits d'amplification pour l'identification du genre *Campylobacter* sp. et des espèces *C. jejuni* et *C. coli* (Denis, Soumet et al. 1999)..... 25
Tableau 4. Schéma de classification biotypique de Skirrow and Benjamin (1980)..... 30
Tableau 5. Schéma de classification biochimique d'après Lior (1984) ..... 30
Tableau 6. Comparaison, avantages et inconvénients des différentes méthodes de typage génétique (Wassenaar and Newell 2000; Foxman, Zhang et al. 2005)..... 36
Tableau 7. Répartition des espèces de campylobacter isolées dans les entérites humaines. Résultats EPICOP (Weber, Laudrat et al. 2003)..... 56
Tableau 8. Estimations les plus plausibles pour les campylobacters et les salmonelles non-typiques du nombre moyen annuel de cas (InVS 2004)..... 59
Tableau 9. Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour *Campylobacter* spp. (CA-SFM 2007) ..... 65
Tableau 10. Cut-off épidémiologiques proposés par l'EUCAST pour *C. jejuni* et *C. coli* (Anonymous 2007) ..... 66
Tableau 11. Comparaison des seuils EUCAST et CA-SFM ..... 67
Tableau 12. Mécanismes de résistance acquise aux antibitiotiques chez *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli* ..... 73
Tableau 13. Evolution des ventes d'antibiotiques chez les volailles de 1999 à 2005 (Anonymous 2006) ..... 75
Tableau 14. Résistance de *C. jejuni* et *C. coli* isolés chez l'homme et les volailles de chair de 1999 à 2004 d'après (Gallay, Prouzet-Mauléon et al. 2007) ..... 79
Tableau 15. Fréquence de résistance de *C. jejuni* selon l'origine du prélèvement (animal à l'abattoir, viande provenant de commerce) prélevé chez la volaille (DANMAP 1999) ..... 81
Tableau 16. Structures chimiques et utilisation des substances actives entrant dans la composition des désinfectants utilisés en industrie agro-alimentaire d'après McDonnell and Russell (1999).. 83
Tableau 17. Occurrences sur Pubmed des références portant sur différents genres bactériens et les mots-clé « désinfectant » ou « biocide » ..... 94
Tableau 18. Dates et saisons des prélèvements dans les 4 abattoirs visités ..... 103
Tableau 19. Capacité (nombre d'animaux abattus par an) et cadence (nombre d'animaux abattus par heure) des abattoirs visités pour les poulets ..... 105
Tableau 20. Capacité (nombre d'animaux abattus par an) et cadence (nombre d'animaux abattus par heure) des abattoirs visités pour les dindes ..... 105
Tableau 21. Nombre de lots prélevés dans les quatre abattoirs ..... 111
Tableau 22. Nombre de prélèvements sur les volailles et dans les caisses de transport en fonction du type de volaille ..... 111

Tableau 23. Nombre de prélèvements sur les machines et le bac d'échaudage en fonction des abattoirs ..... 113
Tableau 24. Amorces utilisées pour l'identification des espèces *C. jejuni* et *C. coli* par PCR d'après (Denis, Soumet et al. 1999) ..... 119
Tableau 25. Valeurs de CMI admises pour *C. jejuni* (ATCC 33560) par la technique de dilution en milieu gélosé. (NCCLS 2002) ..... 123
Tableau 26. Produits désinfectants utilisés pour la détermination des CMI ..... 125
Tableau 27. Séquences des amorces des gènes P*fla* et *gyr*A (Ragimbeau, Salvat et al. 1998) ..... 127
Tableau 28. Mélange réactionnel pour la PCR des gènes P*fla* et *gyr*A ..... 127
Tableau 29. Séquence des amorces du gène *fla*A (Ragimbeau, Salvat et al. 1998) ..... 129
Tableau 30. Préparation du mélange réactionnel pour la PCR du gène *fla*A ..... 129
Tableau 31. Nombre de lots prélevés en fonction des abattoirs, de l'espèce de volaille et de la saison ..... 190
Tableau 32. Isolement des campylobacters dans les prélèvements de fientes et de peaux de cou dans les 4 abattoirs ..... 193
Tableau 33. Pourcentages de résistance aux antibiotiques mesurés pour *C. jejuni* ..... 195
Tableau 34. Pourcentages de résistance aux antibiotiques observés pour *C. coli* ..... 195
Tableau 35. Comparaison des pourcentages de résistance observés entres les prélèvements de fientes et de peaux de cou pour *C. jejuni* et *C. coli*. Valeurs de p (test du $\chi^2$ ou test exact de Fisher) ..... 197
Tableau 36. Pourcentages de résistances observés pour *C. jejuni* sur les prélèvements de fientes et de peau de cou en fonction de l'abattoir et valeur de p (test du $\chi^2$ ou exact de Fisher) ..... 198
Tableau 37. Pourcentages de résistances observés pour *C. jejuni* sur les prélèvements de fientes et de peau de cou en fonction du type de volaille abattue et valeur de p (test du $\chi^2$ ou exact de Fisher) ..... 198
Tableau 38. Pourcentages de résistances observés pour *C. jejuni* sur les prélèvements de fientes et de peau de cou en fonction de la saison et valeur de p (test du $\chi^2$ ou exact de Fisher) ..... 198
Tableau 39. Pourcentages de résistances observés pour *C. coli* sur les prélèvements de fientes et de peau de cou en fonction de l'abattoir et valeur de p (test du $\chi^2$ ou test exact de Fisher) ..... 199
Tableau 40. Pourcentages de résistances observés pour *C. coli* sur les prélèvements de fientes et de peau de cou en fonction du type de volaille abattue et valeur de p (test du $\chi^2$ ou test exact de Fisher) ..... 199
Tableau 41. Pourcentages de résistances observés pour *C. coli* sur les prélèvements de fientes et de peau de cou en fonction de la saison et valeur de p (test du $\chi^2$ ou test exact de Fisher) ..... 199
Tableau 42. Corrélations entre les CMI observées pour les antibiotiques et les désinfectants testés dans les prélèvements de fientes et de peaux de cou pour *C. jejuni* (n=61) ..... 201
Tableau 43. Corrélations entre les CMI observées pour les antibiotiques et les désinfectants testés dans les prélèvements de fientes et de peaux de cou pour *C. coli* (n=16) ..... 202
Tableau 44. Variations minimales des pourcentages de résistances détectables en fonction du nombre de prélèvement de fientes (puissance de l'étude fixée à 80%) ..... 202

# ABREVIATIONS

| | |
|---|---|
| °C | degré celcius |
| µl | microlitre |
| µm | micromètre |
| Ac | anticorps |
| ACM | analyse en composante multiple |
| ADN | acide desoxyribonucléique |
| AFLP | amplified fragment length polymorphism |
| AFNOR | Association française de normalisation |
| AFSSA | Agence française de sécurité sanitaire des aliments |
| AFSSAPS | Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé |
| ARN | acide ribonucléique |
| ARNm | ARN messager |
| ARNr | ARN ribosomique |
| ATCC | american type culture collection |
| BSA | bovine serum albumine |
| C. | campylobacter |
| CA-SFM | Comité de l'antibiogramme de la Société francaise de microbiologie |
| CB | chlorure de benzalkonium |
| CEN | Comité européen de normalisation |
| CLSI | clinical and laboratory standards institute |
| CMB | concentration minimale bactéricide |
| CMI | concentration minimale inhibitrice |
| cMRSA | community-acquired MRSA |
| CNR | centre national de référence |
| $CO_2$ | dioxyde de carbone |
| DANMAP | Danish integrated antimicrobial resistance monitoring and research program |
| dATP | désoxy-adénosine triphosphate |
| dCCP | désoxy-cytosine triphosphate |
| DGAl | Direction générale de l'alimentation |
| dGTP | désoxy-guanidine triphosphate |
| DMI | dose minimale infectieuse |
| dNTP | désoxy-nucléotide triphosphate |
| DO | densité optique |
| dTTP | désoxy-thymidine triphosphate |
| EDTA | acide éthylène-diamine-tétraacétique |
| EFSA | European food safety autority |
| ELISA | enzyme linked immuno sorbent assay |
| EUCAST | European committee on antimicrobial susceptibility testing |
| g | gramme |
| GMH | gélose de Mueller-Hinton |
| IAA | industrie agro-alimentaire |
| InVS | Institut de veille sanitaire |
| ISO | International organisation for standardisation |
| l | litre |
| Mb | megabase |
| mdr | multidrug resistance |
| ml | millilitre |
| mM | millimol/l |

| | |
|---|---|
| MRSA | multi-resistant Staphylococcus aureus |
| $N_2$ | azote |
| NCCLS | National committee for clinical laboratory standards |
| nm | nanomètre |
| $O_2$ | oxygène |
| OMS | Organisation mondiale de la santé |
| pb | paire de bases |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PFGE | pulse field gel electrophoresis |
| pmol | picomole |
| ppm | partie par million |
| QAC | quaternary ammonium compound |
| qsp | quantité suffisante pour |
| RAPD | random amplified polymorphism DNA |
| RFLP | restriction fragment length polymorphism |
| SGB | syndrome de Guillain-Barré |
| SHU | syndrome hémolytique et urémique |
| SMF | syndrome de Miller-Fisher |
| Ta | température ambiante |
| TBE | tampon Tris-borate-EDTA |
| TIAC | toxi-infection d'origine alimentaire |
| U | unité |
| UI | unité internationale |
| UFC | unité formant colonie |
| UPTC | urease positive thermophilic campylobacter |
| UV | ultra-violet |
| V. | Vibrio |
| VNC | viable non cultivable |

# INTRODUCTION

Les campylobacters ont été reconnus comme agents pathogènes pour l'homme dans les années 70. La première description de campylobacter semble remonter en 1886 par Theodor Escherish (Escherish 1886). Des bactéries spiralées sont isolées du colon d'enfants, morts de ce qu'il nomme le « cholera infantum ». Escherish publie ses résultats en allemand, dans la revue Munchener Medizinische Wochenschrift (Revue médicale hebdomadaire de Munich). Ses travaux ne seront reconnus qu'en 1985 au cours du troisième congrès sur campylobacter à Ottawa ! (Butzler 2004) Dans le domaine vétérinaire, les campylobacters sont connus comme agents pathogènes depuis une quarantaine d'années. Mc Fadyean et Stockman décrivent en 1906 des avortements épizootiques chez des brebis et isolent des produits d'avortement une bactérie proche de Vibrio (McFadyean and Stockman 1913). En 1919, Smith isole d'avortements de bovins des bactéries qui lui rappellent les bactéries décrites par Mc Fadyean et Stockman. Ces chercheurs rapprochent leurs travaux et nomment ces bactéries « *Vibrio fetus* » (Smith and Taylor 1919). Plus tard, en 1949, Stegenga et Terpstra démontrent le rôle pathogène d'une bactérie spiralée isolée lors d'infertilité enzootique bovine qu'ils rapprochent de *Vibrio fetus* et qu'il nomment *Vibrio fetus venerealis* (Stegenga and Terpstra 1949). En 1959, Florent distingue sur des critères biochimiques et pathogènes *V. fetus venerealis* et *V. fetus intestinalis* (Florent 1959). En 1931, Jones et al. attribuent les épisodes de « diarrhée d'hiver » chez des bovins à un vibrio qu'ils nomment *Vibrio jejuni* (Jones, Orcutt et al. 1931), et en 1944, Doyle isole une bactérie similaire dans des diarrhées chez le porc, *Vibrio coli* (Doyle 1944). Les premières infections humaines sont décrites en 1947 par Vinzent et al. Des « *Vibrio fetus »* sont isolées dans le sang de trois femmes enceintes admises pour hyperthermie d'origine indéterminée. Deux des trois femmes avortent (Vinzent, Dumas et al. 1947). Cependant, avant cette publication, un évènement avait eu lieu en Illinois en 1938, évènement qui est maintenant reconnu comme le premier rapport d'une toxi-infection collective à campylobacter. Dans deux prisons adjacentes de cet état, 335 prisonniers présentaient une diarrhée liée à la consommation de lait. Des bactéries proches de « *Vibrio jejuni* » ont été cultivées à partir du sang de 13 des prisonniers malades, mais les cultures fécales de 73 malades ne permirent pas la mise en évidence de ces bactéries, alors qu'elles étaient observables au microscope dans 31 cas (Levy 1946). En 1957, King décrit un lien entre le « Vibrio » décrit par Jones et al. et des diarrhées chez l'homme (King 1957) et jusqu'en 1972, seuls 12 cas d'infections liées à ce proche parent du « Vibrio » sont décrits. En 1963, Sebald et Veron montrent sur des critères de métabolismes de fermentation et du ratio C + G que *V. fetus* est notablement différent des autres espèces de Vibrio et le nomment *Campylobacter fetus* (Sebald and Veron 1963). L'émergence des campylobacters depuis les années 70 est intimement liée à la mise au point de techniques de culture et de milieux sélectifs qui ont permis leur identification en routine dans les laboratoires. Au départ assimilé au genre Vibrio, il s'est écoulé presque un siècle entre la première observation de ce microorganisme par Escherish et la reconnaissance de l'importance des campylobacters d'un point de vue clinique, écologique et économique (Snelling, Matsuda et al. 2005;

Skirrow 2006). De nos jours, le système de surveillance des infections à campylobacter chez l'homme, mis en place en 2002 en France, estime entre 12796 et 17322 le nombre de cas annuels. Les campylobacters sont la deuxième cause, derrière les salmonelles, d'hospitalisation pour toxi-infection alimentaire (2598 à 3156 cas) et sont responsables de 13 à 18 décès estimés par an (InVS 2004). La transmission humaine est majoritairement alimentaire par consommation d'aliments contaminés, principalement la volaille. L'infection à campylobacter se manifeste essentiellement par une diarrhée, dont l'évolution est le plus souvent favorable en 2 à 5 jours. Le traitement antibiotique n'est en général pas nécessaire, sauf pour les cas les plus graves. Les molécules de choix sont l'érythromycine et la ciprofloxacine. La présence de bactéries résistantes aux antibiotiques dans les aliments d'origine animale est une menace sérieuse pour la santé publique. Depuis quelques décennies, l'augmentation de la résistance aux antibiotiques a soulevé de nombreuses interrogations. Bien que quelques bactéries présentent une résistance intrinsèque vis-à-vis de certains antibiotiques, l'émergence de la résistance dans des populations bactériennes initialement sensibles a été associée à l'utilisation des antibiotiques (Davison, Low et al. 2000). Mais d'autres facteurs semblent participer à l'émergence et à la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Différents auteurs ont avancé l'hypothèse d'une relation entre la résistance aux antibiotiques et l'utilisation des désinfectants, qui reposerait soit sur des mécanismes de résistance communs entre les molécules (Russell 2002), soit sur la co-sélection de gènes de résistance aux antibiotiques lors de la pression de sélection exercée par les désinfectants (Sidhu, Sorum et al. 2002). Les stress environnementaux (température, pH, pression osmotique, oxygène) rencontrés par les bactéries au cours de procédés d'abattage peuvent être également suspectés de moduler la résistance aux antibiotiques (McMahon, Xu et al. 2007).

L'hypothèse étudiée dans cette thèse est que la résistance aux antibiotiques des campylobacters est modulée par les procédures de nettoyage et désinfection et par les procédés d'abattage dans les abattoirs de volailles.

Le chapitre 1 correspond à une revue de la bibliographie décrivant nos connaissances sur les campylobacters, leur cycle épidémiologique de la volaille à l'homme, leur résistance aux antibiotiques et aux désinfectants et les mécanismes de survie identifiés chez ces bactéries. Le chapitre 2 présente l'ensemble des matériels et des méthodes utilisés pour tester notre hypothèse. De nombreuses méthodes sont décrites pour l'étude de la sensibilité aux désinfectants, le chapitre 3 présente les résultats méthodologiques qui nous ont conduits à retenir la méthode de la mesure des concentrations minimales inhibitrices (CMI). Le chapitre 4 correspond aux résultats relatifs à l'isolement des campylobacters après les procédures de nettoyage et désinfection dans les abattoirs de volailles et à l'étude de cette potentielle source de contamination des carcasses. Le chapitre 5 présente les résultats concernant les caractéristiques phénotypiques et génotypiques des campylobacters isolés après nettoyage et désinfection. Le chapitre 6 présente les résultats relatifs à l'évolution de la résistance aux antibiotiques des campylobacters avant et après l'abattage des volailles. Enfin, le dernier chapitre reprend les conclusions et les perspectives des résultats obtenus.

**Figure 1. Arbre phylogénique des espèces du genre *Campylobacter* sp. et des bactéries proches sur la comparaison des séquences des gènes de l'ARNr 16S d'après (On 2005)**

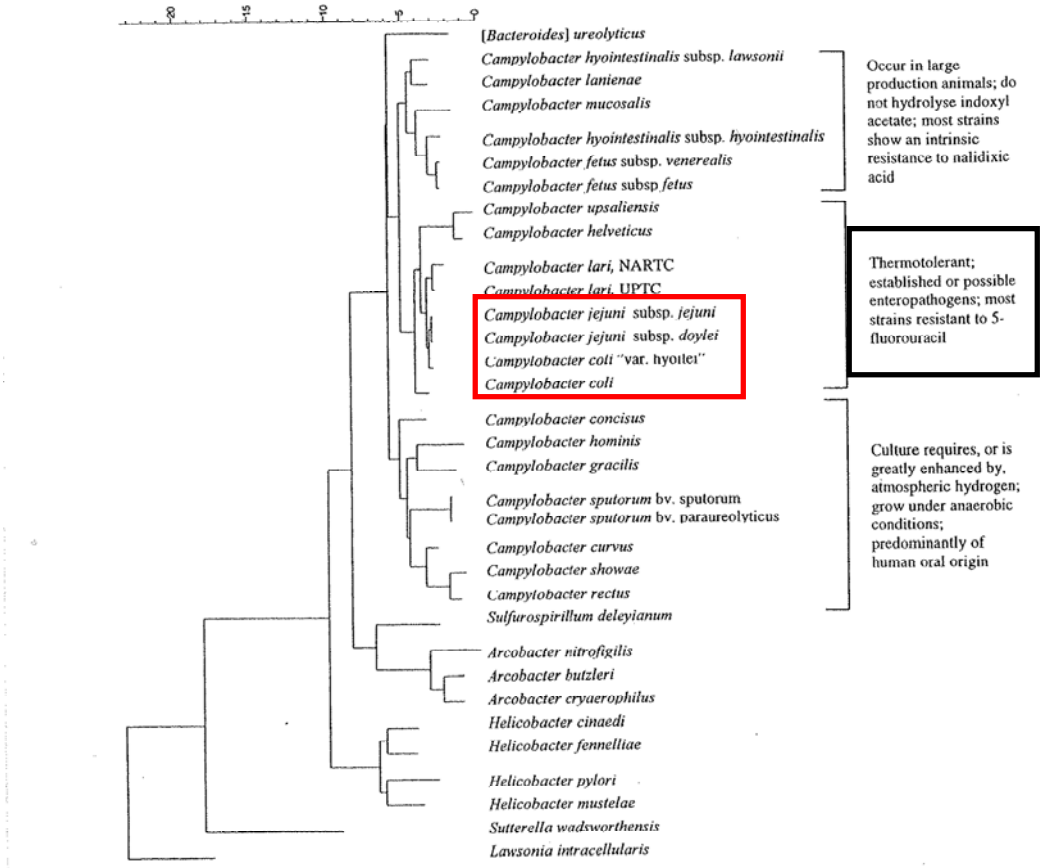
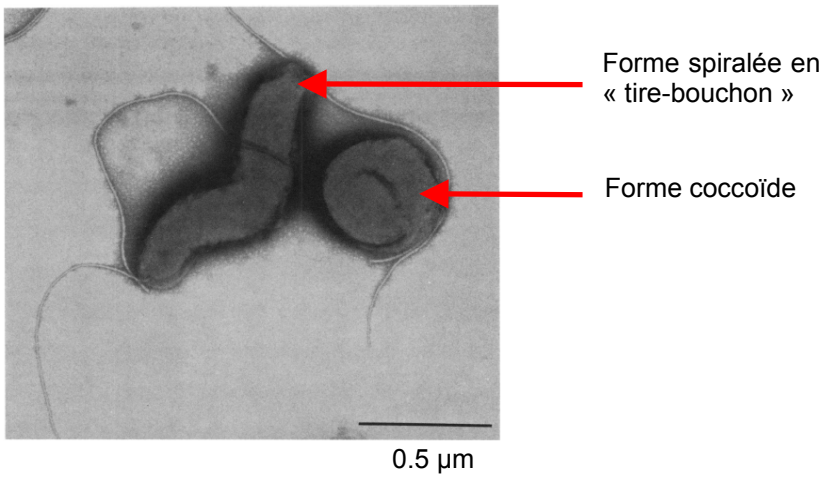



**Figure 2. Photographie au microscope électronique de *C. jejuni* (Ng, Sherburne et al. 1985)**



# CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1 Description générale des campylobacters

### 1.1 Taxonomie, phylogénie

Les campylobacters appartiennent à la superfamille VI des protéobactéries (anciennement groupe des bactéries à coloration de Gram négative). Cette superfamille comprend 4 genres : *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* et *Wolinella*. Les campylobacters et les arcobacters appartiennent à la famille des *Campylobacteriacae* dont le genre *Campylobacter* est le genre type. Aujourd'hui, 16 espèces sont décrites, 6 sous-espèces et de nombreux biovars. La plupart d'entre elles présente une importance clinique et/ou économique. Au sein du genre *Campylobacter*, il est possible de classer les espèces en 3 groupes : le groupe thermotolérant, le groupe « fetus » et le groupe anaérobie. *C. jejuni* et *C. coli* appartiennent au groupe thermotolérant (On 2005). *C. jejuni* comprend 2 sous-espèces qui diffèrent substantiellement dans leur répartition et dans une moindre mesure dans leur écologie. *C. jejuni* subsp. *jejuni* est souvent noté *C. jejuni*. Il correspond au taxon qui avait été isolé par Jones et al. en 1931 (Jones, Orcutt et al. 1931). L'arbre phylogénique des campylobacters est présenté sur la figure 1.

### 1.2 Morphologie des campylobacters

Les *Campylobacteriacae* sont des bactéries incurvées, spiralées ou en forme de S. Leur taille varie de 0,2 à 0,9 µm d'épaisseur et de 0,5 à 5 µm de long. Ces bactéries sont mobiles, munies d'un flagelle polaire unique à l'une ou à leurs deux extrémités (Federighi 1999; Megraud 2000; Snelling, Matsuda et al. 2005). L'observation au microscope montre un déplacement caractéristique souvent décrit comme un « vol de moucheron » ou « en tire-bouchon ».

Les cellules bactériennes au sein d'une colonie présentent une hétérogénéité d'âges et d'états physiologiques. Il est admis qu'à la périphérie de la colonie, les cellules sont très actives, en croissance alors qu'au centre et à la surface de la colonie, les nutriments sont moins disponibles et les cellules tendent à vieillir et à être moins actives. Dans une colonie de *C. jejuni* (cultivée sur un milieu gélosé), différentes formes prédominent dans les différentes zones de la colonie. Les formes spiralées sont majoritaires à la périphérie et les cellules coccoïdes sont plutôt au centre de la colonie. Cette observation suggère que les formes spiralées sont des bactéries en activité, alors que les formes coccoïdes sont des formes de vieillissement. Les différentes formes de *C. jejuni* sont visibles sur la photographie de la figure 2 (Ng, Sherburne et al. 1985).

### 1.3 Génome des campylobacters

Le génome de la souche *C. jejuni* NCTC 11168, a été publié en février 2000 (Parkhill, Wren et al. 2000). La bactérie possède un chromosome circulaire de 1,64 Mb. Le pourcentage G+C est parmi les plus bas chez les bactéries (30-38%). Le génome des campylobacters est de très petite taille (par exemple, le génome d'*Escherichia coli* est d'environ 5 Mb). Cette petite taille est sans doute à relier à

la nature délicate et aux exigences nutritionnelles de ce microorganisme. Ce handicap est compensé par les très grandes capacités de réarrangements génomiques (Federighi 1999). De plus, l'analyse du génome de campylobacter a révélé que ce micro-organisme est démuni de la plupart des mécanismes de réparation de l'ADN présent chez les autres genres bactériens (Parkhill, Wren et al. 2000). Ces observations pourraient expliquer les taux de mutation élevés observés chez cette bactérie.

# 2 Détection et isolement des campylobacters

Une des raisons qui explique la longue durée écoulée entre la première observation de campylobacter et sa culture au laboratoire est certainement liée aux nombreuses exigences que ces microorganismes arborent. Le développement d'un milieu sélectif de culture pour l'isolement des campylobacters dans les selles humaines par Martin Skirrow en 1977 (Skirrow 1977) a permis de confirmer le rôle de cette bactérie dans la maladie chez l'homme. Avant la mise au point de ce milieu sélectif, la détection des campylobacters se faisait par filtration sur membrane des selles de patients malades sur un milieu non sélectif, ce qui représentait un travail lourd et laborieux. Bien que le milieu de Skirrow soit efficace pour isoler les campylobacters des prélèvements fécaux humains, il était beaucoup plus difficile à appliquer aux prélèvements animaux et environnementaux, en raison des autres espèces bactériennes présentes dans ces prélèvements. Ceci a conduit à la mise au point en 1982 par Bolton du milieu sélectif de Preston, qui permettait l'isolement de campylobacter à partir prélèvements d'aliments ou d'environnement (Bolton and Robertson 1982). Dans les années qui ont suivi ces publications, des milieux plus sensibles et plus sélectifs ont permis d'améliorer la détection des campylobacters (Moore, Corcoran et al. 2005).

## 2.1 Conditions générales de culture de campylobacter

### 2.1.1 Atmosphère

- Microaérophilie : les campylobacters se cultivent en présence d'une atmosphère appauvrie en oxygène, comprise entre 3 et 15% (Federighi 1999; Megraud 2000; On 2005).
- Capnophilie : les campylobacters exigent une atmosphère enrichie en $CO_2$ (10%) pour cultiver (Federighi 1999; Megraud 2000; On 2005).

Actuellement, ces conditions atmosphériques sont facilement obtenues soit dans des jarres avec des sachets générateurs en présence d'un catalyseur, soit dans une étuve par l'utilisation directe du mélange gazeux stocké dans des bouteilles, permettant de réguler les quantités de $CO_2$ (Federighi 1999).

### 2.1.2 Température

Une température d'incubation de 37°C permet le développement de toutes les espèces de campylobacter connues. Mais la capacité de croissance à d'autres températures constitue un caractère différentiel d'espèces important, notamment à 25° et 42°C.

On observe des espèces se développant à 25°C et non à 42°C parmi lesquelles *Campylobacter fetus* et des espèces se développant à 42°C et non à 25°C, appelés campylobacters thermotolérants, dont les espèces d'intérêt en hygiène des aliments (Dromigny 2007).

**Tableau 1. Composition des principaux milieux solides et liquides pour les campylobacters thermotolérants d'après Corry, Post et al. (1995)**

| | Base | Système antioxydant | Céfopérazone (mg/l) | Trimethoprime (mg/l) | Polymyxine B ou Colistine (C) (UI) | Vancomycine (mg/l) | Rifampicine (UI) | Antifongique (mg/l) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Preston** (Bolton and Robertson 1982) | Bouillon nutritif | 5% sang de cheval lysé | - | - | 5000 | - | 10 | Cycloheximide 50 |
| **Skirrow** (Skirrow 1977) | Gélose au sang | 7% sang de cheval lysé | - | 5 | 2500 | 10 | - | - |
| **Karmali** (Karmali, Simor et al. 1986) | Gélose Colombia | 4 g de charbon, 0.32 g d'hématine ; 0.1 g de pyruvate de sodium | 32 | - | - | - | - | - |
| **Butzler (Virion)** (Goossens, De Boeck et al. 1983) | Bouillon nutritif | 5-7% de sang de mouton | 15 | - | 10 000 (C) | - | 10 | Amphotéricine B |

On peut donc en conclure qu'une incubation à 37°C sur des milieux non sélectifs permettra la culture de toutes les espèces de campylobacter tandis que 42°C constituera la température optimale de recherche de *C. jejuni* et *C. coli*. Il semble que la température d'incubation de 42°C pour les campylobacters thermotolérants soit un avantage pour le faible compétiteur microbiologique qu'est campylobacter, car dans les prélèvements polymicrobiens (prélèvements fécaux et alimentaires par exemple), les germes de la flore compétitive ont souvent une croissance moins importante à 42°C. Cette température d'incubation va ainsi renforcer la sélectivité du milieu (Federighi 1999).

## 2.2 Méthodes de détection

### 2.2.1 Choix de la méthode en fonction de l'origine des prélèvements

L'origine des prélèvements influe sur :

- Le niveau de contamination par campylobacter : par exemple, les prélèvements de fientes de volailles contiennent environ $10^6$ à $10^8$ UFC/g, les prélèvements d'aliments ou d'eau en contiennent beaucoup moins (en relation avec leur niveau de contamination).
- L' « état » des campylobacter : dans les prélèvements environnementaux, les campylobacters sont souvent dit « stressés ». Ils ont été prélevés dans un milieu peu propice à leur croissance, souvent dépourvu en nutriments. Dans ce cas, les campylobacters vont nécessiter une phase de « récupération » de quelques heures dans un milieu non sélectif (Humphrey 1989).

Si la culture des campylobacters est réalisée directement à partir du prélèvement, on parlera d'isolement direct. Si elle est réalisée après une phase d'enrichissement, on parlera d'isolement indirect.

### 2.2.2 Enrichissement

Cette phase d'enrichissement permet d'augmenter le nombre de campylobacters dans le milieu. Elle favorise la détection des campylobacters dans les prélèvements où ces bactéries sont en faible nombre, ou stressées et/ou en présence d'une flore compétitive abondante. L'enrichissement est donc recommandé pour les prélèvements d'environnements (Newell, Shreeve et al. 2001).

L'enrichissement consiste à incuber les prélèvements dans des bouillons sélectifs (contenant des antibiotiques) pendant 24 à 48h à 37°C (Bolton and Robertson 1982). Ces bouillons sélectifs dérivent pour la plupart des milieux solides les plus connus (par exemple : Bouillon d'enrichissement de Preston).

### 2.2.3 Technique de culture sélective des campylobacters

Deux possibilités existent pour cultiver sélectivement les campylobacters : les milieux sélectifs et la filtration.

#### 2.2.3.1 La filtration

Dans les milieux polymicrobiens, il existe une alternative à l'utilisation des milieux sélectifs pour éliminer la flore compétitive de campylobacter : la technique de filtration. La suspension est déposée sur un filtre (pores de 0,65 µm de diamètre) posé sur une gélose au sang ou au chocolat. Le filtre est

**Tableau 2. Caractéristiques phénotypiques des espèces du genre *Campylobacter* (Megraud 2000)**

| | Développement | | | Catalase | Inodoxyl acétate esterase | Uréase | Hippuricase | Acide nalidixique | Céfalotine | Nitrate réductase | $H_2S$ en milieu TSI |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Air | 25° | 42° | | | | | | | | |
| Groupe thermotolétant | | | | | | | | | | | |
| *C. jejuni* subsp. *jejuni* | - | - | + | + | + | - | + | S (quelques souches R) | R | + | - |
| *C. jejuni* subsp. *doylei* | - | - | - | +/- | variable | - | + | S | S | - | - |
| C. coli | - | - | + | + | + | - | - | S (quelques souches R) | R | + | + |
| C. lari | - | - | + | + | - | - | - | R | R | + | - |
| C. lari biovar UPTC | - | - | + | +/- | + | + | - | S | S | + | - |
| C. upsaliensis | - | - | + | +/- | + | - | - | S | S | + | - |
| Groupe « fetus » | | | | | | | | | | | |
| C. fetus | - | + | variable | + | - | - | - | R | S | + | - |
| C. hyointestinalis | - | variable | variable | + | - | - | - | R | S | + | + |

S: sensible; R: résistant, UPTC: urease positive thermophilic campylobacter

retiré après un temps variable (30 minutes à 2 heures) et la gélose est incubée à 37°C. Seuls les campylobacters sont capables de traverser le filtre et se développent sur la gélose. Cette technique, longue et fastidieuse, permet d'isoler les espèces fragiles de campylobacter et nécessite que les prélèvements soient très riches en campylobacter (Federighi 1999).

#### 2.2.3.2 Les milieux sélectifs

Les milieux sélectifs sont des géloses ou des bouillons au sang additionnées de plusieurs antibiotiques qui vont inhiber la flore saprophyte des prélèvements. Les campylobacters sont sensibles au stress oxydatif, donc la plupart de ces milieux contient des ingrédients qui protègent les campylobacters des effets toxiques des oxydants. Les plus utilisés sont le sang défibriné ou lysé, le charbon de bois, des combinaisons de sulfate de fer, de métasulfite de sodium et de pyruvate de sodium (FPB) et l'hématine (Corry, Post et al. 1995).

Les 3 milieux les plus connus sont (Corry, Post et al. 1995):

- le milieu de Skirrow (Skirrow 1977)
- le milieu de Karmali (Karmali, Simor et al. 1986)
- le milieu de Butzler (Virion) (Goossens, De Boeck et al. 1983)

La composition du milieu d'enrichissement de Preston et de ces 3 milieux sélectifs est indiquée dans le tableau 1.

Les géloses sont ensuite incubées pendant 48 h à 37°C ou 42°C en fonction des espèces de campylobacter recherchées.

Après isolement, il est possible de cultiver les isolats de campylobacter sur des géloses non sélectives comme la gélose de Mueller-Hinton complémentée de 5% de sang de mouton défibriné.

## 2.3 Identification des campylobacters

### 2.3.1 Aspect des cultures

En bouillon ou en bouillon semi-gélosé, la culture se manifeste par un trouble léger. En boite de Petri, les colonies apparaissent généralement au bout de 48 h à 72 h, elles sont petites (1 à 2 mm de diamètre), arrondies, grisâtres ou translucides (Dromigny 2007).

### 2.3.2 Identification au microscope

L'examen microscopique peut avoir un intérêt à l'état frais, on observe un aspect en vol de moucheron. Un frottis coloré peut permettre à un observateur exercé de noter la présence de bactéries incurvées de petite taille (Megraud 2000).

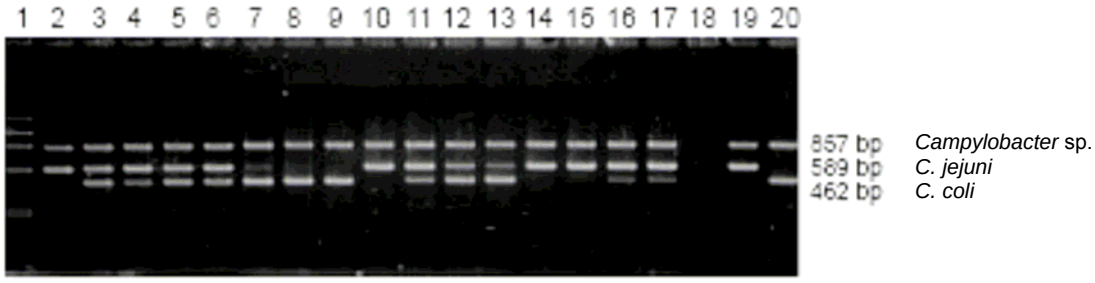
### 2.3.3 L'identification phénotypique

La détermination de l'espèce nécessite des tests complémentaires qui sont indiqués sur le tableau 2. Cependant, la sensibilité à l'acide nalidixique a perdu beaucoup de son intérêt du fait des résistances acquises, maintenant très fréquentes chez *C. jejuni* et encore plus chez *C. coli* (Megraud 2000).

**Tableau 3. Gènes, séquences et taille des produits d'amplification pour l'identification du genre *Campylobacter* sp. et des espèces *C. jejuni* et *C. coli* (Denis, Soumet et al. 1999)**

| Gene | Primer sequence | Primer origin and modification | Amplification |
|---|---|---|---|
| *16S rRNA* | MD16S1 upper primer<br>5′ ATC TAA TGG CTT AAC CAT TAA AC 3′ | CCCJ609F from Linton *et al.* 1997 modified in this work | 857 bp for *Campylobacter* genus |
| | MD16S2 lower primer<br>5′ GGA CGG TAA CTA GTT TAG TAT T 3′ | CCCJ1442R from Linton *et al.* 1997 modified in this work | |
| *mapA* | MDmapA1 upper primer<br>5′ CTA TTT TAT TTT TGA GTG CTT GTG 3′ | Primers selected in this work from the *mapA* gene sequence published by Stucki *et al.* 1995 | 589 bp for *jejuni* species |
| | MDmapA2 lower primer<br>5′ GCT TTA TTT GCC ATT TGT TTT ATT A 3′ | | |
| *ceuE* | COL3 upper primer<br>5′ AAT TGA AAA TTG CTC CAA CTA TG 3′ | Oligonucleotide used as probe by Gonzalez *et al.* 1997 | 462 bp for *coli* species |
| | MDCOL2 lower primer<br>5′ TGA TTT TAT TAT TTG TAG CAG CG 3′ | COL2 from Gonzalez *et al.* 1997 modified in this work | |

**Figure 3. Séparation par électrophorèse en gel d'agarose des produits de la PCR multiplex pour la recherche et l'identification du genre *Campylobacter* sp. et des espèces *C. jejuni* et *C. coli* (Denis, Soumet et al. 1999)**



#### 2.3.4 Identification de l'espèce par des méthodes de biologie moléculaire

Il a été défini de nombreuses amorces spécifiques du genre *Campylobacter* et des espèces *C. jejuni* et *C. coli* (Gonzalez, Grant et al. 1997; Lawson, Linton et al. 1997; Linton, Lawson et al. 1997). La liste des amorces mis au point et la visualisation des produits obtenus par Denis et al. (1999) sont indiqués dans le tableau 3 et la figure 3 (Denis, Soumet et al. 1999).

#### 2.3.5 Milieux de conservation

Les souches peuvent être conservées pendant de nombreuses années stockées à – 80°C en ajoutant dans le milieu des agents cryoprotecteurs comme le glycérol à 25% (Federighi 1999).

### 2.4 Méthode de détection dans les aliments

En raison du grand nombre de milieux d'enrichissement et d'isolement existants pour campylobacter, de nombreuses combinaisons sont possibles. Il existe cependant une méthode de référence normalisée pour la détection des campylobacters dans les aliments : la norme NF-ISO 10272 :1995 (figure 4).

### 2.5 Difficultés de la détection des campylobacters

Les méthodes de détection des campylobacters sont lentes, il faut plus de 48 h avec un échantillon de selles humaines pour aboutir à un isolat qui nécessitera ensuite confirmation avec les tests phénotypiques. Dans le cas des échantillons d'aliments où le nombre de campylobacters est beaucoup plus faible et où ils sont présents au sein d'une abondante flore compétitive, l'isolement est précédé d'une phase d'enrichissement dans un milieu sélectif. La détection de campylobacter dans des échantillons d'aliments peut prendre jusqu'à 12 jours.

Les méthodes de culture ne sont pas très adaptées à l'isolement des espèces rares comme *C. upsaliensis* ou *C. lari*, ce qui peut entraîner un sous-diagnostic et une sous-estimation de la véritable prévalence de ces espèces chez l'homme. De plus, il a été démontré que certaines souches de *C. coli* étaient inhibées par les antibiotiques du milieu d'enrichissement de Preston, ce qui entraîne également un risque de sous-estimation de la prévalence des *C. coli* dans les prélèvements (Corry, Post et al. 1995).

## 3 Typage des campylobacters

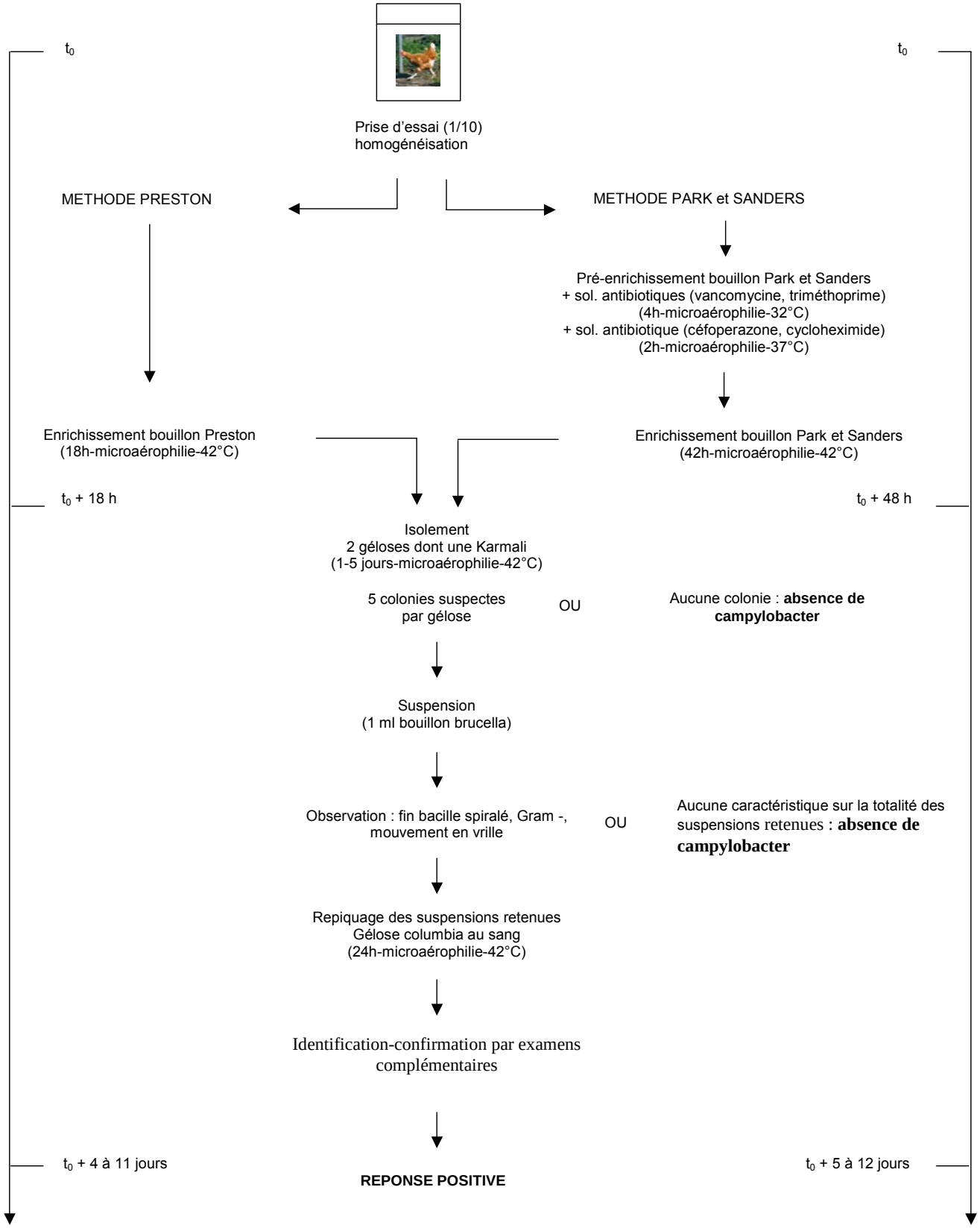
### 3.1 Objectifs des méthodes de typage

#### 3.1.1 Objectifs généraux

Les méthodes de typage visent à classer les bactéries en groupe en fonction du critère étudié. Dans le cas des campylobacters, la compréhension de la structure des populations bactériennes doit permettre d'apporter des connaissances sur l'épidémiologie de ces pathogènes.

L'objectif est de mettre en évidence des liens entre les phénotypes et les génotypes, ou des liens entre les espèces hôtes des pathogènes ou les syndromes observés cliniquement et certains

**Figure 4. Représentation schématique du mode opératoire de la méthode de référence de recherche des campylobacter dans les aliments (selon la norme NF-ISO 10272:1995)**



génotypes (Dingle and Maiden 2005). Ces informations participent à la compréhension de la pathogenèse, de la transmission et parfois de la prévention des maladies (Foxman, Zhang et al. 2005). En fonction des méthodes, différents marqueurs épidémiologiques peuvent être utilisés : marqueurs morphologiques (couleur, forme…), marqueurs moléculaires (ADN), marqueurs biochimiques (protéines, métabolites secondaires…).

### 3.1.2 Critères de sélection d'une méthode de typage

Il n'existe pas de technique de typage unique qui soit utilisable pour tous les types d'enquêtes épidémiologiques. La technique doit être choisie en fonction des objectifs : il peut s'agir de la mise en évidence d'un lien entre les souches lors d'une épidémie, ou la recherche de relations épidémiologiques entre des souches en l'absence de données épidémiologiques (analyse phylogénique par exemple) ou encore de décrire la distribution de groupes de souches et identifier les déterminants de ces groupes (Foxman, Zhang et al. 2005).

#### 3.1.2.1 Pouvoir discriminant ou sensibilité

Le pouvoir discriminant est l'aptitude d'une technique de typage à établir une distinction entre les différents individus d'une population bactérienne. Plus le pouvoir discriminant est élevé, plus le nombre de groupes observés est important. Plus une technique est discriminante plus la taille des clusters obtenus sera petite et réciproquement.
Le pouvoir discriminant peut également être défini comme la probabilité moyenne qu'un système de typage assigne le même type à des souches tirées au hasard d'un même groupe (Foxman, Zhang et al. 2005).

#### 3.1.2.2 Pourcentage de souches auquel peut s'appliquer la méthode de typage : la « typabilité »

Pour de nombreuses techniques, il a été observé des souches non-typables. Les motifs sont intrinsèquement liés à la technique utilisée. Par exemple, pour certaines techniques nécessitant une extraction de l'ADN bactérien, certaines souches produisent des nucléases. Ces enzymes lysent le chromosome avant que la réaction d'amplification n'ait lieu.

#### 3.1.2.3 Fidélité d'un technique : définitions

La fidélité d'une technique correspond à l'étroitesse d'accord entre des résultats d'essais indépendants obtenus sous des conditions stipulées.

- Reproductibilité

Les conditions de reproductibilité sont les conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d 'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents (norme NF : ISO 5725-1 :1994). En d'autres termes, une technique est dite « reproductible » si le même résultat est obtenu (en prenant en compte l'intervalle de confiance du résultat observé) pour la même analyse sur le même échantillon dans des laboratoires différents.

- Répétabilité de la technique de typage

Les conditions de répétabilité sont les conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d 'essais identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps (norme NF : ISO 5725-1 :1994).

En d'autres termes, une technique est dite « répétable » si le même résultat est obtenu (en prenant en compte l'intervalle de confiance du résultat observé) pour la même analyse sur le même échantillon dans le même laboratoire.

Au sein des méthodes génotypiques, les méthodes basées sur le séquençage sont plus répétables et reproductibles que les méthodes basées sur des techniques de séparation par électrophorèse (Foxman, Zhang et al. 2005).

#### 3.1.2.4 Faisabilité de la méthode : disponibilité et coût

La méthode utilisée doit être disponible, c'est à dire que la mise en œuvre ne doit pas être trop complexe et les laboratoires doivent pouvoir se procurer facilement les réactifs ou l'équipement nécessaire, le tout pour un coût le plus faible possible. Pour les techniques de sérotypage, les sérums sont produits en faible quantité, donc difficilement disponibles pour les laboratoires en routine. Les techniques de séquençage sont onéreuses. Ces deux aspects doivent donc être pris en compte dans la faisabilité des techniques.

#### 3.1.2.5 Concordance du système de typage avec les autres méthodes

Plus les systèmes de typage mettront en évidence les même regroupements, meilleure sera la probabilité d'un lien entre les isolats (Moller Nielsen, Engberg et al. 2000).

## 3.2 Difficultés liées à l'étude des campylobacters

Les campylobacters présentent une grande diversité, aussi bien au niveau phénotypique qu'au niveau génotypique (Wassenaar and Newell 2000). Les méthodes de typage de campylobacter font l'objet de nombreuses recherches. Sur la banque de recherche d'information Scopus®, lorsqu'on tape les mots clés « campylobacter » et « typing », on obtient plus de 600 titres d'articles (requête faite le 24/05/2007).

### 3.2.1 Grand nombre d'hôtes

Une des difficultés liée à l'étude des populations des campylobacters et en particulier de *C. jejuni* est que cette bactérie est présente chez un grand nombre d'espèces animales et qu'elle est ubiquitaire dans l'environnement (Wassenaar and Newell 2000; Dingle and Maiden 2005). Le grand nombre d'hôtes observés pour cette bactérie peut être relié à la diversité génétique de *C. jejuni* (Dingle and Maiden 2005).

**Tableau 4. Schéma de classification biotypique de Skirrow and Benjamin (1980)**

| Test | *C. fetus* | *C. jejuni* | *C. coli* | *C. lari* |
|---|---|---|---|---|
| Croissance à 25°C | + | - | - | - |
| Croissance à 43°C | - | + | + | + |
| Acide nalidixique (30µg/disque) | R | S | S | R |
| Hydrolyse de l'hippurate | - | + | - | - |
| Production d'$H_2S$ en présence de fer | - | - | - | + |

S : sensible ; R : résistant

**Tableau 5. Schéma de classification biochimique d'après Lior (1984)**

| Test | *C. jejuni* | | | | *C. coli* | | *C. lari* | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Biotype | I | II | III | IV | I | II | I | II |
| Hydrolyse de l'hippurate | + | + | + | + | - | - | - | - |
| Test $H_2S$ rapide | - | - | + | + | - | - | + | + |
| Hydrolyse de l'ADN | - | + | - | + | - | + | - | + |

### 3.2.2 Maladie sporadique

Les infections à campylobacter sont le plus souvent sporadiques et les épidémies sont rares, ce qui entraîne des difficultés pour caractériser l'épidémiologie de la maladie (Wassenaar and Newell 2000; Fitzgerald, Sails et al. 2005).

### 3.2.3 Diversité génétique et instabilité génétique

Les bactéries sont capables de réaliser des échanges horizontaux de matériel génétique qui n'incluent que certaines parties du chromosome bactérien. Ces échanges ont lieu au cours de procédés parasexuels variés comme la conjugaison, la transduction ou la transformation. La structure d'une population bactérienne dépend des taux relatifs des points de mutation et de recombinaison. La diversité génétique et phénotypique des campylobacters a été mise en évidence par de nombreuses études, par conséquent, l'analyse d'une seule caractéristique phénotypique ou génotypique a une faible valeur épidémiologique (Wassenaar and Newell 2000; Dingle and Maiden 2005).

Quatre processus d'évolution liés mais distincts influent sur la structure des populations bactériennes :

- Les points de mutation
- Les phénomènes de recombinaison
- La sélection par le milieu (positive ou négative)
- Les processus démographiques (par exemple la croissance bactérienne)

Les relations génétiques entre les individus de populations clonales peuvent être modélisées par des arbres phylogéniques ou les branches sont générées par des mutations.

Chez *C. jejuni*, il a été mis en évidence de nombreux réarrangements intrachromosomiques qui peuvent toucher l'ensemble du chromosome ou certains loci individuels comme les gènes de la flagelline. De plus, le chromosome de *C. jejuni* est fréquemment soumis à des échanges chromosomiques horizontaux (Schouls, Reulen et al. 2003; Dingle and Maiden 2005).

Une instabilité génétique liée à des échanges inter- et intrachromosomiques a été mise en évidence, même en l'absence de pression de sélection (Fitzgerald, Sails et al. 2005). Pour les méthodes génotypiques, en général, les cultures successives ainsi que la conservation n'ont pas d'effet sur le génotype mais peuvent avoir un effet pour les méthodes phénotypiques (sérotypes).

## 3.3 Méthodes phénotypiques utilisées pour le typage de campylobacter

### 3.3.1 Biotypage

Cette technique de typage consiste à déterminer les caractères biochimiques des isolats étudiés. La première grande distinction entre les différentes espèces de campylobacter est fondée sur la présence ou non d'une catalase. La grande majorité des campylobacters sont catalases positive, cependant, *C. upsaliensis*, qui fait partie des 4 espèces d'intérêt en hygiène des aliments, peut apparaître catalase négative pour certaines souches. Ces tests peuvent être complétés par l'étude de la croissance à différentes températures ou la résistance à certains antibiotiques. Skirrow et Benjamin en 1980 et Lior en 1984 proposent des schémas de classification biologiques qui sont présentés sur les tableaux 4 et 5 (Skirrow and Benjamin 1980; Lior 1984).

Il existe également une galerie API CAMPY® commercialisée par Biomerieux permettant l'identification en 24h des campylobacters à l'origine d'entérite chez l'homme dont le principe repose sur l'analyse du biotype.

### 3.3.2 Sérotypage

Le sérotypage est une technique de typage qui permet de distinguer les différents individus d'une population en groupes présentant un jeu commun d'antigènes. Pour campylobacter, 2 schémas de typage sont reconnus : le schéma de Penner (Penner, Hennessy et al. 1983) basé sur l'utilisation des antigènes thermostables et le schéma de Lior (Lior, Woodward et al. 1982) basé sur les antigènes protéiques thermolabiles.

### 3.3.3 Lysotypage : typage par les phages

La détermination du lysotype est une technique d'identification fondée sur la lyse sélective par des bactériophages. Différents schémas de lysotypage sont décrits pour *C. jejuni* et *C. fetus* (Federighi 1999).

### 3.3.4 Intérêts et inconvénients des méthodes de phénotypage

Les méthodes de typage phénotypique sont le plus souvent des méthodes rapides et faciles à mettre en œuvre. Ce sont les premières méthodes qui ont été développées et elles permettent une première approche de l'étude de la population bactérienne. Elles restent indispensables pour compléter les résultats obtenus avec d'autres méthodes plus discriminantes et les données épidémiologiques (Lukinmaa, Nakari et al. 2004).

Les méthodes phénotypiques sont développées pour une espèce bactérienne et ne sont donc pas utilisables pour les autres espèces (par exemple, les méthodes de sérotypage). De plus, ce sont des méthodes qui font parfois appel à des réactifs très onéreux et qui ne sont pas toujours disponibles (antisérums…) (Fitzgerald, Sails et al. 2005). En général, elles sont moins discriminantes, moins répétables et moins reproductibles que les méthodes de typage génétique.

## 3.4 Méthodes génotypiques utilisées pour le typage de campylobacter

Ces méthodes reposent sur une mesure des séquences génétiques. Cette mesure peut-être directe (ensemble des techniques utilisant le séquençage des nucléotides) ou indirecte (ensemble des techniques utilisant les séparations par électrophorèse). Les méthodes réalisant une mesure indirecte des séquences d'ADN peuvent porter sur l'ensemble du chromosome bactérien (par exemple l'électrophorèse en champ pulsé) ou sur quelques gènes ou des parties dispersées du chromosome bactérien (cas de toutes les techniques utilisant la PCR par exemple la PCR-RFLP, RAPD, AFLP[1])

[1] PCR-RFLP: polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism
RAPD: ramdom amplified polymorphism DNA
AFLP: amplified fragment length polymorphism

### 3.4.1 L'électrophorèse en champ pulsé (Pulse field gel electrophoresis PFGE)

#### 3.4.1.1 Principe

Cette technique repose sur une digestion de l'ensemble du chromosome bactérien par des enzymes de restriction sur des sites rares. L'électrophorèse en champs pulsés permet d'observer des fragments d'ADN dont la taille varie de quelques kilobases à plus de 10 000 kilobases. Les fragments d'ADN sont ensuite soumis à des champs électriques alternatifs dont l'orientation relative peut varier selon les systèmes de 90° à 180° (Tagu 1999).

#### 3.4.1.2 Avantages et inconvénients

L'électrophorèse en champ pulsé est une méthode dont le pouvoir discriminant est important parce que l'ensemble du génome est analysé. Cependant, le pouvoir discriminant est également lié aux enzymes de restriction qui sont utilisées. C'est une méthode coûteuse en temps, en travail et en équipement. De plus, un certain nombre de souches ne sont pas typables en raison de la production d' ADNase. L'absence de standardisation, en particulier pour les enzymes de restriction utilisées rend les comparaisons inter-laboratoires difficiles voire impossibles (Wassenaar and Newell 2000; Lukinmaa, Nakari et al. 2004). Cette technique de typage est cependant actuellement la plus utilisée pour campylobacter (Lukinmaa, Nakari et al. 2004).

### 3.4.2 Méthodes basées sur la technique de la PCR

Pour toutes ces techniques, seule une partie du chromosome bactérien est étudiée.

#### 3.4.2.1 Polymorphisme des longueurs de fragments de restriction du gène de la flagelline (PCR-RFLP Restriction fragment length polymorphism)

- Principe

Le principe repose sur l'amplification d'un ou plusieurs gènes sélectionnés et la comparaison de profils de coupures de ces gènes par des enzymes de restriction suite à l'existence d'un polymorphisme dans la séquence des gènes. Des mutations apparaissant sur une séquence d'ADN reconnue par une enzyme de restriction vont provoquer des longueurs de fragments de restriction différentes. Une région spécifique de l'ADN est amplifiée ce qui permet de visualiser les fragments de restriction de cette région présents en grande quantité après électrophorèse sur gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium. Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction observé est utilisé comme critère d'identification (Tagu, 1999).

Chez *C. jejuni*, le gène de la flagelline est porté par 2 loci *fla*A et *fla*B séparés par environ 170 nucléotides. Ces loci présentent des régions conservées et des régions très variables. Ce qui est intéressant, c'est que les régions conservées chez *C. jejuni* sont également présentes dans les autres espèces de campylobacter, ce qui rend cette méthode applicable à *C. coli* par exemple (Wassenaar and Newell 2000). Il a été montré une forte conservation entre les loci *fla*A et *fla*B au sein d'une même souche et l'utilisation des 2 gènes dans la méthode apporte un faible gain de discrimination (estimé à moins de 10%) (Wassenaar and Newell 2000).

Au moins 7 procédures de typage du gène de la flagelline sont décrites avec de fortes variations dans les protocoles de PCR, les enzymes de restriction utilisées et les conditions de migration des fragments obtenus (Wassenaar and Newell 2000).

- PCR- multiplex RFLP

D'autres gènes peuvent être utilisés combinés au typage du gène *fla*A, ils doivent présenter un important polymorphisme pour être retenus comme gènes candidats. C'est le cas avec les gènes *pfla*A/*gyr*A et le niveau de discrimination obtenu avec cette méthode est similaire à celui de l'électrophorèse en champ pulsé (Ragimbeau, Salvat et al. 1998). Il y a toutefois un inconvénient au typage du gène *gyr*A car il est impliqué dans la résistance aux antibiotiques (rôle démontré pour *C. jejuni* et *C. coli* avec la famille des fluoroquinolones) et une pression de sélection peut entraîner une sur-représentation de certains génotypes (Wassenaar and Newell 2000). Le gène *flg*E qui est un gène codant pour la protéine de crochet du flagelle, ou les gènes codant pour les protéines de surfaces sont très polymorphes et permettent d'augmenter le niveau de discrimination du seul typage du gène de la flagelline (Lüneberg, Glenn-Calvo et al. 1998; Knudsen, Bang et al. 2005). Par contre, les gènes très conservés comme les gènes codant pour la toxine de distension du cytosquelette *cdt*, certains facteurs de virulence ou encore le gène codant pour l'hippuricase *hyp*O ne sont pas utilisables car non discriminants (Wassenaar and Newell 2000).

- Avantages et inconvénients

Les génotypes fla sont stables au cours du stockage et au cours d'épidémies de courte durée (par exemple lors de l'infection d'un troupeau de poulets), mais des échanges de séquences de gènes *fla*A ont été mis en évidence dans les conditions naturelles. Cette méthode n'est donc pas à utiliser pour des études épidémiologiques globales sur un large territoire géographique ou sur une longue durée (Wassenaar and Newell 2000; Lukinmaa, Nakari et al. 2004). La majorité des auteurs s'accordent à reconnaître que le typage du gène *fla* reste un bon marqueur épidémiologique (Moller Nielsen, Engberg et al. 2000; Newell, Shreeve et al. 2001; Lukinmaa, Nakari et al. 2004). On ne peut pas savoir si une ou deux bandes de différences entre 2 profils *fla*A est due à une différence majeure ou mineure entre les deux gènes *fla*A. Il n'y a donc pas de sens à interpréter des similitudes entre les profils comme une forte relation entre les clones.

La PCR-RFLP est une méthode rapide et peu onéreuse, suffisamment discriminante pour des épidémies de courte durée. De plus, le nombre de souches non-typables est faible (Newell, Shreeve et al. 2001). Mais le manque de standardisation empêche la comparaison des résultats entre les laboratoires. La standardisation doit porter sur les amorces et les enzymes de restriction utilisées.

#### 3.4.2.2 Polymorphisme d'ADN par amplification aléatoire (Random amplified polymorphism DNA : RAPD)

Dans cette technique, l'ensemble du chromosome bactérien est analysé. Des amorces de petites tailles vont se fixer sur l'ADN cible au hasard et produire des produits d'amplification de différentes tailles. Après migration sur gel d'agarose, on obtient un profil de bandes que l'on peut comparer entre les différentes souches testées.

Les principaux inconvénients de cette méthode sont le nombre important de souches non-typables (liées à la production d'ADNase) et la faible reproductibilité. Ces inconvénients annulent les avantages d'une méthode rapide et de faible coût (Wassenaar, Geilhausen et al. 1998)

#### 3.4.2.3 Polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (Amplified fragment length polymorphism AFLP)

Le principe de cette technique repose sur l'amplification sélective de fragments de restriction générés à partir d'un échantillon d'ADN génomique. Les fragments sont générés par deux enzymes de restriction coupant respectivement au niveau d'un site rare et d'un site fréquent. Les produits de digestion sont ensuite amplifiés. Enfin, les fragments sont séparés par électrophorèse sur un gel dénaturé de polyacrylamide (Tagu 1999). L'avantage majeur de cette technique repose sur l'analyse aléatoire de l'ensemble du génome, mais c'est une technique complexe.

### 3.4.3 Le ribotypage

De nombreuses copies du gène de l'ARN ribosomique sont présentes sur le chromosome bactérien (ARN 5S, ARN 16S, ARN 23S).Des régions non-codantes ainsi que des régions très conservées sont présentes sur ce gène et cette stabilité en fait un bon candidat pour le typage (Wassenaar, Geilhausen et al. 1998). Après digestion de l'ADN génomique, une hybridation en Southern blot est réalisée avec des sondes spécifiques de gènes de l'ARNr. Cette méthode présente surtout un intérêt pour la détermination de l'espèce quand l'analyse phénotypique est difficile car le pouvoir discriminant est faible, ce qui est lié à la stabilité du gène étudié (Wassenaar and Newell 2000).

### 3.4.4 Séquençage nucléotidique

Le séquençage nucléotidique direct (avec ou sans amplification par PCR) devient de plus en plus automatisé et par conséquent devient une méthode alternative raisonnable pour le typage des campylobacter. Le séquençage portant sur le locus de la flagelline a été utilisé dans différentes études (Meinersmann, Helsel et al. 1997).
Cette technique est très reproductible. Les données obtenues sont complexes et le pouvoir de discrimination est extrêmement élevé ce qui rend l'interprétation des données hautement dépendante des paramètres et des logiciels utilisés pour la comparaison.

### 3.4.5 Technique de séquence des loci multiples (Multi locus sequence typing MLST)

Cette technique a été appliquée à campylobacter avec l'utilisation de 7 loci de gènes de ménage (housekeeping genes). Pour chaque isolat étudié, les 7 allèles sont séquencés. Le profil allélique obtenu se nomme « séquence type » ST. Les 7 loci choisis ne sont pas liés sur le chromosome bactérien. La diversité est suffisante pour obtenir une discrimination élevée. Cette technique a permis de confirmer que l'échange génétique horizontal a une influence majeure sur la structure et l'évolution des populations de campylobacter (Dingle, Colles et al. 2001; Dingle, Colles et al. 2002).

**Tableau 6. Comparaison, avantages et inconvénients des différentes méthodes de typage génétique (Wassenaar and Newell 2000; Foxman, Zhang et al. 2005)**

| | Pouvoir discriminant | % de souches typables | Reproductibilité | Répétabilité | Part de génome analysée | Temps nécessaire | Coût | Disponibilité |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ❑ Séquençage total du chromosome | Très élevé | 100 | Elevée | Elevée | Génome entier | De plusieurs mois à plusieurs années | Très élevé | Très limitée |
| ❑ Micro-puce à ADN | Très élevé | 100 | Moyenne à élevée | Moyenne à élevée | Gènes | | Très élevé | Limitée |
| ❑ Séquençage d'un ou plusieurs gènes | Moyen à très élevé (en fonction du (des) gène(s) choisi(s)) | 100 | Elevée | Elevée | Gène(s) | 2-3 jours | Elevé | Limitée |
| ❑ Typage par séquençage sur plusieurs loci (MLST) | Très élevé | 100 | Elevée | Elevée | Gènes | > 3 jours | Elevé | Limitée |
| ❑ Electrophorèse en champ pulsé (PFGE) | Elevé | ≈ 100 | Moyenne à élevée | Moyenne à élevée | Génome entier | 3-4 jours | Moyen | Bonne |
| ❑ Polymorphisme des longueurs de fragments de restriction (PCR-RFLP) | Moyen à élevé (multiplex) | 100 | Moyenne | Moyenne à élevée | Gène(s) | < 1 jour | Raisonnable | Bonne |
| ❑ Polymorphisme d'ADN par amplification aléatoire (RAPD) | Moyen | ≈ 80 | Faible | ND[1] | Parties dispersées du génome entier | < 1 jour | Faible | Bonne |
| ❑ Polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (AFLP) | Elevé | 100 | Moyenne à élevée | Elevée | Parties dispersées du génome entier | 3-4 jours | Moyen | Méthode complexe |
| ❑ Ribotypage | Faible | 100 | Elevée | Elevée | Gène(s) | 3-4 jours | Moyen | Méthode complexe |

[1] Non disponible

### 3.4.6 Puces à ADN

Le génome complet de la souche de *C. jejuni* NTCC 11168 a été séquencé en 2000 (Parkhill, Wren et al. 2000), ce qui a permis d'améliorer la compréhension de la biologie moléculaire de ce pathogène. Une puce à ADN contenant les 1654 gènes de la souche a été utilisée pour comparer des génomes complets de 11 souches différentes de *C. jejuni*. Mille trois cents gènes communs à toutes les souches et 354 gènes absents (ou très modifiés) dans les 11 autres souches ont été mis en évidence. Ces gènes ne sont donc probablement pas essentiels à campylobacter. L'analyse du génome complet doit permettre à terme d'identifier des gènes qui codent pour des facteurs à l'origine des différentes formes cliniques observées, des gènes responsables des séquelles post-infectieuses ou encore des gènes témoins de l'adaptation à certains hôtes (Fitzgerald, Sails et al. 2005).

## 3.5 Comparaison des méthodes de typage phénotypique et génétique

Ces méthodes peuvent être comparées sur des critères de sensibilité (c'est à dire de pouvoir discriminant), de reproductibilité, de répétabilité, de typabilité, de disponibilité, de facilité d'utilisation et de coût.

En général, les méthodes phénotypiques sont moins discriminantes que les méthodes génotypiques. Le pouvoir discriminant peut-être augmenté en combinant une méthode phénotypique avec une méthode génotypique ou deux méthodes génotypiques avec un pouvoir discriminant moyen. Les méthodes génotypiques utilisant une technique de séquençage sont plus discriminantes que les méthodes utilisant une technique de séparation par électrophorèse. Les méthodes reposant sur l'analyse de l'intégralité du génome (PFGE, RAPD) ont un fort pouvoir discriminant (Moller Nielsen, Engberg et al. 2000).

Le tableau 6 présente une comparaison des techniques de typage génotypique utilisées pour campylobacter ainsi que leurs avantages et inconvénients relatifs.

## 3.6 Perspectives des méthodes de typage de campylobacter

Il paraît nécessaire que les méthodes de typage soient standardisées et harmonisées, pour permettre les comparaisons entre laboratoires et valider la qualité des résultats obtenus. Ce travail est en cours avec CampyNet qui est un réseau de laboratoires dont l'objectif est de standardiser les principales méthodes de génotypage utilisées chez campylobacter. Un autre réseau CampyCheck a pour objectif d'améliorer les outils physiologiques, immunologiques et moléculaires utilisés pour la détection et l'identification des campylobacters. Pour pallier au manque de standardisation des techniques et pour accroître le pouvoir discriminant global de la méthode employée, l'utilisation de plusieurs techniques simultanément au cours d'une étude semble la meilleure approche (Wassenaar and Newell 2000).

La méthode de typage et son pouvoir discriminant doivent être adaptés aux objectifs fixés. Dans le cas idéal, elle doit avoir un pourcentage de souches non-typables le plus faible possible, être très reproductible et répétable, avoir un faible coût, être facile à réaliser (en terme de disponibilité des matières premières nécessaires et de travail) et les résultats obtenus doivent être faciles à interpréter (Lukinmaa, Nakari et al. 2004).

# 4 Infection des volailles et contamination des denrées alimentaires issues des volailles par campylobacter

## 4.1 Dans les élevages

### 4.1.1 Infection des lots de volailles par campylobacter

#### 4.1.1.1 Dose infectante chez le poulet

Chez le poulet, *C. jejuni* colonise la muqueuse des cellules épithéliales du cæcum et de l'intestin grêle, mais la bactérie peut-être isolée dans d'autres portions du tube digestif et même dans le foie et la rate. La dose la plus faible, rapportée dans la littérature, nécessaire pour contaminer un poulet est très faible (40 unités formant colonie UFC) (Newell and Fearnley 2003).

#### 4.1.1.2 Colonisation du tube digestif des volailles par les campylobacters

Cependant la dose nécessaire et la vitesse de colonisation des poulets dépendent à la fois de la souche de campylobacter et de la race de poulet considérées. Une fois le tube digestif colonisé, la population de campylobacter dans le contenu cæcal peut rapidement atteindre $10^9$ bactéries par gramme chez les poulets contaminés expérimentalement. Dans les conditions naturelles, la colonisation est un peu plus faible, mais les poulets excrètent de grandes quantités de campylobacter (plus de $10^6$ bactéries par gramme de fiente) (Newell and Fearnley 2003; Wagenaar, Mevius et al. 2006). Les poulets étant coprophages, l'excrétion faecale est probablement un facteur important de la dissémination des microorganismes dans les troupeaux de volailles. La transmission au sein d'un lot de volaille est extrêmement rapide et la majorité des oiseaux (jusqu'à 100%) sont colonisés en quelques jours. Au Royaume-Uni, les volailles de chair sont colonisées dans 81 à 90 % des cas par *C. jejuni*, le reste étant représenté par *C. coli* et parfois par *C. lari* (Newell and Fearnley 2003).

#### 4.1.1.3 Influence de l'âge

La colonisation naturelle par campylobacter dépend de l'âge des volailles. Les poussins ne sont pas porteurs et en Europe, les poulets restent négatifs pour campylobacter jusqu'à l'âge de 10 jours et la plupart des lots ne deviennent positifs qu'à l'âge de 2 à 3 semaines.(Jacobs-Reitsma, van de Giessen et al. 1995). Les campylobacters n'entraînent pas de symptôme chez les volailles, et la colonisation persiste pendant toute la vie de la bande. Au fil du temps, le niveau d'excrétion diminue suggérant un rôle de l'immunité, cependant la durée de vie courte des poulets et des dindes ne permet au mieux qu'une réduction de 1 facteur 10 de l'excrétion (Wagenaar, Mevius et al. 2006). Chez les volailles expérimentalement infectées, des anticorps dirigés contre des antigènes de *C. jejuni* sont mis en évidence, l'efficacité de ces anticorps pour empêcher l'infection n'est pas connue. Cependant, chez les poules pondeuses âgées, les anticorps peuvent être détectés sans colonisation du tube digestif, ce qui suggère que la réponse anticorps puisse être associée à l'élimination de l'infection. La raison pour laquelle les poulets ne sont pas contaminés avant l'âge de 10 jours n'est pas connue, les raisons invoquées sont l'immaturité du tube digestif, la composition de l'alimentation ou encore la présence d'anticorps maternels. La compréhension et la nature de cette phase réfractaire à l'infection par

campylobacter permettraient peut-être de rendre les poulets insensibles à la colonisation par *C. jejuni* (Newell and Fearnley 2003).

#### 4.1.1.4 Saisonnalité

Des variations saisonnières de la prévalence de contamination des lots de volailles par campylobacter ont été mises en évidence, avec un taux d'infection plus élevé l'été que l'hiver (DANMAP 2000; Refregier-Petton, Rose et al. 2001). Les variations observées chez l'homme coïncident ou précèdent les pics saisonniers chez la volaille.

#### 4.1.1.5 Paramètres zootechniques

Il a également été démontré que la prévalence des lots positifs dépendait de la taille des lots (Berndtson, Danielsson-Tham et al. 1996) et du type de production (Heuer, Pedersen et al. 2001). Les lots de volailles élevés selon le cahier des charges « agriculture biologique » ou sur des parcours extérieurs ont des prévalences de contamination par campylobacter plus élevées que les lots de volailles élevés en hors-sol. Cette observation peut-être reliée à l'exposition environnementale ainsi qu'à l'âge des oiseaux.

#### 4.1.1.6 Nombre de souches de campylobacter isolées des lots de volailles

En fonction des études, les lots de volailles ont été trouvés infectés par un nombre limité ou au contraire par plusieurs souches différentes de *C. jejuni* ou *C. coli*. Des études réalisées au Royaume-Uni, en Suisse et aux Pays-Bas ont montré que les lots de volailles standard n'étaient colonisés que par un nombre limité (un ou deux) de sous-type de campylobacter (Jacobs-Reitsma, van de Giessen et al. 1995; Ayling, Woodward et al. 1996; Bull, Allen et al. 2006). La situation semble différente aux Etat-Unis où plusieurs souches de campylobacter ont été isolées par lot de volailles (Hiett, Stern et al. 2002).

### 4.1.2 Prévalence de la contamination des élevages

La proportion de lots de poulets contaminés par campylobacter varie entre les pays, ce qui peut être lié à des différences dans les méthodes d'échantillonnage et d'isolement. En Europe, la prévalence varie de 18 à plus de 90%. Les pays du Nord de l'Europe ont des prévalences plus faibles que les pays du sud. Les raisons des ces écarts ne sont pas connues, mais les paramètres zootechniques et les conditions climatiques peuvent être, au moins en partie, responsable de ces écarts.
En France, le plan de surveillance réalisé en 2004 chez le poulet a mis en évidence une prévalence de 85 % (121 prélèvements positifs sur 142 réalisés). La proportion de souches de *C. jejuni* isolée des prélèvements de caeca par isolement direct est de 30% et 70% pour les *C. coli* (Hellard and Kempf 2005).

#### 4.1.2.1 Transmission horizontale

- La présence résiduelle de campylobacters du lot précédent dans l'élevage peut-être une source de transmission. Cependant, dans les aliments et la litière, les conditions sèches sont considérées létales pour campylobacter. De plus, en Europe, la litière est changée entre les lots. Il a été mis en

évidence dans une étude réalisée au Royaume-Uni que seuls 15% des lots dans 100 élevages différents montraient une similitude génétique avec les campylobacters isolés des lots précédents dans l'élevage (Shreeve, Toszeghy et al. 2002). Il a également été montré que le statut d'un lot pour campylobacter ne dépendait pas du statut du lot précédemment élevé dans le même bâtiment (Evans and Sayers 2000).

- Les campylobacters peuvent être mis en évidence dans l'air des élevages et dans les flux d'air entrant dans les élevages. La transmission aérienne peut donc avoir un rôle dans la dissémination des campylobacters (Bull, Allen et al. 2006).
- Les campylobacters peuvent être amenés par l'eau de boisson. La survie de campylobacter dans l'eau a été démontrée (Pearson, Greenwood et al. 1993) ; La transmission entre les volailles peut également se faire par le système de distribution de l'eau.
- Les campylobacters peuvent pénétrer dans l'élevage par la faune sauvage (oiseaux, rongeurs), les autres animaux domestiques et les insectes. Des campylobacters ont pu être isolés de rongeurs (Hiett, Stern et al. 2002) et les mouches sont identifiés comme un facteur de risque pour campylobacter (Hald, Skovgard et al. 2004). Les autres animaux de rente ou domestiques de l'élevage peuvent être porteurs de campylobacter. Dans ce cas, leur présence augmente la charge environnementale en campylobacters de l'élevage et par conséquent le risque d'entrée des campylobacters par un vecteur non animé (bottes de l'éleveur, machines).
- Les campylobacters sont ubiquitaires et présents dans le sol autour des élevages (Rivoal, Ragimbeau et al. 2005). L'ensemble des activités humaines liées à l'élevage des animaux peut donc être responsable de l'entrée des campylobacters dans l'élevage : passages de l'éleveur, des techniciens, des vétérinaires qui font entrer les campylobacters par leurs bottes, leurs vêtements ou le matériel utilisé.
- Pour des raisons économiques, les bâtiments d'élevage sont remplis au maximum de leur capacité. Le détassage est une pratique qui consiste à retirer une partie des poulets ou des dindes avant la fin de la période d'élevage de l'ensemble de la bande et de les faire abattre 1 ou 2 semaines avant le reste. Ce détassage permet d'augmenter la production tout en respectant la réglementation sur le bien-être animal qui repose sur un chargement au poids de volaille par mètre carré dans le bâtiment. En général, cette pratique est considérée comme un facteur de risque pour l'introduction de campylobacter parce qu'il y a alors une rupture des barrières d'hygiène pendant l'enlèvement des animaux (Wagenaar, Mevius et al. 2006; Humphrey, O'Brien et al. 2007) .

### 4.1.3 Mesures de contrôle des campylobacters en élevages

#### 4.1.3.1 Mesures de biosécurité

Les mesures d'hygiène classiques (nettoyage et désinfection des bâtiments d'élevage entre 2 lots, mise en place de pédiluves, de sas…) peuvent empêcher ou au moins limiter l'entrée des campylobacters ; Les campylobacters étant ubiquitaires dans l'environnement, ces mesures ne peuvent s'appliquer qu'aux élevages hors-sol. Pour ces animaux, il est possible de conserver les lots négatifs pour campylobacter en appliquant, des mesures de biosécurité drastiques. Dans les pays

scandinaves (Norvège et Suède) où ces mesures sont appliquées, la prévalence de campylobacter est de 7% (Humphrey, O'Brien et al. 2007).

#### 4.1.3.2 Mesures de contrôle additionnelles

- Utilisation des flores de barrière

L'administration d'un cocktail de flore bactérienne digestive non pathogène aux poussins s'est avérée efficace pour lutter contre la contamination par les salmonelles. Mais les flores de barrière s'avèrent pour l'instant beaucoup moins efficaces pour lutter contre campylobacter (Schneitz 2005).

- Vaccination des poulets contre campylobacter et rôle des anticorps maternels

La mise au point de ce vaccin nécessiterait l'identification des gènes de campylobacter qui sont importants dans la colonisation du tube digestif des volailles. Pour l'instant, la réponse immunitaire des volailles n'est pas comprise. De plus, des problèmes sont posés par la variabilité antigénique des souches de campylobacter, la méconnaissance des antigènes induisant une réponse protectrice et le fait que ce vaccin doit protéger les animaux très jeunes (Wagenaar, Mevius et al. 2006; Humphrey, O'Brien et al. 2007).

- Utilisation de bactériophages

Des bactériophages, virus naturellement présents dans le tube digestif des poulets, peuvent être utilisés. L'utilisation de préparation de phages peut faire disparaître la plupart des *C. jejuni* du tube digestif des volailles dans les jours qui suivent le traitement. On pourrait donc envisager de traiter les lots positifs quelques jours avant leur départ pour l'abattoir. Cependant, il existe un risque de sélection des souches de campylobacter résistantes à ces phages. D'un point de vue social se pose le problème des consommateurs qui pourraient s'avérer réticents à consommer des poulets traités avec des virus (en dehors de toute considération scientifique) (Wagenaar, Mevius et al. 2006; Humphrey, O'Brien et al. 2007).

- Résistance génétique des volailles

Des différences de sensibilité de lignées de volailles à la colonisation par campylobacter ont été suspectées, mais les données sont limitées (Wagenaar, Mevius et al. 2006).

## 4.2 Contamination des volailles pendant le transport

### 4.2.1 Etude de la contamination des lots de volailles par des souches de campylobacter présentes initialement dans les caisses de transport

Les volailles sont transportées de l'élevage à l'abattoir dans des caisses de transport. Ces caisses peuvent être en métal ou en plastique. Le sol des caisses peut être plein mais le plus souvent il est grillagé. Différentes études ont mis en évidence que les caisses de transport utilisées pour les volailles entre l'élevage et l'abattoir étaient très souvent contaminées par des souches de campylobacter (Berndtson, Danielsson-Tham et al. 1996; Newell, Shreeve et al. 2001; Corry, Allen et al. 2002; Slader, Domingue et al. 2002; Berrang, Northcutt et al. 2003; Hansson, Ederoth et al. 2005). Ces mêmes études ont également démontré que des lots de volailles initialement négatifs pour campylobacter pouvaient devenir positifs après l'abattage, et que les souches retrouvées sur les carcasses avaient été isolées dans les caisses de transport. Cependant, il semblerait qu'il ne s'agisse

pas d'une colonisation intestinale des volailles, mais d'une contamination extérieure du plumage (Rasschaert, Houf et al. 2007).

#### 4.2.2 Mesure de contrôle des campylobacters pendant le transport à l'abattoir

##### 4.2.2.1 Mise à jeun des animaux

La mise à jeun des oiseaux 8 à 12 heures avant le transport diminue le contenu intestinal. Cette mesure permet de réduire la contamination extérieure du plumage par des campylobacters pendant le transport. Cependant, la mise à jeun et le transport sont des stress pour les volailles qui peuvent entraîner une augmentation de l'excrétion fécale en campylobacter. Parallèlement, il a également été montré que l'augmentation du nombre de campylobacters dans le tube digestif des volailles n'induisait pas forcément une augmentation de la contamination des carcasses à la fin des opérations d'abattage (Corry and Atabay 2001).

##### 4.2.2.2 Nettoyage et désinfection des caisses de transport

En théorie, les caisses utilisées pour transporter les volailles de l'élevage à l'abattoir sont nettoyées et désinfectées entre chaque utilisation. Après l'accrochage des oiseaux sur la chaîne d'abattage, les caisses sont acheminées dans des tunnels de nettoyage et passent dans des bacs successifs remplis d'eau et de produits nettoyant et désinfectant. Certaines installations de nettoyage retournent les caisses, ce qui permet d'éliminer les plumes et les salissures (voire des pattes d'oiseaux). En raison de leur structure grillagée, il est très difficile de les nettoyer correctement et des fientes, des plumes ou de la terre sont souvent retrouvées après le nettoyage et la désinfection. Les caisses ne sont pas séchées et sont replacées sur les camions (également nettoyés) pour une utilisation ultérieure. En raison de la difficulté pour nettoyer les caisses, les produits désinfectants ne sont pas appliqués sur des surfaces propres et des études ont montré que le nettoyage et la désinfection des caisses de transport n'avaient que peu ou pas d'effet sur la présence de campylobacter dans ces caisses (Newell, Shreeve et al. 2001; Hansson, Ederoth et al. 2005).

### 4.3 Contamination des carcasses pendant les procédés d'abattage

#### 4.3.1 Description du procédé d'abattage des volailles (Lehuraux 1997)

- Accrochage

L'arrivée des animaux dans les caisses de transport est plus ou moins automatisée. L'accrochage est réalisé manuellement. Les oiseaux sont accrochés par les pattes dans des étriers en métal, la tête en bas.

- Electronarcose et saignée

L'anesthésie est réalisée par électronarcose. La tête des oiseaux est plongée dans un bac parcouru par un courant électrique. La saignée est automatisée et un opérateur peut intervenir manuellement si nécessaire.

- Echaudage

Cette opération a pour but de faciliter la plumaison. Les volailles après avoir été saignées sont plongées dans le bac d'échaudage dans lequel la température de l'eau varie entre 50 et 60°C, en fonction de l'espèce de volaille et de la destination ultérieure des carcasses. Le plus souvent, la température du bac d'échaudage se situe entre 50 et 53°C. Dans certains cas, une température plus élevée (58 à 60°C) peut-être utilisée lorsque les carcasses sont destinées à être vendues congelées et l'apparence de la peau a moins d'importance. Il a été démontré que les campylobacters peuvent survivre dans l'eau d'échaudage jusqu'à une température de 53°C (Corry and Atabay 2001).

- Plumaison

Le principe des plumeuses est la rotation de doigts en caoutchouc venant frapper la carcasse et arracher les plumes. Une succession de plumeuses d'action de plus en plus douce permet d'obtenir une carcasse nette et non déchirée. Pendant la plumaison, les carcasses sont aspergées d'eau pour faciliter et améliorer l'action des doigts des plumeuses.

- Finition

L'enlèvement de la tête se fait mécaniquement par élongation, ce qui permet l'enlèvement d'une partie des viscères antérieurs (trachée, œsophage). Les pattes sont sectionnées automatiquement au niveau des tarses.

- Eviscération

A la différence des autres espèces animales de rente, les volailles sont éviscérées sans ouvrir entièrement la carcasse et la peau n'est en général pas retirée. L'éviscération consiste en une ouverture abdominale de la carcasse suivie de l'extraction manuelle ou mécanique des viscères. Lorsque l'éviscération est automatisée, différentes machines se succèdent : décloaqueuse, éviscéreuse (ouverture de la cavité abdominale et recueil de la grappe intestinale), époumoneuse…Ensuite, les carcasses sont calibrées puis elles peuvent être placées sur des chariots à épinettes ou suspendues sur une nouvelle chaîne et amenées dans le local de ressuage.

De l'eau, contenant parfois de fortes concentrations de chlore (en fonction des législations en vigueur dans les pays) peut être utilisée pour rincer les équipements et les carcasses, à des intervalles fréquents sur la ligne d'abattage.

- Ressuage

Le ressuage est l'étape de refroidissement des carcasses. La température des carcasses doit être amenée à 4°C le plus rapidement possible ( Règlement européen n°853/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale).

Différents types de ressuage peuvent être rencontrés en abattoir de volailles :

- Statique : les carcasses sont placées dans une chambre froide
- Dynamique : les carcasses sont placées dans une chambre froide dans laquelle de gros ventilateurs soufflent de l'air froid
- Par spin-chiller : les carcasses sont plongées dans un courant d'eau froide. Dans ce cas, le plus souvent les carcasses sont ensuite surgelées.

### 4.3.2 Contamination des carcasses pendant l'abattage et l'éviscération

#### 4.3.2.1 Origine de la contamination des carcasses

La contamination de la viande de volaille est surtout superficielle, et comme la peau n'est pas retirée, de nombreux microorganismes sont retrouvés sur ou dans la peau. Les campylobacters présents sur la peau proviennent soit directement du contenu intestinal soit indirectement de l'équipement de l'abattoir. Les lots initialement négatifs pour campylobacter deviennent fortement positifs lorsqu'ils sont abattus après des lots positifs, et la proportion de carcasses positives augmente pendant l'abattage (Rivoal, Denis et al. 1999). La nature des procédés d'abattage des volailles rend impossible la prévention d'une contamination croisée des lots négatifs par les lots positifs.

#### 4.3.2.2 Principaux sites de contamination croisée des volailles pendant les procédés d'abattage

Quand des lots de volailles contaminés par campylobacter sont abattus, un nombre élevé de campylobacters peuvent être retrouvés à toutes les étapes de l'abattage, ainsi que sur les machines et dans l'eau d'échaudage quand la température est inférieure à 53°C (Corry and Atabay 2001; Newell, Shreeve et al. 2001). Les zones hautement contaminées en abattoir de volailles sont le bac d'échaudage, les plumeuses et les machines de l'éviscération.

- Dans le bac d'échaudage

En raison des conditions de transport des volailles, leur plumage est fréquemment souillé par des fientes. Après la saignée, les volailles sont trempées dans un bac d'échaudage. Les souillures présentes à la surface des volailles se retrouvent dans l'eau d'échaudage et peuvent se redéposer sur les carcasses suivantes.

- Dans les plumeuses

Dans les plumeuses, les doigts en caoutchouc peuvent être salis par la contamination extérieure des volailles sortant du bac d'échaudage. De plus, lors de la plumaison, les doigts des plumeuses compriment la cavité intestinale et peuvent entraîner l'expulsion des matières fécales. Les doigts des plumeuses sont en caoutchouc et au fil de leur utilisation, ils s'abîment et présentent de nombreux interstices dans lesquelles les campylobacters pénètrent. Ces campylobacters et les autres bactéries provenant des matières fécales des oiseaux sont déposées sur les carcasses plumées (Berrang, Buhr et al. 2001).

- Pendant l'éviscération

Au moment du retrait de la masse intestinale, les viscères peuvent se rompre. Ils contaminent alors l'intérieur et/ou l'extérieur de la carcasse, mais également la machine sur laquelle ils se sont rompus. Les carcasses contaminées vont ensuite « déposer » les campylobacters à la surface des machines successives. Les carcasses traitées ensuite seront en contact avec les souillures laissées par la carcasse précédente (Rivoal, Denis et al. 1999).

#### 4.3.2.3 Contamination de la peau des volailles par les campylobacters pendant l'abattage

Pendant la phase d'échaudage ou au cours des différents rinçages, la peau des volailles absorbe l'eau. Les campylobacters (initialement présents ou apportés par les fientes, le contenu intestinal ou les différentes machines) adhèrent à la peau d'abord par des mécanismes physico-chimiques puis par

des liaisons plus permanentes entraînant la formation d'un biofilm difficile à retirer si le rinçage de la peau n'est pas réalisé immédiatement après la contamination. En particulier, les micro-organismes seront retenus dans la fine couche d'eau présente à la surface de la carcasse après l'échaudage. Le rinçage des carcasses permet de retirer une partie de la contamination, mais la peau se gorge d'eau et les campylobacters (et les autres bactéries) sont retenus dans les plis et les brèches de la peau, en particulier les follicules plumeux (Corry and Atabay 2001).
En raison des modalités de l 'abattage des volailles, la contamination croisée entre les lots est inévitable ce qui conduit à un nombre de carcasses contaminées en fin de chaîne important (jusqu'à 100%) et à des niveaux de contamination très élevés (de l'ordre de $10^2$ à $10^4$ UFC/g de peau).

### 4.3.3 Mesures de contrôle des campylobacters dans les abattoirs de volailles

En présence d'un risque de contamination par les campylobacters aussi élevé, il est difficile de prévenir les contaminations croisées ou de diminuer l'importance de la contamination sur le produit final des lots infectés. Deux stratégies permettent de diminuer la contamination des produits de volailles, soit en produisant des lots de volailles initialement indemnes de campylobacter soit en mettant en place une décontamination du produit final par des moyens physiques ou chimiques.

#### 4.3.3.1 Nettoyage et désinfection en abattoir de volailles

- Principaux composés désinfectants utilisés en abattoir de volailles

En France, il n'existe pas de données qualitatives ou quantitatives disponibles concernant la production et l'utilisation des désinfectants en industrie agroalimentaire. Une étude réalisée en industrie agroalimentaire au Royaume-Uni portant sur 40 sites de production et l'analyse de 77 questionnaires adressés à des élevages, des ateliers de découpe, des transporteurs et des revendeurs montre que les composés d'ammoniums quaternaires sont les désinfectants les plus utilisés (Holah, Taylor et al. 2002). Ce choix s'explique par la bonne efficacité de ces molécules en tant que désinfectant, mais également par leur non-toxicité et leur faible action corrosive. Les produits chlorés sont également largement utilisés et en particulier, l'hypochlorite de sodium.
En France, pour être commercialisés, tous les produits désinfectants utilisés en IAA doivent avoir obtenu une AMM (autorisation de mise sur le marché) qui est délivrée par le ministère de l'agriculture. La liste des produits autorisés en France est disponible sur le site e-phy du ministère de l'agriculture : http://e-phy.agriculture.gouv.fr/ (consulté le 26 juin 2007). L'analyse de cette base de données montre que les composés d'ammoniums quaternaires sont présents dans près de la moitié des formulations de désinfectants autorisés et les produits chlorés dans près d'un quart. Malgré l'absence de données quantitatives de production et d'utilisation de ces molécules, nous pouvons néanmoins supposer que ces molécules sont très largement utilisées dans les industries agroalimentaires et donc dans les abattoirs de volailles.

- Réalisation du nettoyage et de la désinfection en abattoir de volailles (Lehuraux 1997)

Le nettoyage et la désinfection des locaux et du matériel sont réalisés quotidiennement dans les abattoirs de volailles, à la fin de la journée de travail. Le nettoyage et la désinfection peuvent être réalisés par du personnel de l'abattoir ou sous-traité à une société extérieure à l'abattoir.

- Nettoyage

La première étape est un nettoyage mécanique qui vise à éliminer les déchets visibles. Ce nettoyage peut consister en un raclage, un grattage ou un brossage. La force mécanique de l'eau sous pression peut également être utilisée. L'eau chaude (50°C) est utilisée sauf pour le poste de saignée qui exige une eau froide ou tiède. La pression est variable (4-5 à 20-30 bars) suivant l'équipement disponible et l'état des surfaces à traiter. Cette phase de nettoyage peut être réalisée plusieurs fois au cours de la journée de travail, elle consiste essentiellement en un raclage des sols et un rinçage des surfaces et elle est réalisée par les différents agents de l'abattoir.

L'opération de nettoyage permet d'éliminer les déchets faiblement accrochés aux surfaces et de réhydrater les souillures sèches. La graisse résiste aux actions mécaniques du nettoyage à l'eau. Pour retirer la graisse déposée sur les machines et les surfaces, un détergent est appliqué avec un canon à mousse. Périodiquement, afin de combattre les souillures minérales, une action complémentaire chimique acide est réalisée pour détartrer le matériel.

- Rinçage

Le rinçage consiste en une dissolution à l'eau claire de la solution de nettoyage. Il est réalisé à haute pression (60 bars) et à une température de 50 à 60°C. La pression utilisée est d'autant plus forte qu'il reste des souillures visibles. La propreté est visuelle mais également tactile (élimination des graisses et du sang).

Le nettoyage est une étape indispensable avant la désinfection. L'efficacité des désinfectants est liée entre autres à la présence de matières organiques. De plus, la présence persistante de matière organique masque et protège les micro-organismes de l'action du désinfectant.

- Désinfection

Industriellement et économiquement, il est impossible d'obtenir des surfaces stériles, l'objectif est donc de réduire le nombre de micro-organismes présents dans l'environnement jusqu 'à l'obtention d'un niveau ne risquant pas de compromettre la sécurité ou la salubrité des aliments (AFNOR 1999).

Dans les abattoirs de volailles, le plus souvent, la solution désinfectante est pulvérisée sous forme de mousse sur les surfaces à traiter. La mousse permet un meilleur traitement des surfaces verticales et une bonne visualisation des surfaces traitées. Les produits sont laissés en contact en fonction des indications du fabricant (de 15 à 30 minutes en général).

- Rinçage final

Le rinçage final doit achever les opérations de nettoyage et de désinfection. En premier lieu, il élimine les complexes bactéries/désinfectant présents sur le matériel, les murs et les sols. Il permet ensuite d'éviter la persistance de substances actives ou de résidus sur les surfaces traitées, en particulier si le temps de contact a été long. Le rinçage doit se terminer par une vidange des équipements et le drainage des sols afin qu'ils ne restent pas humides et ne soient pas favorables à la survie ou à la croissance des micro-organismes.

➢ Survie des campylobacters aux opérations de nettoyage et de désinfection dans les abattoirs.

Les quelques études réalisées sur campylobacter semblent montrer une grande sensibilité de ce micro-organisme aux désinfectants (Wang, Powers et al. 1983; Blaser, Smith et al. 1986; Trachoo and Frank 2002; Avrain, Allain et al. 2003). La recherche de ce germe dans les industries agroalimentaires

après nettoyage et désinfection s'est toujours, à notre connaissance, révélée infructueuse (Miwa, Takegahara et al. 2003; Borck and Pedersen 2005; Cools, Uyttendaele et al. 2005; Malakauskas, Jorgensen et al. 2006). Les conclusions de ces études conduisent à penser que les campylobacters sont globalement sensibles à l'action du nettoyage et de la désinfection dans les abattoirs de volailles. Le nettoyage et la désinfection permettent de réduire (voire d'éliminer) les campylobacters présents sur les machines et sur les surfaces après l'abattage des lots. Cependant, la désinfection n'est pas réalisée entre chaque lot. En abattoir de volailles, la contrainte la plus importante est le nombre d'animaux abattus à l'heure (de 2000 à 10 000 en fonction des abattoirs et du type de volaille), et le nettoyage et la désinfection des machines entre chaque carcasse ne sont pas envisageables (Wagenaar, Mevius et al. 2006). L'opération de désinfection permet en théorie d'empêcher le passage des campylobacters de lots de volailles abattus la veille sur les lots de volailles suivants, mais ne permet pas de réduire les contaminations croisées entre les lots abattus le même jour.

#### 4.3.3.2 Ordre d'abattage des lots

En raison des modalités de l 'abattage des volailles, la contamination croisée entre les lots est inévitable. Il a été démontré que les carcasses des lots initialement négatifs pour campylobacter étaient rapidement contaminés lorsqu'ils étaient abattus après des lots positifs (Rivoal, Denis et al. 1999; Newell, Shreeve et al. 2001; Stern and Robach 2003; Lindblad, Hansson et al. 2006). Dans une autre étude, le suivi des lots initialement négatifs et abattus après nettoyage et désinfection de l'abattoir a montré que ces lots restaient négatifs (Miwa, Takegahara et al. 2003). Une approche consiste donc à distinguer les lots positifs des lots négatifs et de réaliser une décontamination de la viande des lots positifs. Théoriquement, cette approche devrait fonctionner, mais en pratique, il est très compliqué de distinguer les lots positifs des lots négatifs. La connaissance du statut du lot vis à vis de campylobacter au moment où celui-ci quitte la ferme permet d'envoyer les lots positifs dans des abattoirs pour « lots positifs », et les lots négatifs dans des abattoirs pour « lots négatifs » seulement. S'il n'y a qu'un seul abattoir disponible, alors les lots négatifs sont abattus en premier, suivi par les lots positifs. Un lot négatif faussement classé positif aura peu de conséquences en dehors de conséquences économiques. Par contre, un lot positif faussement classé négatif sera considéré comme « sain » pendant tout l'abattage, pourra contaminer des lots réellement négatifs et sera vendu sans qu'il n'ait été appliqué de traitement pour réduire la contamination en campylobacter. Le problème principal est lié à la méthode de détection des campylobacters qui nécessite plusieurs jours (pour la méthode traditionnelle) et dont les faux négatifs sont fréquents. Dans cette approche, la fiabilité des résultats négatifs est cruciale sachant qu'elle dépend également de la durée entre le moment du test et celui de l'abattage des animaux (Wagenaar, Mevius et al. 2006).

#### 4.3.3.3 Diminution de la contamination des carcasses par campylobacter pendant l'abattage

- Une méthode intéressante est en cours de développement. Un équipement spécial sur la chaîne d'abattage presse l'abdomen des volailles, ce qui entraîne l'expulsion d'une petite quantité de fientes en dehors du cloaque, qui est immédiatement rincée à l'aide d'un jet d'eau. L'objectif est

de limiter l'excrétion des fientes pendant l'échaudage et la plumaison (Wagenaar, Mevius et al. 2006)

- L'utilisation d'une température d'échaudage élevée (> 53°C) diminue le nombre de campylobacter présents sur la peau immédiatement après, mais les étapes suivantes libèrent des campylobacters de l'intestin qui recontaminent l'extérieur de la carcasse. De plus, la peau est abîmée par la température d'échaudage et les tissus sous-jacents sont exposés à une contamination encore plus forte (Corry and Atabay 2001).

#### 4.3.3.4 Influence du ressuage

Les campylobacters sont très sensibles à la dessiccation. Le ressuage à l'air libre (statique ou dynamique) entraîne une diminution significative de la contamination de la surface des carcasses par les campylobacters (Alter, Gaull et al. 2005).

#### 4.3.3.5 Méthodes de décontamination du produit final

La décontamination de la viande de volaille est plus difficile que pour les autres espèces animales de rente à cause de la peau qui est en général conservée sur le produit final. Pendant la phase de découpe des produits de volaille, le retrait de la peau diminue le nombre de campylobacters (Uyttendaele, De Troy et al. 1999). Lorsque la peau est présente, le nombre de campylobacters présents par gramme de peau varie en fonction des études, mais il est très important, entre $10^2$ et $10^4$ CFU/g (Federighi 1999).

- Méthodes chimiques de décontamination

Les traitements appliqués sur la viande de volailles doivent répondre aux critères suivants:

- Insertion facile dans les chaînes de fabrication existantes,
- Economique pour l'abattoir en terme de place et de coût
- Efficaces sur les microorganismes pathogènes visés et en particulier sur campylobacter
- Ne pas avoir de répercussion sur la santé du consommateur et sur les qualités organoleptiques du produit

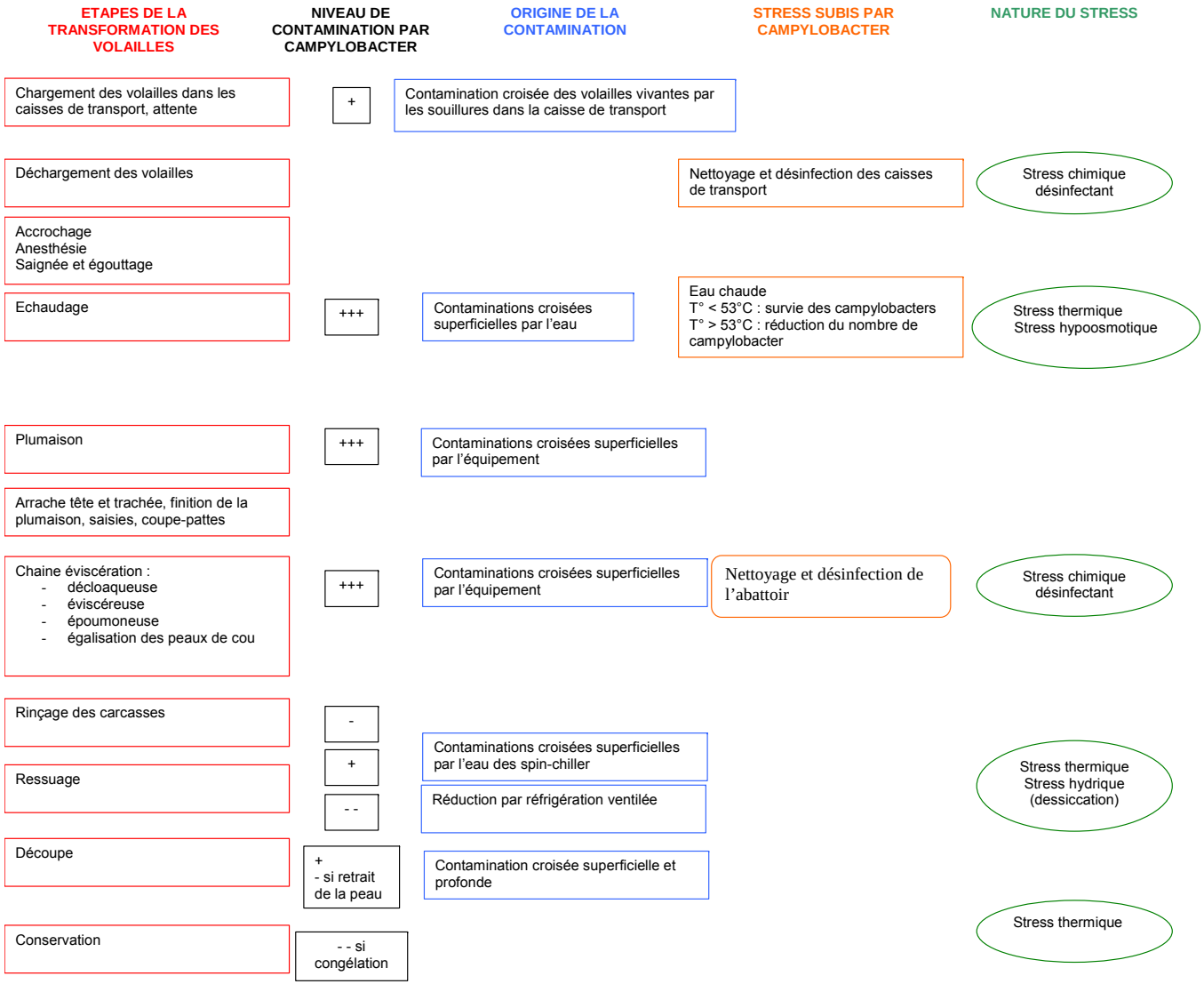
En France, jusqu'à aujourd'hui, la réglementation française (et européenne) n'autorise pas le trempage des carcasses en fin de chaîne d'abattage dans des solutions contenant des molécules désinfectantes. Mais cette technique est déjà utilisée dans d'autres pays comme les Etats-Unis (Zhao and Doyle 2006). En Europe, un projet de règlement prévoit l'autorisation de l'utilisation de 4 molécules pour la décontamination des carcasses en fin de chaîne : le dioxyde de chlore, le chlorure de sodium acidifié, le phosphate trisodique et les peroxyacides (Anonymous 2007).

Ces quatre molécules ont montré une efficacité pour diminuer la charge des carcasses en campylobacter d'au moins un facteur 10 à 100, en fonction des conditions d'utilisation et d'étude (Corry and Atabay 2001; Zhao and Doyle 2006).

- Méthodes physiques
  - Irradiation

Les campylobacters sont plus sensibles aux radiations gamma que la plupart des bactéries à gram négatif (dont les salmonelles et les *Escherichia coli*) (Patterson 1995). L'intensité des radiations est de

**Figure 5. Sites et niveaux de contamination des carcasses à l'abattoir et stress subis par les campylobacters d'après Dromigny (2007)**



0,12 à 0,32 kGy sur de la viande ressuée, et doit être augmentée sur de la viande congelée. Cette méthode est très efficace et en particulier contre les micro-organismes présents dans la peau de la volaille. Elle peut être utilisée en fin de chaîne, sur des carcasses entières ou découpées, fraîches ou congelées. Cependant, cette méthode coûte très cher et elle est difficilement acceptée par les consommateurs (Corry and Atabay 2001).

- Congélation

La congélation est utilisée dans de nombreux pays nordiques (Norvège, Suède, Islande). Les carcasses ou les produits de découpe des carcasses issues de lots de volailles positifs pour campylobacter sont congelés pendant plusieurs semaines. Le nombre de campylobacters peut-être réduit d'un facteur 10 à 100. Les coûts sont élevés, mais cette méthode réduit considérablement la charge des campylobacters sur le produit final et donc le risque pour le consommateur (Wagenaar, Mevius et al. 2006).

- Utilisation des ultra-violets (UV)

Les campylobacters sont sensibles aux ultra-violets (Obiri-Danso, Paul et al. 2001), mais cette méthode est difficilement utilisable sur les carcasses car il est difficile de faire pénétrer les rayons UV dans la peau des volailles (Corry and Atabay 2001).

## 4.4 Mécanismes de survie des campylobacters pendant les étapes d'abattage et dans les aliments

La figure 5 présente les sites de contaminations des carcasses à l'abattoir et les différents stress. En raison de leur cycle épidémiologique, les campylobacters doivent survivre entre les hôtes animaux et l'homme. Dans l'environnement, ils sont exposés à l'oxygène de l'air, à des températures inférieures à leur température minimale de croissance ou à des températures élevées, à la dessiccation, aux rayons UV et à d'autres facteurs de stress. A la différence des autres pathogènes alimentaires, les campylobacters sont incapables de croître en présence d'air, de se multiplier en dehors de leurs hôtes et sont très sensibles à de nombreuses conditions environnementales (Park 2002). Malgré ces contraintes, les campylobacters survivent de la volaille jusqu'à l'assiette du consommateur et sont aujourd'hui considérés comme la première cause bactérienne d'infection d'origine alimentaire chez l'homme.

### 4.4.1 Les formes viables non cultivables (VNC)

#### 4.4.1.1 Définition

Au laboratoire, les formes viables non cultivables sont obtenues en microcosmes aqueux (privation nutritionelle). Ce sont les cellules, au sein d'une suspension bactérienne, qui conservent une activité métabolique (ou respiratoire) résiduelle mais qui sont :

- Incapables de se reproduire dans ou sur un milieu normalement adapté à leur culture ;
- Non revivifiables par les techniques classiques de revivification ;

dans les conditions normalement considérées comme optimales et pendant le temps de l'expérimentation (Federighi 1999).

#### 4.4.1.2 Rôle des formes VNC dans la survie des campylobacters

La première description de forme VNC pour campylobacter a été rapportée en 1986 (Rollins and Colwell 1986). Les *Campylobacter* sp. sont capables de passer sous une forme VNC lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables et en particulier dans l'eau. Le rôle des formes VNC reste controversé. Les formes VNC seraient capables de coloniser des poulets par le biais de l'eau de boisson (Pearson, Greenwood et al. 1993), mais ces résultats ne sont pas toujours reproductibles. Ainsi, le rôle des formes VNC de *C. jejuni* au regard de la colonisation des animaux est incertaine et il est probablement variable en fonction des souches et des espèces animales (Park 2002). Cependant, et malgré la controverse, l'état VNC joue probablement un rôle important dans la survie de campylobacter dans l'environnement (Murphy, Carroll et al. 2006).

### 4.4.2 La formation de biofilm

Les campylobacters sont capables de former des biofilms dans les environnements aquatiques (Buswell, Herlihy et al. 1998; Zimmer, Barnhart et al. 2003). L'environnement créé au sein du biofilm peut protéger campylobacter de l'oxygène de l'air. Dans les biofilms, campylobacter peut passer sous la forme VNC (Trachoo, Frank et al. 2002). Les biofilms jouent probablement un rôle important dans la survie des campylobacters dans les environnements agroalimentaires (Murphy, Carroll et al. 2006).

### 4.4.3 Survie dans les protozoaires

Il a été démontré que des souches de *C. jejuni* étaient capables d'infecter le protozoaire *Acanthamoeba polyphaga.* Dans ces cellules, les campylobacters ont une survie plus longue que lorsqu'ils sont en culture planctonique (Axelsson-Olsson, Waldenstrom et al. 2005). Dans une autre étude réalisée sur des échantillons d'eau de boisson d'élevages intensifs de volailles, *C. jejuni* a pu être détecté dans une grande variété de protozoaires. Ces bactéries présentaient également une survie plus longue dans les protozoaires que dans les cultures planctoniques, mais en plus, elles étaient significativement plus résistantes à un désinfectant utilisé en élevage de volaille (Virudine®) (Snelling, McKenna et al. 2005).

### 4.4.4 Les autres mécanismes de survie

#### 4.4.4.1 Survie à la chaleur

Les campylobacters sont sensibles à la chaleur et sont inactivés par la pasteurisation et la cuisson des aliments. Les traitements thermiques détruisent rapidement la presque totalité (sinon la totalité) d'une population même importante de *C. jejuni*, cette thermosensibilité varie en fonction de l'aliment dans lequel se trouve *C. jejuni* (Dromigny 2007). Quelques protéines chaperonnes ont été identifiées chez campylobacter (Parkhill, Wren et al. 2000). Ces protéines dégradent ou stabilisent les protéines anormales qui peuvent se former lors d'un stress chaud (Park 2002).

A l'abattoir, les procédés d'échaudage des volailles pourront donc être à l'origine d'une réduction du nombre de campylobacters en surface des carcasses. De même, une cuisson à cœur permet de réduire ou d'éliminer les campylobacters présents sur les aliments.

#### 4.4.4.2 Survie au froid

- Survie au froid positif

Les campylobacters sont incapables de se multiplier en dessous de 30°C et par conséquent, on peut considérer que la multiplication des campylobacters est impossible pendant la préparation et la conservation des aliments. A la différence des autres microorganismes qui montrent une diminution graduelle de leur croissance avec la réduction de température, les campylobacters présentent un arrêt brutal de leur croissance aux alentours de leur température de croissance minimale (Hazeleger, Wouters et al. 1998). Dans l'eau, les campylobacters ont une survie plus longue à 4°C qu'à 25°C. Des différences de survie en fonction de l'origine des souches ont été montrées : les souches isolées chez l'homme ont une survie plus longue à 4°C que les souches isolées chez la volaille (Chan, Le Tran et al. 2001).

- Survie à la congélation

La congélation entraîne une diminution rapide de la viabilité des campylobacters (les campylobacters peuvent être isolés après la congélation de viande et de produits de volailles).

Différents facteurs influent sur la sensibilité des campylobacters aux températures négatives :

- La composition du milieu dans lequel ils sont congelés
- Les conditions extérieures
- Le niveau initial de contamination
- La souche : la différence de tolérance à la congélation à –20°C est liée à la souche, mais ne semble pas liée à l'origine de la souche (Chan, Le Tran et al. 2001). Cependant, une étude récente n'a pas pu mettre en évidence de relation entre le génotype (déterminé par AFLP fluorescente) et la survie à la congélation (Wieland, Sandberg et al. 2006).

#### 4.4.4.3 Survie à la dessiccation

Les campylobacters sont très sensibles à la dessiccation, et la récupération des cellules de campylobacter est plus facile et plus fréquente sur les surfaces humides que sur les surfaces sèches (Corry and Atabay 2001).

Les phases de ressuage (à l'air) à l'abattoir qui combinent dessiccation et refroidissement entraînent une diminution du nombre de campylobacter présent à la surface de carcasses (Sanchez, Fluckey et al. 2002).

#### 4.4.4.4 Survie aux rayons UV

Les campylobacters sont sensibles aux rayons UV sous la forme des rayons du soleil. L'étude de la survie de *C. jejuni* dans la mer et dans les eaux de rivières a montré que les populations naturelles de campylobacter étaient plus résistantes aux UV que les populations issues de culture au laboratoire, sans que les différences mises en cause n'aient été identifiées (Obiri-Danso, Paul et al. 2001).

#### 4.4.4.5 Survie au stress oxydatif

L'exposition des campylobacters à l'oxygène entraîne la formation de composés intermédiaires comme les radicaux superoxydants. Si ces agents ne sont pas neutralisés, ils provoquent des lésions

fatales des acides nucléiques, des protéines et des composés membranaires. Les campylobacters possèdent quelques enzymes qui jouent un rôle dans le système de défense oxydatif (superoxyde dismutase, alkyl hydroperoxyde réductase, catalase). Mais les mécanismes clé de la défense contre le stress oxydatif, comme les enzymes SoxRS et OxyR présentes chez *E. coli* et *Salmonella typhimurium*, sont absents chez campylobacter (Park 2002).

### 4.4.5 Avantages conférés par la plasticité génomique des campylobacters

La diversité phénotypique et génotypique des campylobacters est facilement observable avec les méthodes de typage moléculaire (Wassenaar and Newell 2000; Meinersmann, Patton et al. 2002; Schouls, Reulen et al. 2003). Cette diversité suggère une forte plasticité génomique qui augmente le potentiel des campylobacters pour s'adapter et survivre dans des environnements hostiles (Newell, Shreeve et al. 2001; Murphy, Carroll et al. 2006). Dans une étude portant sur la diversité des profils du gène de la flagelline (typage *fla*A), il a été montré que de nombreux clones présents initialement au niveau de l'élevage se retrouvaient sur les carcasses après abattage sur lesquelles la diversité des clones observée était réduite (Hiett, Stern et al. 2002). Il a également été démontré, avec la même technique de typage, que certains sous-types isolés de volailles à l'élevage étaient capables de survivre à l'ensemble des transformations pendant les opérations d'abattage, que certains sous-types ne survivent qu'au ressuage et enfin, que certains sous-types ne sont jamais retrouvés sur les produits finis (Newell, Shreeve et al. 2001).

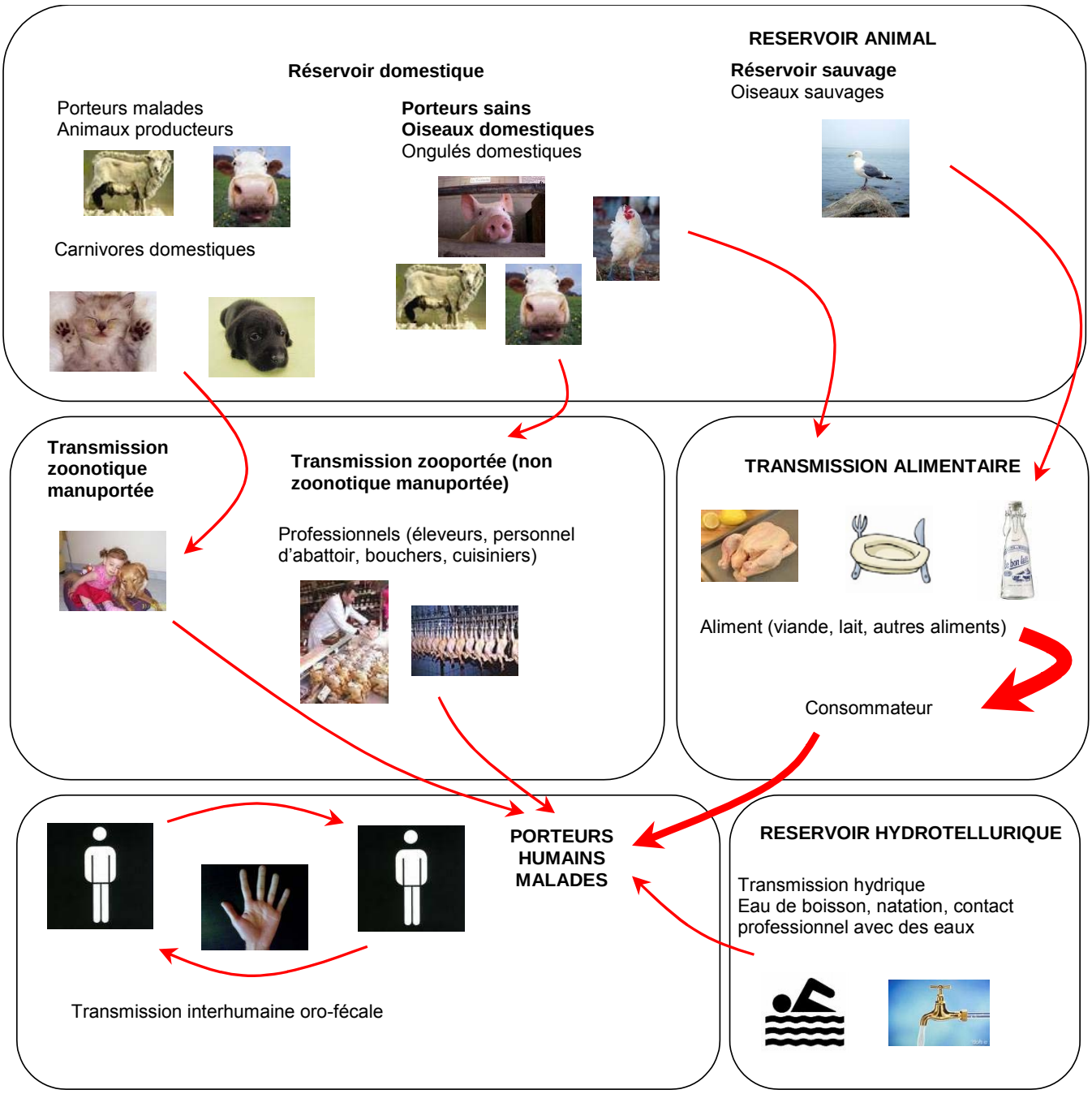
S'il était de la responsabilité des scientifiques au laboratoire de déterminer si campylobacter est susceptible de devenir un pathogène alimentaire, il serait certainement le dernier à être proposé. Pourtant, campylobacter est un grave problème de santé publique aussi bien dans les pays en voie de développement que dans les pays industrialisés. Les mécanismes de survie des campylobacters sont mystérieux, mais le séquençage du génome de cette bactérie, la compréhension de la variation génétique observée et l'utilisation de puces à ADN devraient permettre de mieux comprendre ces mécanismes (Murphy, Carroll et al. 2006).

Le contrôle des campylobacters le long de la chaîne de production de la viande de volailles sera d'autant plus efficace si la colonisation des animaux est empêchée. La réduction de la prévalence de l'infection à campylobacter dans la phase primaire diminue le nombre de campylobacters présents dans les phases suivantes ce qui permet de réduire la charge en campylobacters ou de protéger le produit final. En théorie, un niveau élevé de biosécurité à l'élevage devrait protéger contre campylobacter, cependant un niveau extrêmement élevé de biosécurité (mise en place des mesures d'hygiène) ne garantit pas forcément un lot négatif au moment de l'abattage. Pourtant actuellement, la seule intervention réalisable et (partiellement) efficace au niveau des élevages repose sur la biosécurité.

### 4.4.6 Contribution de la viande de volaille aux infections humaines à campylobacter

- La mise en évidence de la viande de volaille comme principal aliment responsable des infections à campylobacter est indirecte, parce que la plupart des cas sont sporadiques et que l'identification de l'aliment contaminé n'est pas toujours faite. Les infections à campylobacter sont en relation avec une

**Figure 6. Mode de transmission des campylobacters à l'homme d'après Dromigny (2007)**



contamination alimentaire dans 80 % des cas, et parmi les aliments incriminés, le poulet apparaît le plus souvent en cause.

Le lien de causalité fort entre les cas sporadiques des infections humaines à campylobacter et la consommation de viande de poulets repose sur (critères de Hill) (Anonymous 2004):

- Une association mise en évidence dans les études cas-témoins
- Une plausibilité liée à la présence fréquente de campylobacters en grand nombre sur les carcasses de poulet
- L'effet d'intervention comme la congélation[1] (Islande 1998-2000) ou le retrait temporaire du poulet à la consommation[2] (Belgique 1999)

# 5 Epidémiologie des infections à campylobacter chez l'homme

## 5.1 Dose infectieuse pour l'homme

La dose minimale infectieuse (DMI) peut être déterminée par des études d'ingestion volontaire, par des études chez l'animal ou par des études épidémiologiques. Il ressort de l'ensemble des travaux qui ont été réalisés sur *C. jejuni* que la dose infectieuse est très variable. Les deux facteurs de variations les plus importants sont : la souche utilisée (effet souche) et le vecteur permettant l'absorption de la souche (effet protecteur vis-à-vis de la barrière gastrique). La plupart des expériences ont été réalisées avec le lait comme vecteur du germe ; cela ne permet pas de connaître les doses infectieuses ou les caractéristiques de la maladie après ingestion d'autres types d'aliments. Les expériences portent sur des volontaires qui ont ingéré de 500 à $2.10^9$ cellules. Le taux d'infection (culture de selles positives) s'accroît avec la dose reçue, mais les signes cliniques (fièvre, diarrhée) ne semble pas dose-dépendants. (Federighi 1999). Il ressort de ces expériences que la dose infectieuse peut-être très faible (500 cellules).

## 5.2 Sources de la contamination humaine par les campylobacters

### 5.2.1 Modes de transmission des campylobacters à l'homme

Les campylobacters sont des bactéries ubiquitaires présentent dans trois réservoirs : le réservoir humain, le réservoir animal et le réservoir hydro-tellurique. La circulation des campylobacters entre ces trois réservoirs et les modes de transmission des campylobacters sont résumés dans la figure 6.

La transmission principale semble se faire par ingestion d'aliments contaminés insuffisamment cuits, principalement la volaille ou d'aliments (légumes) contaminés lors de leur préparation (contaminations croisées). L'eau et le lait cru sont également des sources de contamination identifiées lors de grandes

[1] De 1980 à 1996, seuls des poulets congelés étaient vendus en Islande et le taux d'infection à campylobacter était bas. Après l'autorisation de la vente de poulet frais dans ce pays, le taux d'infection à campylobacter a augmenté dans des proportions très importantes (la congélation diminuait d'une ou deux puissances de 10 la quantité de bactéries présentes sur les carcasses).

[2] En 1999 en Belgique, la production belge de poulets (60% du total) fut brutalement retirée du marché début juin à la suite de la crise de la dioxine et une diminution de 40% des cas d'infection à campylobacter ont été observés pendant cette période. La réintroduction de la volaille belge après 4 semaines a conduit à un retour à la situation antérieure.

**Tableau 7. Répartition des espèces de campylobacter isolées dans les entérites humaines. Résultats EPICOP (Weber, Laudrat et al. 2003)**

| Espèce | Nombre de souches | % |
|---|---|---|
| *C. jejuni* | 73 | 89.0 |
| *C. coli* | 8 | 9.8 |
| *C. upsaliensis* | 1 | 1.2 |

épidémies. On observe une variation saisonnière des entérites à campylobacter chez l'homme avec un pic pendant les mois les plus chauds (Anonymous 2004).

## 5.3 Symptômes cliniques

Les campylobacters sont des bactéries entériques, acquises par voie orale et adaptées à la vie dans le mucus du tractus digestif. Pour ces raisons, la maladie humaine la plus fréquemment associée aux campylobacters est une entérite aiguë causée par une infection intestinale, qui peut se compliquer d'une bactériémie, de localisations secondaires, et d'un syndrome post-infectieux (Anonymous 2004).

### 5.3.1 Entérite à campylobacter

Les quatre principales espèces responsables d'infections digestives sont *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* et *C. upsaliensis*. Il est admis généralement que *C. jejuni* représente 95% des cas de gastro-entérites provoqués par campylobacter chez l'homme (Federighi 1999). Le tableau 7 indique la répartition des espèces de campylobacter isolées dans les entérites humaines en France (résultats d'une enquête EPICOP, réseau de laboratoire de biologie médicale, en 1999-2000)(Weber, Laudrat et al. 2003).

#### 5.3.1.1 Infections digestives dues à *C. jejuni*

D'un point de vue général, les signes cliniques et les symptômes d'infections à *C. jejuni* ne sont pas assez spécifiques pour être facilement distingués d'infections provoquées par d'autres entéropathogènes. On peut observer divers degrés d'intensité, d'un bref épisode de gastro-entérite à une entérocolite sévère durant plusieurs semaines, accompagnée de douleurs abdominales et d'une diarrhée sanglante. La durée d'incubation est importante, en moyenne de 1 à 7 jours, ce qui pose des problèmes lors de la recherche du repas ou des aliments à incriminer à la suite d'un épisode de toxi-infection alimentaire.

Les prodromes sont caractérisés par l'apparition de la fièvre qui peut rapidement atteindre 40°C ; on peut noter aussi des malaises, des maux de tête et des douleurs musculaires. Cette période peut durer jusqu'à deux jours.

Ensuite, le patient souffre de nausées et ressent des crampes abdominales typiquement localisées à la région péri-ombilicale. Commence alors la phase d'état ou de diarrhée, caractérisée par l'apparition d'une diarrhée qui peut être profuse (nombre de selles supérieures à six par jour). Les selles sont aqueuses ou muqueuses. Après deux ou trois jours, on peut y voir apparaître du sang en nature. Des vomissements peuvent être observés. La maladie dure rarement plus de huit jours, la diarrhée aiguë s'étendant sur trois jours au plus, à la suite desquels le malade se sent faible et épuisé. Au cours de la phase d'évolution, tous les signes régressent et la guérison survient sans séquelles. Cependant, environ 25% des patients ressentiront encore des douleurs abdominales, jusqu'à 6 semaines parfois.

Toutefois, les signes cliniques ne s'expriment pas avec la même fréquence ni la même intensité chez tous les patients ; de nombreux facteurs entrent en jeu, notamment l'âge, l'environnement, le milieu social. La bénignité habituelle de l'évolution clinique contraste avec l'impression très désagréable généralement ressentie par le patient lors d'une campylobactériose : prostration, douleur très importante, impression de « mort imminente ». L'excrétion du germe peut durer de 2 à 5 semaines, voire plusieurs mois (Federighi 1999; Dromigny 2007).

#### 5.3.1.2 Infections digestives dues aux autres campylobacters

*C. coli*, *C. lari* et *C. upsaliensis* provoquent également des gastro-entérites chez l'homme. Ces entérites sont souvent difficiles à différencier de *C. jejuni* (cliniquement et microbiologiquement) (Federighi 1999).

#### 5.3.1.3 Traitement

Dans la plupart des cas, l'infection intestinale rétrocède spontanément en moins d'une semaine, mais les antibiotiques peuvent être indiqués pour les cas graves. Pour *C. jejuni*, le traitement antibiotique réduit la durée de la diarrhée et la durée d'excrétion des campylobacters dans les selles. Les antibiotiques de choix sont les macrolides avec l'érythromycine en tête de file et les fluoroquinolones (ciprofloxacine et norfloxacine) (Avrain and Kempf 2000; Aarestrup and Engberg 2001; Gibreel and Taylor 2006). Les aminoglycosides peuvent également être administrés par voie intraveineuse lors d'infection très sévère ou de septicémie (Aarestrup and Engberg 2001). Lorsqu'un traitement antibiotique est nécessaire, plus il est administré tôt dans le développement de la maladie, plus la durée de la maladie est réduite (Ternhag, Asikainen et al. 2007).

### 5.3.2 Complications et séquelles

L'entérite aiguë peut se compliquer de bactériémie, de localisations secondaires et d'un syndrome post-infectieux. La déshydratation est parfois très marquée, ce qui justifie une hospitalisation.

#### 5.3.2.1 Infections systémiques

Les campylobacters sont des bactéries considérées comme invasives qui peuvent transloquer et se retrouver dans le torrent circulatoire. Néanmoins la fréquence des bactériémies et septicémies détectées en cas d'entérites à campylobacters thermotolérants reste très faible (0.1%) notamment par rapport à ce qui est observé pour les salmonelles (Anonymous 2004)..

*C. fetus* est une espèce peu fréquente comme cause d'entérite mais souvent retrouvée dans les infections systémiques. Il est généralement admis que 90% des septicémies à campylobacter sont dues à *C. fetus*. De manière presque systématique, la dissémination sanguine fait suite à une porte d'entrée digestive. Des formes nerveuses peuvent être provoquées par cette bactérie (méningites purulentes), et des formes suppuratives dans d'autres localisations (pus pleural, liquide péricardique, abcès sous-cutané…). Quelle que soit la forme prise*, C. fetus* subsp. *fetus* est essentiellement un pathogène opportuniste ; il intervient sur des terrains fragilisés (alcoolisme, cirrhose, thérapie immunodépressive, SIDA, diabète) (Federighi 1999).

#### 5.3.2.2 Syndromes post-infectieux faisant suite à une infection à *C. jejuni*

Les complications sont rares (moins de 1% des cas). Trois syndromes au mécanisme incertain sont attribués à *C. jejuni* à l'exclusion des autres espèces du genre : le syndrome de Guillain-Barré (SGB), le syndrome de Miller-Fisher (SMF) et le syndrome hémolytique et urémique (SHU). Ils surviennent au cours ou à la suite d'une entérite aiguë ; le germe n'intervient pas par sa virulence mais comme indicateur de réactions complexes, probablement à médiation immunologique. Le SGB est une atteinte neurologique se caractérisant par une paralysie flasque, le plus souvent réversible. Ce

**Figure 7. Incidence des infections à campylobacter dans sept pays industrialisés de 1980 à 1998 (Anonymous 2004)**

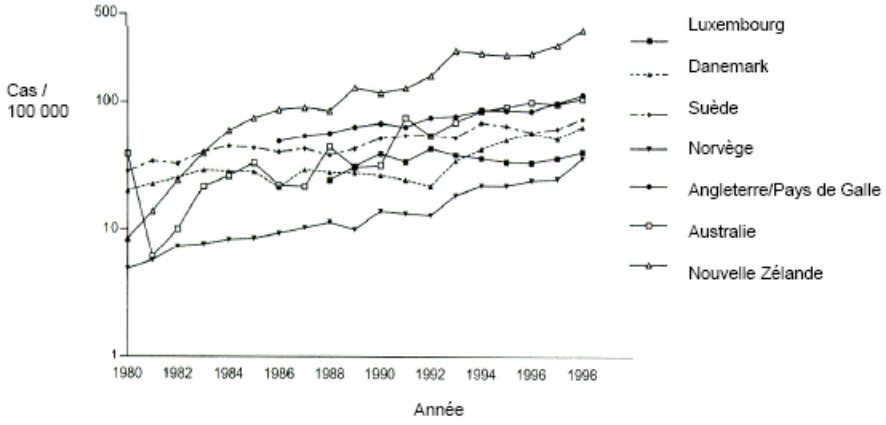



**Tableau 8. Estimations les plus plausibles pour les campylobacters et les salmonelles non-typiques du nombre moyen annuel de cas (InVS 2004)**

| Infections à | Nombre moyen annuel estimé toutes origines | | | % origine alimentaire |
|---|---|---|---|---|
| | Cas | Cas hospitalisés | Cas décédés | |
| *Campylobacter* spp. | 15 995-21 652 | 3 247-4 395 | 16-22 | 80 |
| *Salmonella* non Typhi | 32 208-43 304 | 5 991-10 739 | 97-563 | 95 |

| Infections à | Nombre moyen annuel estimé d'origine alimentaire | | |
|---|---|---|---|
| | Cas | Cas hospitalisés | Cas décédés |
| *Campylobacter* spp. | 12 796-17 322 | 2 598-3 516 | 13-18 |
| *Salmonella* non Typhi | 30 598-41 139 | 5 691-10 202 | 92-535 |

syndrome réputé réversible est en fait très sévère avec une mortalité de 2 à 3%, des séquelles neurologiques majeures dans 20% des cas et une récupération partielle ou totale après quelques semaines ou mois pour les autres cas. On estime que 20 à 50% des cas de SGB, les plus sévères, seraient dus à une infection par campylobacter. Le traitement consiste en une plasmaphérèse. Le SMF comporte ataxie et ophtalmoplégie, il constitue une variante peu fréquente du SGB (Anonymous 2004). Le SHU survient chez l'enfant et constitue une éventualité fréquente au cours d'un syndrome entérique (Federighi 1999).

## 5.4 Incidence de la maladie

Campylobacter est peu présent dans les bilans de fréquence d'isolement dans les selles diarrhéiques à la fin des années 70. C'est au début des années 80 que l'on a pu commencer à apprécier l'importance réelle des infections à campylobacter grâce à l'amélioration des procédés de culture fécale. De nos jours, les campylobacters sont reconnus comme une des principales voire la première cause de gastro-entérites bactériennes d'origine alimentaire dans le monde (Altekruse, Stern et al. 1999; Anonymous 2003; Butzler 2004; Hariharan, Murphy et al. 2004; Schlundt, Toyofuku et al. 2004; Moore, Corcoran et al. 2005; Snelling, Matsuda et al. 2005; Wagenaar, Mevius et al. 2006).

L'incidence annuelle estimée des infections à campylobacter dans la population générale varie selon les pays (figure 7)

En France, les entérites à campylobacter ne sont pas inscrites sur la liste des maladies à déclaration obligatoire. Mais les TIAC (toxi-infection alimentaire collective) font l'objet d'une déclaration obligatoire. Entre 1997 et 2000, les campylobacters étaient identifiés dans 0.4% des TIAC. Un réseau d'épidémiosurveillance a été créé en 2002 incluant 250 laboratoires d'analyse médicale répartis sur le territoire métropolitain (Anonymous 2004). La surveillance au niveau national est réalisée par le CNR (centre national de référence) des campylobacters et hélicobacters au CHU de Bordeaux (http://www.cnrch.u-bordeaux2.fr/cnrch.php). L'InVS (Institut de veille sanitaire) a présenté en 2004 un rapport dont l'objectif était de fournir une estimation de la morbidité et de la mortalité liées aux agents infectieux transmis par l'alimentation pour les années 1990 en France métropolitaine. Pour les campylobacters et les salmonelles non-typhiques, les résultats de l'estimation de la morbidité et de la mortalité annuelle totales et d'origine alimentaire sont présentés dans le tableau 8. La recherche de campylobacter dans les coprocultures n'étant pas systématique en France et cette recherche étant relativement difficile (par rapport aux salmonelles), le nombre de cas confirmés estimé à partir du nombre de cas confirmés observé est une sous-estimation du nombre de cas qui auraient pu être confirmés. Cette sous-estimation doit être prise en compte pour juger du poids de ces infections par rapport à celles liées aux salmonelles (InVS 2004). Les facteurs suivants peuvent expliquer la sous-estimation des infections à campylobacter en France (Anonymous 2004) :

- Les campylobacters sont rarement impliqués dans les TIAC de grande ampleur car, à la différence des salmonelles, ils ne sont pas capables de se multiplier dans les aliments
- Il existe un défaut de diagnostic des campylobacters car :
  - Le diagnostic bactériologique des campylobacters est techniquement plus difficile que celui des salmonelles, chez l'homme et dans les aliments.

- Il n'y a pas de recherche systématique de campylobacter dans les coprocultures, contrairement aux salmonelles.
- Les praticiens ne pensent pas à demander une recherche de campylobacter lors des prescriptions de coproculture.

➢ La durée d'incubation des infections à campylobacter est longue (1 à 10 jours) ce qui majore les difficultés diagnostiques en raison des délais prolongés entre le moment de la contamination, la maladie et les démarches d'investigation (Anonymous 2004).

## 5.5 Impact économique des infections à campylobacter chez l'homme

Les symptômes intestinaux des infections à campylobacter ne sont pas toujours un motif de consultation médicale, ni de déclaration. En outre, les coprocultures ne sont pas systématiquement effectuées, et quand elles le sont, la recherche de campylobacter, bactérie difficile à isoler, n'est pas toujours réalisée. Campylobacter est donc vraisemblablement à l'origine de pertes économiques importantes à cause des arrêts de travail, de la perte de productivité et de la consommation médicale induite (Avrain and Kempf 2000) (Gibreel and Taylor 2006).

## 5.6 Réglementation relative à campylobacter

### 5.6.1 Textes européens (Dromigny 2007)

➢ Parmi les règlements, il y a des textes généraux qui ne parlent pas de campylobacter mais qui s'y appliquent par voie de conséquences : ce sont les règlements du « paquet hygiène » R-852/2004, R-853/2004. Le Règlement 2160/2003 (règlement (CE) n° 2160/2003 du Parlement européen et du Conseil du 17 novembre 2003) sur le contrôle des salmonelles et d'autres agents zoonotiques présents dans la chaîne alimentaire traite de campylobacter, et vise à réduire la prévalence de certaines zoonoses chez les populations animales.

➢ La directive 2003/99/CE (directive du Parlement européen et du Conseil du 17 novembre 2003 sur la surveillance des zoonoses et des agents zoonotiques, modifiant la décision 90/424/CEE du Conseil et abrogeant la directive 92/117/CEE du Conseil, *Journal officiel* n° L 325 du 12/12/2003) complète le règlement 2160/2006.

➢ Trois décisions traitent du programme de surveillance de campylobacter chez les poulets de chair tel qu'il a été prévu par la Suède (en 2000, 2001 et 2003) et une décision concerne un projet de règlement relatif à l'étiquetage de la viande de volaille.

➢ Une recommandation (recommandation de la Commission du 19 décembre 2003 relative à un programme coordonné de contrôle officiel des denrées alimentaires pour 2004, Journal officiel n° L 006 du 10/01/2004) indique : « *À l'heure actuelle, les informations scientifiques disponibles ne sont pas suffisantes pour fixer dans la législation communautaire un critère applicable à campylobacter; des études complémentaires sont menées afin de mieux comprendre l'épidémiologie de cet agent pathogène ainsi que le rôle joué par les autres produits animaux et par les autres denrées alimentaires en général. Ce volet du programme vise à évaluer la sécurité microbiologique de la viande de volaille fraîche en ce qui concerne campylobacter, en vue de favoriser un niveau élevé de protection des consommateurs et de recueillir des informations sur la*

*prévalence de ces bactéries dans de tels produits. L 6/30 FR Journal officiel de l'Union européenne 10.1.2004* »

### 5.6.2 Textes français (Dromigny 2007)

- Les TIAC figurent dans la liste des maladies à déclaration obligatoire (décret n° 86-770 du 10 juin 1986 (JO du 14 juin 1986). Une définition officielle de la TIAC est donnée dans la brochure 1487 du Journal officiel de la République française : "*Une toxi-infection alimentaire collective est définie par l'apparition d'au moins deux cas groupés similaires d'une symptomatologie, en général gastro-intestinale, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire*".
- Des notes de services de la direction générale de l'alimentation (DGAl) précisent les conditions et les résultats de divers plans de surveillance concernant les campylobacters et les salmonelles dans la filière volaille.
- Il n'existe pas à l'heure actuelle de critères microbiologiques réglementaire national concernant la présence de campylobacter dans les aliments.

# 6 Résistance des campylobacters aux antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances naturelles produites par des micro-organismes, ayant une activité sur d'autres bactéries. Au sens large, on y inclut également les antibactériens de synthèse (Anonymous 2006).

## 6.1 Définition de la résistance

La résistance est un terme fréquemment employé dont la définition fait l'objet de nombreuses discussions. La résistance des bactéries aux antibiotiques se définie par rapport à :

- une population de référence, c'est à dire l'espèce bactérienne à laquelle appartient la souche étudiée (Heinzel 1998; Russell 1999; Davison, Low et al. 2000; Sidhu, Sorum et al. 2002; Cloete 2003; Gilbert and McBain 2003; Russell 2003; Bore and Langsrud 2005),
- un stress qui est la molécule antibiotique étudiée à une concentration fixée dans le milieu (Langsrud, Singh Sidhu et al. 2003; Russell 2003)
- un contexte qui correspond à la méthode d'étude de la résistance, c'est à dire au point de vue soit du clinicien, du pharmacologiste, du microbiologiste ou de l'épidémiologiste (Davison, Low et al. 2000; Gilbert and McBain 2003; Langsrud, Singh Sidhu et al. 2003; Soumet, Ragimbeau et al. 2005). La sensibilité, la spécificité, la répétabilité et la reproductibilité de la méthode doivent être connues
- une valeur seuil qui est fonction de la méthode d'étude (succès thérapeutique, concentrations d'antibiotiques, diminution de la population bactérienne…) (Sudheim, Langsrud et al. 1998; Cloete 2003; Langsrud, Singh Sidhu et al. 2003; Bore and Langsrud 2005)
- Enfin, la méthode d'échantillonnage doit être précisée, en indiquant comment les échantillons sont prélevés soit parmi les bactéries, soit dans la population hôte soit dans l'environnement (Davison, Low et al. 2000).

En fonction des méthodes d'étude de la résistance, plusieurs définitions sont données (Anonymous 2006) :

- pour le clinicien, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si le traitement n'est pas efficace
- pour le pharmacologiste, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si les concentrations atteintes au site d'action sont inférieures à la concentration minimale inhibitrice
- pour le microbiologiste, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si elle dispose d'un mécanisme de résistance augmentant la valeur de la concentration minimale inhibitrice
- pour l'épidémiologiste, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si elle a une concentration minimale inhibitrice significativement différente de celle de la population normale

## 6.2 Détection de la résistance aux antibiotiques

### 6.2.1 Méthodes d'étude de la résistance aux antibiotiques

Les méthodes utilisées pour évaluer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques sont cruciales pour les résultats et l'évaluation de la résistance (Kummerer 2004).

#### 6.2.1.1 Méthodes traditionnelles

Les méthodes conventionnelles nécessitent l'isolement en culture pure des bactéries à étudier, et la réalisation d'essais au cours desquels les bactéries sont exposées à différentes concentrations d'antibiotiques sous des conditions de croissance précises. L'aptitude des antimicrobiens à inhiber la croissance des bactéries est déterminée. Ces méthodes visent à déterminer une concentration minimale inhibitrice (CMI). Par définition (OMS), la CMI est la plus faible concentration d'antibiotique capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une bactérie donnée, appréciable à l'œil nu, après une période d'incubation donnée (Euzéby 2003). La nécessité de standardiser les méthodes de mesure des CMI date de la fin des années 70. En 1975, le comité américain NCCLS (National committee for clinical laboratory standards) éditent des lignes directrices pour la réalisation des essais de mesure des CMI (NCCLS 2002; NCCLS 2003). En Europe, il existe 6 systèmes nationaux de standardisation : en Suisse, en Allemagne, aux Pays-Bas, au Royaume-Uni, en France, et les standards du CLSI (anciennement NCCLS) sont repris dans certains pays européens (Wheat 2001).

La standardisation porte sur (Andrews 2001) :

- les solutions d'antibiotiques
  - la préparation des solutions conservées
  - les préparations des gammes de dilution
- les milieux de culture (gélose ou bouillon)
- la préparation des *inoculi* bactériens
- les souches de bactéries utilisées pour le contrôle qualité
- les conditions d'inoculation des milieux de culture
- les conditions d'incubation
- la lecture et l'interprétation des résultats

L'objectif de la standardisation est d'assurer la qualité des résultats obtenus et de pouvoir les comparer entre laboratoires ou entre pays utilisant les mêmes méthodes d'étude de la résistance.
Les méthodes traditionnelles d'étude de la résistance chez campylobacter sont les suivantes :

- les méthodes de diffusion des antibiotiques à partir de disques de papier buvard.

Des disques de papier buvard, imprégnés des antibiotiques à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance de migration par rapport au disque. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture. Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe (Euzéby 2003). Les méthodes de diffusion sont utilisées par le laboratoire de diagnostic et permettent la mesure des diamètres d'inhibition qui peuvent être comparé au seuil critique utilisé pour le classement des bactéries.

- les méthodes de dilution en milieu liquide ou gélosé

Les méthodes de dilution sont effectuées en milieu liquide ou en milieu solide (gélose). Elles consistent à mettre un *inoculum* bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotique.
En milieu liquide, l'*inoculum* bactérien est distribué dans une série de tubes (méthode de macrodilution) ou de cupules (méthode de microdilution) contenant l'antibiotique. Après incubation, la CMI est indiquée par le tube ou la cupule qui contient la plus faible concentration d'antibiotique et où aucune croissance n'est visible.
En milieu solide, l'antibiotique est incorporé dans un milieu gélosé coulé en boîtes de Petri. La surface de la gélose est ensemencée avec un *inoculum* des souches à étudier. Après incubation, la CMI de chaque souche est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration d'antibiotique.
Les techniques de dilution en milieu gélosé permettent également de mesurer la concentration inhibitrice 99 p. cent (concentration qui inhibe la croissance de 99 p. cent des cellules d'une souche bactérienne) ou la concentration inhibitrice 50 p. cent (concentration qui inhibe la croissance de 50 p. cent des cellules d'une souche bactérienne)(Euzéby 2003).

- Choix des seuils : Les méthodes traditionnelles d'étude de la résistance donnent des résultats qui nécessitent la définition de valeur seuil.

En fonction des objectifs de l'étude de la résistance, des valeurs seuils différentes peuvent être retenues. La confrontation de la CMI à des seuils (concentrations critiques) permet de classer la bactérie comme sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R). Des recommandations méthodologiques et la définition des concentrations critiques sont faites par des comités nationaux. Il n'existe pas de norme internationale. En France, ces valeurs critiques sont fixées par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM 2007). Ces valeurs définissent des catégories cliniques.

**Tableau 9. Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour *Campylobacter* spp. (CA-SFM 2007)**

| Antibiotique | Charge du disque | Concentrations critiques (mg/L) | | Diamètres critiques (mm) | | Remarques |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | S | R | S | R | |
| Ampicilline | 10 µg | ≤ 4 | > 16 | ≥ 19 | < 14 | Cf règle (1). |
| Amoxicilline/ac. clavulanique | 20/10 µ | ≤ 4/2 | > 16/2 | ≥ 21 | < 14 | Cf règle (1). |
| Céfalotine (H) | 30 µg | ≤ 8 | > 32 | ≥ 18 | < 12 | Cf règle (1). |
| Céfotaxime (H) | 30 µg | ≤ 4 | > 32 | ≥ 21 | < 15 | Cf règle (1). |
| Streptomycine | 10 UI | ≤ 8 | > 16 | ≥ 15 | < 13 | Cf règles (1) et (2). |
| Gentamicine | 15 µg (10 UI) | **≤ 2** | **> 4** | **≥ 18** | **< 16** | Cf règles (1) et (2). |
| Kanamycine | 30 UI | ≤ 8 | > 16 | ≥ 17 | < 15 | Cf règles (1) et (2). |
| Tobramycine | 10 µg | **≤ 2** | **> 4** | **≥ 18** | **< 16** | Cf règles (1) et (2). |
| Erythromycine | 15 UI | ≤ 1 | > 4 | ≥ 22 | < 17 | Cf règles (1). Interprétation valable pour clarithromycine |
| Acide nalidixique | 30 µg | ≤ 8 | > 16 | ≥ 20 | < 15 | Cf règle (1). |
| Ciprofloxacine | 5 µg | **≤ 0,5** | **> 1** | **≥ 25** | **< 22** | Cf règle (1). |
| Tétracycline | 30 UI | ≤ 4 | > 8 | ≥ 19 | < 17 | |
| Chloramphénicol | 30 µg | ≤ 8 | > 16 | ≥ 23 | < 19 | |

(H) – Antibiotique distribué en milieu hospitalier

Règles de lecture interprétative

Remarques : selon les antibiotiques, la corrélation entre CMI et diamètres est parfois difficile à établir. En cas de doute sur les résultats obtenus par diffusion en milieu gélosé, il y a lieu de déterminer les CMI par une méthode de référence ou toute méthode ayant montré, pour les antibiotiques concernés, son équivalence avec la méthode de référence.

(1) Pour *Campylobacter* spp., une absence de zone d'inhibition autour des disques de β-lactamines, aminosides, macrolides ou quinolones traduit une résistance de haut niveau.

(2)Compte tenu des conditions d'incubation (anaérobiose ou microaérobiose), les diamètres des zones d'inhibition autour des disques d'aminosides sont toujours réduits.

**Tableau 10. Cut-off épidémiologiques proposés par l'EUCAST pour *C. jejuni* et *C. coli* (Anonymous 2007)**

| Antibiotiques | C. jejuni | | | C. coli | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Nombre d'observations | Sources de données | Cut-off épidémiologique | Nombre d'observations | Sources de données | Cut-off épidémiologique |
| Macrolides (érythromycine, clarithomycine, azithromycine) | 1424 | 17 | ≤ 4 mg/l | 2087 | 17 | ≤ 16 mg/l |
| (Fluoro)quinolones | | | | | | |
| ciprofloxacine | 1023 | 16 | ≤ 1 mg/l | 2532 | 17 | ≤ 1 mg/l |
| acide nalidixique | 1082 | 12 | ≤ 16 mg/l | 1824 | 15 | ≤ 32 mg/l |
| Tétracycline | 808 | 8 | ≤ 2 mg/l | 1280 | 11 | ≤ 2 mg/l |
| Aminoglycosides | | | | | | |
| Streptomycine | 514 | 10 | ≤ 2mg/l | 894 | 8 | ≤ 4 mg/l |
| Gentamicine | 1151 | 12 | ≤ 16 mg/l | 1915 | 15 | ≤ 2 mg/l |
| Pénicillines | | | | | | |
| Amoxicilline | 401 | 5 | ≤ 16 mg/l | 800 | 6 | ≤ 8 mg/l. |
| ampicilline | 808 | 8 | ≤ 8 mg/l | 1208 | 10 | ≤ 16 mg/l |

**Tableau 11. Comparaison des seuils EUCAST et CA-SFM**

| Antibiotiques | EUCAST Cut-off épidémiologique[1] | | CA-SFM Concentrations critiques R[2] |
|---|---|---|---|
| | *C. jejuni* | *C. coli* | *Campylobacter spp.* |
| Macrolides (érythromycine, clarithomycine, azithromycine) | > 4 mg/l | > 16 mg/l | > 4 mg/l |
| (Fluoro)quinolones | | | |
| ciprofloxacine | > 1 mg/l | > 1 mg/l | > 1 mg/l |
| acide nalidixique | > 16 mg/l | > 32 mg/l | > 16 mg/l |
| Tétracycline | > 2 mg/l | > 2 mg/l | > 8 mg/l |
| Aminoglycosides | | | |
| Streptomycine | > 2mg/l | > 4 mg/l | >16 mg/l |
| Gentamicine | >16 mg/l | > 2 mg/l | >4 mg/l |
| Pénicillines | | | |
| Amoxicilline | > 16 mg/l | > 8 mg/l. | >16 mg/l |
| Ampicilline | > 8 mg/l | > 16 mg/l | >16 mg/l |

[1] Valeur seuil séparant la population sensible de la population résistante

[2] Valeur seuil séparant la population « intermédiaire » de la population résistante

Trois catégories ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité *in vitro* : sensible (S), résistant (R) et intermédiaire (I).

- Les souches catégorisées S sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée dans le résumé des caractéristiques du produit, rédigé par l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS).
- Les souches catégorisées R sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quels que soient le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée.
- Les souches catégorisées I sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible. Ces souches forment un ensemble hétérogène pour lequel les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas prédictifs d'un succès thérapeutique. La catégorie intermédiaire est aussi une zone tampon qui tient compte des incertitudes techniques et biologiques.

Les valeurs critiques du CA-SFM pour campylobacter sont indiquées dans le tableau 9.

Le besoin d'une harmonisation européenne dans la méthodologie des tests a conduit, en 2002, à la création de l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Le Comité de l'Antibiogramme de la Société française de Microbiologie prend une part active à l'EUCAST et elle est l'un des six comités nationaux reconnus par l'EUCAST. L'EUCAST prend en compte les histogrammes de distribution des CMI de souches isolées dans les différents pays d'Europe, il ne s'agit plus de valeurs critiques définies par rapport à un probable succès ou échec thérapeutique, mais des cut-off épidémiologiques déterminés à partir des histogrammes de distribution des CMI. Les cut-off épidémiologiques proposés par l'EUCAST sont indiqués dans le tableau 10.

- Comparaison des seuils CA-SFM et EUCAST (tableau 11)

Les seuils proposés par l'EUCAST sont différents pour *Campylobacter jejuni* et *Campylobcter coli*, les deux espèces sont regroupées avec les autres espèces de campylobacter dans les recommandations du CA-SFM.

Pour les fluoroquinolones et les macrolides qui sont les molécules de choix pour le traitement des entérites à campylobacter, les valeurs seuils retenues (valeurs critiques et seuils épidémiologiques) sont identiques pour *C. jejuni*.

#### 6.2.1.2 Méthodes génétiques

L'étude des mécanismes de la résistance aux antibiotiques, biochimique puis génétique, a permis l'identification de déterminants génétiques responsables des phénomènes de résistance observés.

Dans tous les cas, l'acquisition d'un mécanisme de résistance aux antibiotiques repose soit sur

- Un transfert horizontal de gènes (intégrons, transposons, plasmides)
- Une mutation d'un gène chromosomique ou plasmidique

La résistance aux antibiotiques est donc détectable avec les méthodes génétiques ; celles-ci détectent des gènes reconnus à l'origine d'un mécanisme de résistance. Cette détection se fait soit par hybridation, soit par amplification (PCR) et détection de l'amplicon obtenu (Cockerill 1999; Fluit, Visser et al. 2001; Sundsfjord, Simonsen et al. 2004).

Chez campylobacter, de nombreux mécanismes de résistance ont été identifiés ainsi que les gènes responsables. La détection de ces gènes permet l'étude de l'épidémiologie de la résistance chez campylobacter en apportant des connaissances soit sur l'accumulation (intégrons) soit sur la dissémination de ces gènes au sein des populations de campylobacter étudiées.

Les déterminants génétiques suivants de résistance aux antibiotiques sont décrits et peuvent être utilisés pour l'étude de la résistance aux antibiotiques chez campylobacter :

- Des intégrons porteurs de déterminants de résistance aux aminoglycosides (Gibreel and Skold 1998; Lee, Sanchez et al. 2002; O'Halloran, Lucey et al. 2004) .
- Des plasmides porteurs de déterminants génétiques de résistance aux tétracyclines (Connell, Trieber et al. 2003)
- Des mutations du gène de l'ADN gyrase associées aux résistances aux fluoroquinolones (Cooper, Segal et al. 2002)
- Des gènes codant pour synthèse de pompes à efflux (Pumbwe and Piddock 2002; Corcoran, Quinn et al. 2005)

➢ Avantages des méthodes génétiques par rapport aux méthodes traditionnelles (Cockerill 1999; Sundsfjord, Simonsen et al. 2004)

La détection des gènes de résistance ne nécessite pas d'isoler le micro-organisme en culture pure. La possibilité de travailler directement sur les prélèvements (cliniques, animaux ou environnementaux) permet :

- Un gain de temps pour l'analyse, en particulier pour les campylobacters dont les conditions de croissance sont fastidieuses et lentes
- De détecter un mécanisme de résistance pour des micro-organismes qui ne sont pas cultivables avec les conditions de culture traditionnelles en laboratoire (par exemple sous forme viable non cultivable)
- De diminuer les risques pour le manipulateur qui n'est pas en présence d'une culture pure du micro-organisme

Les méthodes génétiques ne dépendent pas des conditions de culture des microorganismes. Elles permettent également la détection de mécanismes qui entrainent un faible niveau de résistance qui n'est pas toujours observable avec les méthodes phénotypiques. Enfin, elles fournissent une réponse claire : présence ou absence du déterminant génétique recherché. La lecture des résultats est facile et fiable et leur interprétation ne nécessite pas l'établissement de valeurs critiques qui peuvent varier d'un pays à l'autre.

➢ Inconvénients des méthodes génétiques

Les méthodes génétiques ne permettent de rechercher que les mécanismes de résistances qui sont déjà identifiés, la détection de l'émergence de nouveaux mécanismes n'est pas possible. « Avec les méthodes génétiques, on ne trouve strictement que ce que l'on cherche » (Cockerill 1999). De plus, tous les gènes impliqués dans la résistance ne sont pas connus.

Les techniques utilisées peuvent entraîner des résultats faussement négatifs :

- Une mutation sur le site de fixation des amorces peut empêcher l'amplification du gène cible

- Des inhibiteurs de la polymérisation peuvent être présents et empêcher la synthèse de l'amplicon
- La sensibilité des méthodes génétiques est liée au nombre de micro-organismes initialement présents.

De même, des faux positifs sont parfois observés :

- La présence d'un gène n'entraîne pas nécessairement son expression et les mutations sur les gènes de régulation ne sont pas détectées (sauf si l'amplification porte sur l'ARNm)
- La spécificité de la technique peut être altérée par la contamination de l'échantillon par des acides nucléiques ou des résidus des acides nucléiques précédemment traités.

Enfin, à la différence des méthodes traditionnelles pour lesquelles des standards sont publiés pour la préparation des milieux, les paramètres d'incubation des micro-organismes et l'interprétation des résultats obtenus, il n'y a pas de standard pour les méthodes génétiques.

➢ Intérêt complémentaire des méthodes génétiques par rapport aux méthodes phénotypiques

Les méthodes génétiques permettent de confirmer l'existence de mécanismes de résistance spécifique et d'un point de vue épidémiologique, d'analyser la dissémination de pathogènes spécifiques résistants ou de déterminants de résistance. En fonction des objectifs d'étude retenus, l'une ou l'autre de ces méthodes d'étude peut être choisie, mais elles restent complémentaires.

## 6.3 Mécanismes de résistance aux antibiotiques décrits chez campylobacter

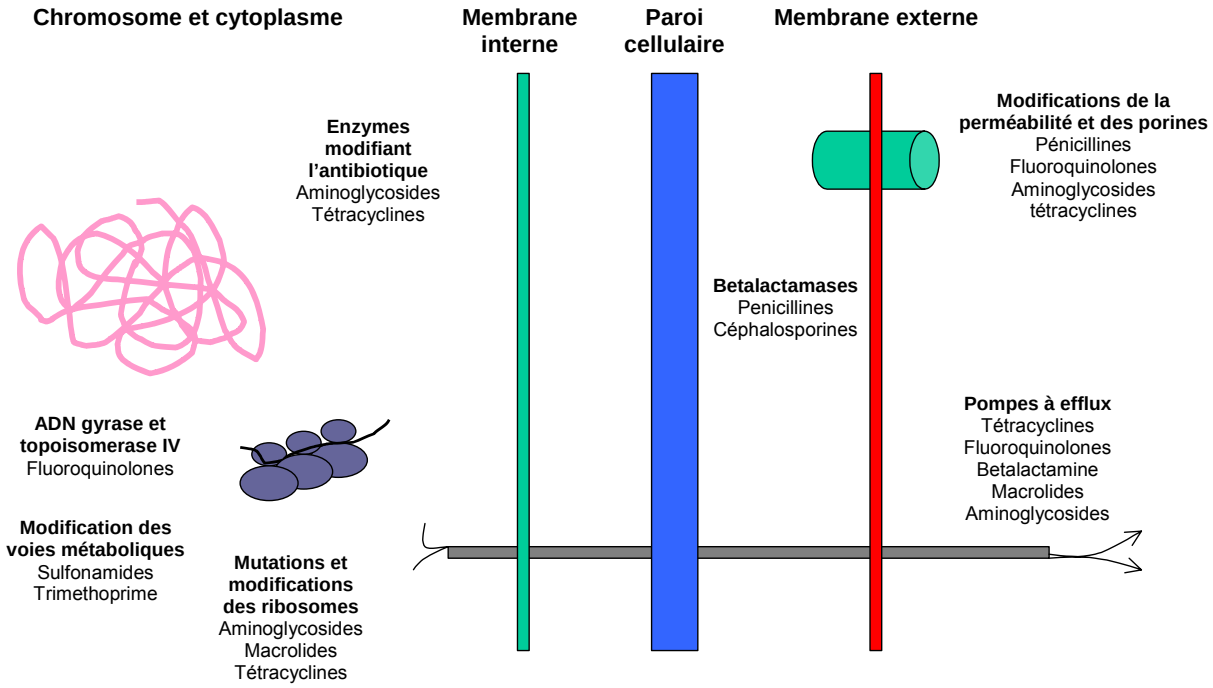
### 6.3.1 Résistances intrinsèques

Lors de résistance intrinsèque, toutes les souches d'une même espèce sont résistantes. Les campylobacters sont naturellement résistants aux antibiotiques suivants :

- Vancomycine
- Bacitracine
- Novobiocine
- Colimycine
- Streptogramine B
- Triméthoprime

*C. jejuni* et *C coli* sont également résistants à la céphalotine et à la rifampicine. Ces antibiotiques sont utilisés dans divers milieux sélectifs d'isolement de ces bactéries. Ces résistances naturelles sont probablement imputables à l'incapacité de ces antibiotiques à traverser la membrane externe (Federighi 1999). Les mécanismes de résistance intrinsèque sont peu connus (Taylor and Courvalin 1988).

**Figure 8. Mécanismes de résistance aux antibiotiques d'après Sundsfjord, Simonsen et al. (2004)**



### 6.3.2 Résistances acquises

Les résistances acquises résultent de l'acquisition de nouveaux mécanismes par la bactérie qui la rendent résistante à l'antibiotique considéré. L'acquisition de ces mécanismes repose soit sur des mutations ponctuelles soit sur l'acquisition de matériel génétique exogène ( plasmides de conjugaison, transposons, intégrons). La résistance acquise aux antibiotiques chez campylobacter repose sur 3 mécanismes (figure 8):

- la synthèse d'enzymes dégradant les types de molécules d'antibiotiques,
- des modifications structurales des sites de liaisons de l'antibiotique dans la cellule bactérienne,
- une diminution de la perméabilité cellulaire, soit par une diminution de l'entrée des autres molécules d'antibiotiques, soit par une augmentation de leur efflux.

Très souvent, ces mécanismes de résistance sont combinés et modulent l'intensité de la résistance observée.

#### 6.3.2.1 Résistance aux bêta-lactamines

La membrane externe semble jouer un rôle important dans la résistance des campylobacter aux bêta-lactamines en tant que barrière imperméable. Environ 92% de *C. jejuni* et *C. coli* produisent des bêta-lactamases. La résistance semble être chromosomique (Federighi 1999).

#### 6.3.2.2 Résistance aux fluoroquinolones

Les fluoroquinolones sont des formes chimiquement modifiées de l'acide nalidixique. Les cibles de ces antibiotiques sont deux enzymes bactériennes importantes lors de la réplication de l'ADN : l'ADN gyrase (type II isomérase) et l'ADN topoisomérase IV. L'inhibition de leur action conduit à l'arrêt de la croissance bactérienne. Les fluoroquinolones se complexent avec ces enzymes et empêchent la réplication de l'ADN. La résistance aux fluoroquinolones repose essentiellement sur une mutation de l'ADN codant pour la sous-unité GyrA de l'ADN gyrase. Un seul point de mutation en Thr-86, Asp-90 ou Ala-70 peut entraîner une résistance. La mutation en Thr-86 est la plus commune et elle est associée à un niveau plus élevé de résistance à l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine que les deux autres mutations (Taylor and Tracz 2005). Une seule mutation entraine un niveau de résistance élevé. Chez *C. jejuni,* l'efflux de la ciprofloxacine joue une part dans la résistance. L'opéron *cme*ABC code pour une pompe à efflux à large spectre qui contribue à la résistance intrinsèque de *C. jejuni* à de nombreux antibiotiques. En présence de ciprofloxacine, le blocage de la pompe CmeABC par un inhibiteur entraîne une accumulation intracellulaire de ciprofloxacine et augmente la sensibilité à différents agents anti-microbiens (Lin, Michel et al. 2002). Cependant, il semblerait que l'efflux ne joue qu'un rôle mineur dans la résistance aux fluoroquinolones (Payot, Cloeckaert et al. 2002).

#### 6.3.2.3 Résistance aux macrolides : l'érythromycine

Chez *C. jejuni*, la résistance à l'érythromycine semble principalement liée à une modification du site cible du ribosome sur la région 23S de l'ARNr (Taylor and Tracz 2005).

**Tableau 12. Mécanismes de résistance acquise aux antibitiotiques chez *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli***

| Famille d'antibiotique | Mécanisme d'action | Mécanisme de résistance | Support biochimique | Support génétique | Références |
|---|---|---|---|---|---|
| ß-lactamines | Inhibition de la synthèse du peptidoglycane bactérien | Dégradation enzymatique | • ß-lactamases<br>• diminution de la perméabilité membranaire | Gène porté par le chromosome bactérien | (Aarestrup and Engberg 2001)<br>(Avrain and Kempf 2000)<br>(Taylor and Courvalin 1988)<br>(Taylor and Tracz 2005) |
| Tétracycline | Inhibition de la synthèse protéique par liaison aux ribosomes | • Protection du site de fixation sur le ribosome<br>• Efflux actif<br>• (Dégradation de la tétracycline) | • Proteine de protection du ribosome<br>• pompe CmeABC | Gènes portés par un plasmide *Tet(0)* | (Taylor, Garner et al. 1983)<br>(Aarestrup and Engberg 2001)<br>(Pumbwe and Piddock 2002) |
| Macrolides | Inhibition de la synthèse protéique par liaison aux ribosomes | • Modification du site de fixation sur le ribosome<br>• Efflux actif | • Pompe CmeABC | Mutation sur le gène *23S ARNr* | (Aarestrup and Engberg 2001; Engberg, Aarestrup et al. 2001; Pumbwe and Piddock 2002; Mamelli, Prouzet-Mauleon et al. 2005; Gibreel and Taylor 2006; Payot, Bolla et al. 2006) |
| Aminoglycosides | Inhibition de la synthèse protéique par liaison aux ribosomes | Dégradation enzymatique | • Aminoglycosides phosphotranferases (APH)<br>• Aminoglycosides adenyltransferases (AAD ou ANT)<br>• Aminoglycosides acetyltranferases (AAC) | Gènes portés par<br>• le chromosome<br>• un plasmide<br>• un intégron sur le chromosome | (Aarestrup 2005)<br>(Gibreel, Skold et al. 2004)<br>(Lee, Sanchez et al. 2002)<br>(O'Halloran, Lucey et al. 2004) |
| Fluoroquinolones | Interaction avec le complexe ADN-ADN gyrase et la topoisolmérase IV | • Modification du site de fixation sur l'ADN gyrase<br>• Efflux actif | • CmeABC | Mutation sur les gènes<br>• *gyr*A, *gyr*B<br>• *par*C | (Engberg, Aarestrup et al. 2001; Pumbwe and Piddock 2002; Payot, Bolla et al. 2006) |

#### 6.3.2.4 Résistance aux tétracyclines

La résistance aux tétracyclines est liée aux gènes *tet*, qui peuvent s'échanger entre genres bactériens et qui codent soit pour des protéines d'efflux soit pour une protection du ribosome. Chez *C. jejuni*, les gènes *tet*(O) et *tet*(M) ont été identifiés. Ils sont portés sur des plasmides et la résistance repose sur une protection du ribosome. La protéine *tet*(O) entraîne un changement de conformation du ribosome qui empêche la fixation de la tétracycline ce qui permet la poursuite de la synthèse des protéines (Taylor and Tracz 2005).

Les principaux mécanismes identifiés chez campylobacter sont présentés dans le tableau 12.

## 6.4 Utilisation des antibiotiques chez la volaille

### 6.4.1 Objectifs de l'utilisation des antibiotiques chez la volaille

Les antibiotiques peuvent être utilisés de 3 façons différentes chez l'animal avec des objectifs variables, à titre préventif curatif, en métaphylaxie et en prophylaxie (Schwarz and Chaslus-Dancla 2001; Schwarz, Kehrenberg et al. 2001).

A titre curatif, les antibiotiques sont administrés aux animaux malades, et l'objectif est d'obtenir la guérison des animaux, ainsi que d'éviter la contamination humaine dans le cas des maladies zoonotiques. Dans les élevages avec un grand effectif, la métaphylaxie consiste à traiter les animaux cliniquement malades et les autres animaux du groupe qui n'expriment pas (encore) de signes cliniques. En fonction des modes d'élevage des animaux de rente, l'administration d'antibiotiques peut-être nécessaire pendant certaines périodes critiques pour limiter l'apparition de maladies bactériennes, par exemple lors du tarissement des vaches laitières ou le sevrage des porcelets. Ce mode de traitement correspond à l'antibioprophylaxie.

L'usage d'antibiotiques en tant qu'additifs en vue d'améliorer la croissance et les performances des animaux est banni depuis 2006 dans l'Union européenne.

Le plus souvent, les volailles sont élevées dans des bâtiments confinés, par troupeaux de 10 000 à 20 000 animaux pour les poulets, et de 5 000 à 10 000 pour les dindes. Dans ces conditions, seul le traitement de masse est envisageable (métaphylaxie), les traitements sont administrés par voie orale dans l'eau de boisson ou dans un aliment médicamenteux.

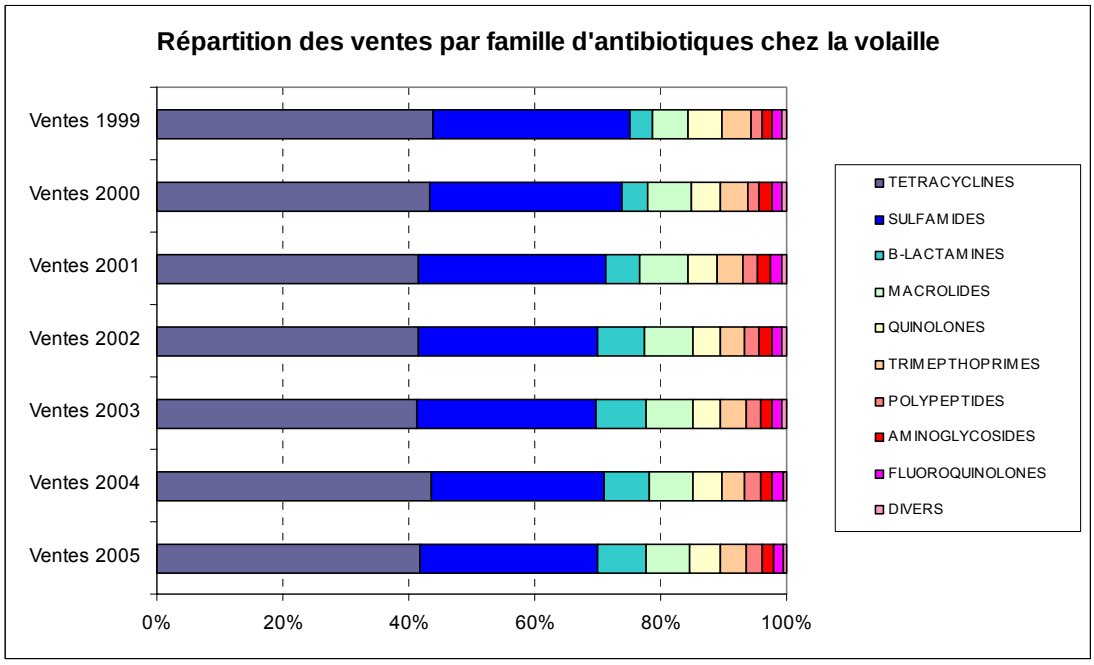
### 6.4.2 Molécules antibiotiques utilisées en élevage de volailles

Les antibiotiques utilisés en médecine humaine et vétérinaire appartiennent à différentes familles et sous-familles, communes à l'homme et à l'animal ; à l'exception de quelques sous-familles utilisées exclusivement en médecine humaine et d'une sous-famille propre à la médecine vétérinaire (sous-famille des pleuromutilines, macrolides apparentés) (Anonymous 2006). Aucun antibiotique appartenant aux céphalosporines ou aux phénicolés n'est autorisé pour les volailles. Les ß-lactamines sont utilisées pour des usages généraux : infections pulmonaires, infections digestives. Les macrolides ont un spectre d'activité étroit, ils sont notamment indiqués dans les infections pulmonaires à Gram positif ainsi que les mycoplasmoses respiratoires fréquentes en élevage de volailles. Les sulfamides sont indiqués dans des usages généraux comme les infections pulmonaires, les

**Tableau 13. Evolution des ventes d'antibiotiques chez les volailles de 1999 à 2005 (Anonymous 2006)**

| VOLAILLES | 1999 Tonnes | 2000 Tonnes | 2001 Tonnes | 2002 Tonnes | 2003 Tonnes | 2004 Tonnes | 2005 Tonnes |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| AMINOGLYCOSIDES | 1,83 | 2,23 | 2,12 | 2,26 | 1,77 | 1,77 | 1,62 |
| B-LACTAMINES | 4,06 | 4,66 | 5,56 | 7,91 | 7,63 | 7,08 | 7,31 |
| CEPHALOSPORINES | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| DIVERS | 0,80 | 0,87 | 0,78 | 0,88 | 0,65 | 0,58 | 0,45 |
| FLUOROQUINOLONES | 1,71 | 1,92 | 1,80 | 1,57 | 1,64 | 1,74 | 1,58 |
| FURANES | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| MACROLIDES | 6,35 | 8,16 | 7,86 | 8,26 | 7,45 | 6,89 | 6,54 |
| PHENICOLES | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| POLYPEPTIDES | 1,85 | 2,11 | 2,45 | 2,46 | 2,31 | 2,43 | 2,48 |
| QUINOLONES | 5,78 | 5,40 | 4,90 | 4,46 | 4,29 | 4,50 | 4,62 |
| SULFAMIDES | 34,44 | 35,35 | 30,92 | 30,18 | 27,93 | 27,39 | 27,22 |
| TETRACYCLINES | 48,12 | 50,43 | 43,34 | 44,09 | 40,60 | 43,51 | 40,01 |
| TRIMETHOPRIMES | 5,10 | 4,94 | 4,36 | 4,10 | 3,85 | 3,82 | 4,06 |
| **TOTAL** | **110,05** | **116,07** | **104,09** | **106,17** | **98,13** | **99,72** | **95,88** |

**Figure 9. Répartition des ventes par famille d'antibiotiques chez la volaille (Anonymous 2006)**



colibacilloses. Les tétracyclines sont les plus employées pour le traitement d'infections respiratoires ou digestives. Les quinolones et fluoroquinolones sont indiquées dans les infections digestives et pulmonaires. En théorie, les éleveurs et le vétérinaire sont tenus de remplir une fiche sanitaire d'élevage pendant toute la durée de vie du troupeau. Sur cette fiche doivent être signalés les différents traitements administrés aux volailles.

### 6.4.3 Quantité d'antibiotiques distribuée aux volailles

Chaque année, l'AFSSA et le ministère en charge de l'agriculture assurent un suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques, dont le rapport est consultable : http://www.afssa.fr/ftp/afssa/38901-38902.pdf . Les données présentées ici sont issues du rapport de 2005. Selon les déclarations des industriels, 1320 tonnes de principes actifs d'antibiotiques à destination des animaux ont été vendues. Les tétracyclines représentent plus de la moitié des ventes totales, et les 4 familles tétracyclines, sulfamides, ß-lactamines et les macrolides représentent plus de 80% du tonnage total d'antibiotiques vendus. En 2005, la part estimée des volailles par rapport au tonnage total d'antibiotique est de 7.27 %, soit de l'ordre de 96 tonnes. Le tableau 13 et la figure 9 présentent les quantités et les répartitions estimées par famille d'antibiotiques chez les volailles.

### 6.4.4 Relation entre l'utilisation des antibiotiques et la résistance aux antibiotiques des campylobacters isolés chez la volaille

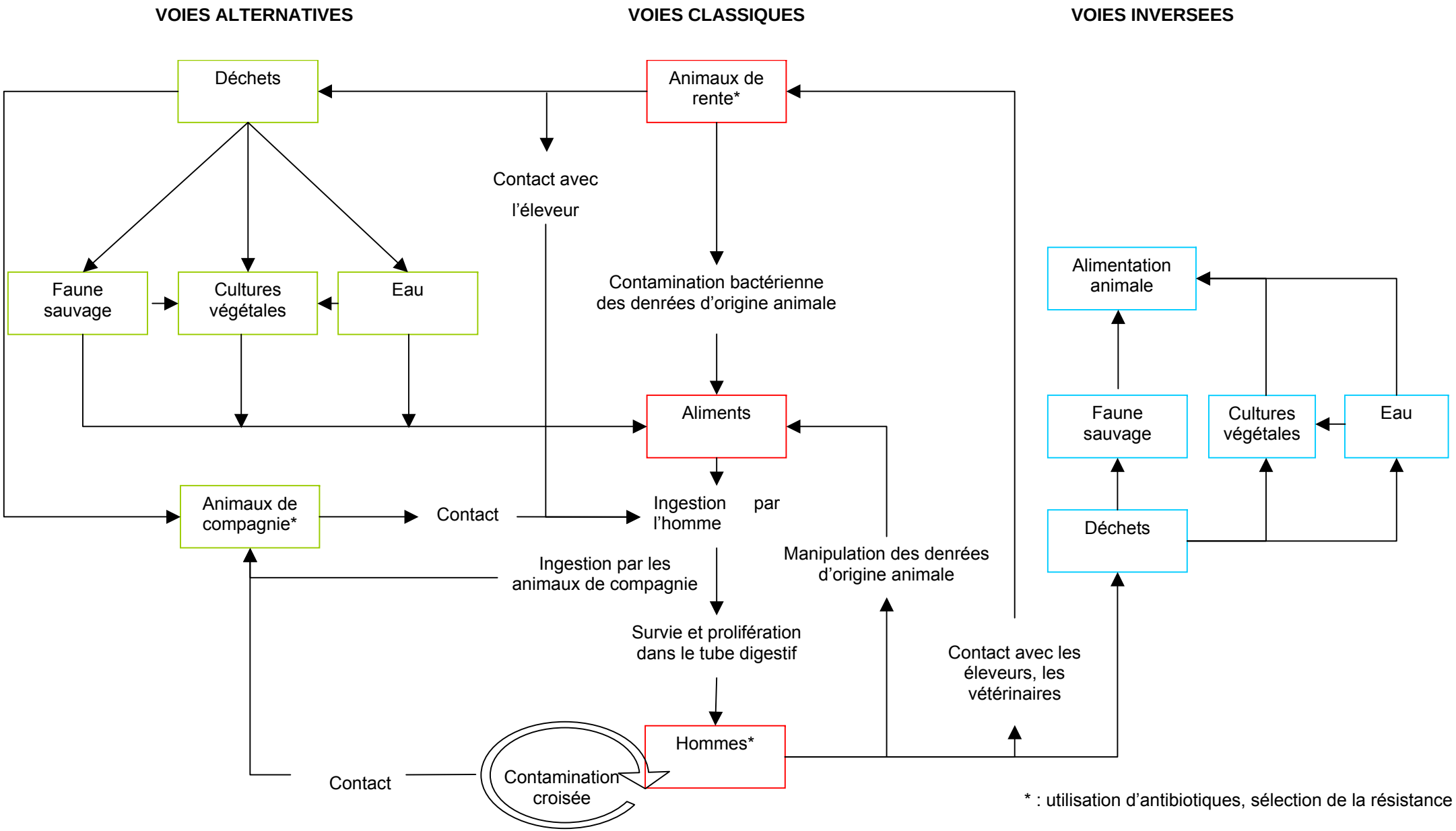
La relation entre l'usage des antibiotiques dans les élevages de volailles et la résistance aux antibiotiques chez les campylobacters isolés chez la volaille a été mise en évidence par trois types d'études (Anonymous 2006) :

- des études descriptives qui comparent l'évolution des taux de résistance des campylobacters à divers antibiotiques en fonction de leur mode d'utilisation dans la filière aviaire (études en conditions réelles)
- des études expérimentales avec la mise en œuvre d'essais cliniques,
- des études étiologiques par la réalisation d'essais cliniques sur le terrain en conditions réelles.

Certaines études ont montré que l'utilisation des antibiotiques chez la volaille sélectionne les souches de campylobacter résistantes à ces antibiotiques (Endtz, Ruijs et al. 1991; McDermott, Bodeis et al. 2002) (Gupta, Nelson et al. 2004). Cependant, la relation entre l'utilisation des antibiotiques et la résistance n'est pas toujours aussi simple, de nombreux facteurs influencent la sélection et la diffusion de l'antibiorésistance, et en particulier (Sanders 1999) :

- la population bactérienne concernée
  - la probabilité d'apparition d'une mutation dans cette population
  - l'influence de l'écosystème bactérien, les campylobacters commensaux dans le tube digestif des volailles ont une plus grande capacité à acquérir et échanger des plasmides porteurs de gènes de résistance
- les effets liés à la pharmacocinétique de l'antibiotique
- les effets liés aux traitements de la volaille : les doses utilisées et la durée du traitement, le nombre d'animaux traités, les pratiques d'élevage.

**Figure 10. Voies de transmission des bactéries, pathogènes ou non, sensibles et résistantes aux antibiotiques entre les animaux et l'homme d'après Phillips, Casewell et al. (2004)**



Ainsi, une étude (Lin, Yan et al. 2007) a mis en évidence que l'érythromycine utilisée à faible dose pendant une longue période (ce qui correspond à l'utilisation comme facteur de croissance) sélectionne les souches de campylobacter résistantes alors que la même molécule utilisée dans un but thérapeutique (et donc à une dose plus importante et pendant une courte période) ne sélectionne pas de souche résistante parce que le taux de mutation conduisant à la résistance à l'érythromycine est très faible chez campylobacter.

### 6.4.5 Relations entre la résistance aux antibiotiques chez les souches d'origine aviaire et les souches isolées chez l'homme

Les antibiotiques sont utilisés chez l'animal pour prévenir ou traiter des infections bactériennes. Chez la volaille, la résistance aux antibiotiques des entéropathogènes zoonotiques (c'est à dire principalement les campylobacters et les salmonelles) est d'autant plus dangereuse en terme de santé humaine que ces bactéries peuvent être transmises à l'homme par le biais de la chaîne alimentaire (van den Bogaard and Stobberingh 2000; McEwen and Fedorka-Cray 2002; Swartz 2002).

Dès 1976, dans une étude portant sur des poulets ayant reçu de la tétracycline dans l'alimentation, il a été observé un transfert de gènes de résistance entre les souches d'*Escherichia coli,* entre les poulets et l'homme (Levy, FitzGerald et al. 1976). Pour campylobacter et les fluoroquinolones, une étude néerlandaise (Endtz, Ruijs et al. 1991) a démontré en 1991 que l'émergence de la résistance aux fluoroquinolones d'isolats cliniques humains était reliée à l'utilisation de ces antibiotiques chez la volaille. L'utilisation des fluoroquinolones chez l'homme remonte aux années 80, ces molécules ont été introduites pour le traitement des infections de la volaille en 1987. Entre 82 et 85, aucune résistance aux fluoroquinolones n'a été mise en évidence chez des campylobacters d'origine humaine ou aviaire. Dans les années qui ont suivi l'introduction de ces molécules en élevage de volaille, les taux de résistance à la ciprofloxacine ont augmenté jusqu'à 11 et 14% respectivement chez l'homme et la volaille. Une étude aux Etats-Unis publiée en 2004 indique que les infections chez l'homme dues à des campylobacters résistants aux fluoroquinolones sont liées à la consommation de volailles colonisées par des souches résistantes plutôt qu'à la sélection de ces souches par le traitement antibiotique reçu par le patient (Iovine and Blaser 2004).

L'hypothèse du passage de la résistance aux antibiotiques des animaux à l'homme provient de l'observation de l'épidémiologie des zoonoses d'origine alimentaire, c'est à dire pour la volaille, les infections à campylobacters et à salmonelles. L 'épidémiologie de ces maladies est loin d'être simple car il y a de nombreuses autres sources et voies de contamination de l'homme que les denrées d'origine animale (Phillips, Casewell et al. 2004). Les différentes voies de transmission sont présentées dans la figure 10. Bien que l'origine alimentaire des infections à campylobacter résistante aux antibiotiques ne soit pas exclusive, plusieurs études attestent de la réalité de ce mode de transmission (Anonymous 2006). Dans ce contexte, pour campylobacter, les souches antibiorésistantes importantes sont les souches résistantes aux macrolides et aux fluoroquinolones.

**Tableau 14. Résistance de *C. jejuni* et *C. coli* isolés chez l'homme et les volailles de chair de 1999 à 2004 d'après (Gallay, Prouzet-Mauléon et al. 2007)**

| | *C. jejuni* | | *C. coli* | |
|---|---|---|---|---|
| Antimicrobial agent/year | Humans, no. (%) | Broilers, no. (%) | Humans, no. (%) | Broilers, no. (%) |
| Ampicillin | | | | |
| 1999 | 123 (42.3) | 297 (22.6) | 20 (70.0) | 96 (29.2) |
| 2000 | 189 (40.2) | 67 (31.3) | 35 (37.1) | 35 (31.4) |
| 2001 | 137 (47.4) | 61 (13.1) | 26 (53.8) | 44 (25.0) |
| 2002 | 184 (45.6) | 41 (29.3) | 43 (48.8) | 64 (28.1) |
| 2003 | 479 (46.1) | 46 (34.8) | 68 (28.1) | 60 (30.0) |
| 2004 | 438 (38.1) | 32 (28.1) | 88 (14.9) | 74 (24.3) |
| Erythromycin | | | | |
| 1999 | 123 (0.8) | 297 (0.3) | 20 (10.0) | 96 (31.3) |
| 2000 | 187 (3.2) | 67 (3.0) | 35 (8.6) | 36 (11.1) |
| 2001 | 136 (3.7) | 61 (4.9) | 26 (7.7) | 44 (4.5) |
| 2002 | 184 (2.7) | 40 (5.0) | 44 (9.0) | 64 (17.2) |
| 2003 | 478 (0.6) | 46 (4.3) | 68 (7.3) | 61 (31.1) |
| 2004 | 437 (1.4) | 32 (0.0) | 88 (12.5) | 74 (17.6) |
| Tetracycline/doxycycline | | | | |
| 1999 | 118 (23.7) | 297 (56.6) | 6 (25.0) | 96 (69.8) |
| 2000 | 188 (12.8) | 67 (55.2) | 35 (14.3) | 35 (60.0) |
| 2001 | 137 (9.5) | 61 (65.6) | 26 (26.9) | 45 (80.0) |
| 2002 | 184 (22.8) | 41 (67.5) | 43 (41.8) | 64 (84.4) |
| 2003 | 479 (26.7) | 46 (60.9) | 68 (63.2) | 61 (96.7) |
| 2004 | 438 (28.8) | 32 (40.6) | 88 (53.4) | 74 (71.6) |
| Ciprofloxacin/enrofloxacin | | | | |
| 1999 | † | 297 (16.8) | † | 96 (39.6) |
| 2000 | 185 (23.8) | 68 (23.5) | 35 (31.4) | 35 (28.6) |
| 2001 | 137 (21.9) | 61 (29.5) | 26 (34.6) | 45 (37.8) |
| 2002 | 184 (31.7) | 41 (31.7) | 44 (43.2) | 63 (41.3) |
| 2003 | 479 (25.9) | 45 (13.3) | 68 (38.2) | 61 (41.0) |
| 2004 | 438 (25.3) | 32 (9.4) | 88 (42.0) | 74 (32.4) |

Les souches de volailles en 1999 et 2000 ont été testées vis à vis de l'enrofloxacine, puis à partir de 2001 vis à vis de la ciprofloxacine.

### 6.4.6 Conséquences de la résistance aux antibiotiques des campylobacters sur les symptômes observés lors d'infection chez l'homme

Plusieurs études ont rapporté que les patients humains infectés par des souches de campylobacter résistantes aux fluoroquinolones présentaient une diarrhée prolongée, un risque plus élevé de maladie systémique et d'hospitalisation que les patients infectés par une souche sensible aux fluoroquinolones. (Engberg, Neimann et al. 2004; Iovine and Blaser 2004; Helms, Simonsen et al. 2005). Cependant, on ne sait pas si la sévérité des symptômes observés est liée à une augmentation de la virulence des souches résistantes aux fluoroquinolones ou à l'échec du traitement (Zhang, Sahin et al. 2006).

## 6.5 Plan de surveillance de la résistance aux antibiotiques chez campylobacter

### 6.5.1 Objectifs des plans de surveillance

Les objectifs des plans de surveillance sont triples :

- Etablir un état des lieux des niveaux de résistance de différents microorganismes d'intérêt et comparer des situations entre des régions ou entre des pays. Cette comparaison est rendue possible grâce à la standardisation des techniques mises en place et utilisées par les laboratoires participant à ces plans de surveillance.
- Evaluer l'efficacité de mesures qui ont pu être prises, comme par exemple l'arrêt des antibiotiques comme facteurs de croissance dans l'ensemble des pays de l'Union européenne.
- Suivre l'évolution de la résistance et éventuellement être capable de détecter des phénomènes de résistance émergents.

### 6.5.2 Plan de surveillance français de campylobacter

#### 6.5.2.1 Chez la volaille (poulet de chair)

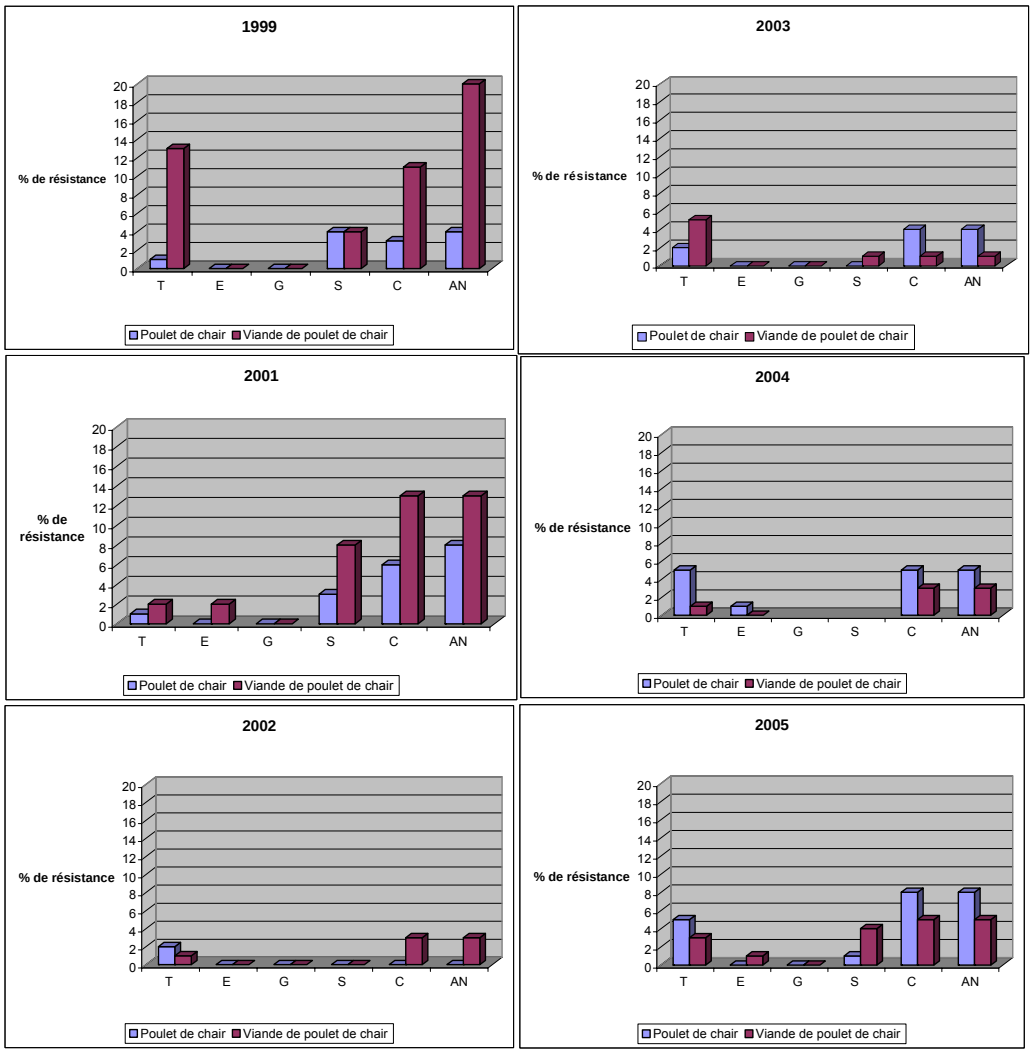
- Pourcentages de résistance observés

La résistance aux antibiotiques des campylobacters d'origine aviaire et porcine est surveillée par un plan de surveillance annuel, mis en place par la Direction générale de l'alimentation (DGAl) en 1999 pour les volailles et en 2000 pour les porcs (Anonymous 2006). Deux espèces de campylobacter sont surveillées : *C. jejuni* et *C. coli.* Les résistances aux antibiotiques qui font l'objet d'une surveillance sont celles vis à vis de l'ampicilline, l'acide nalidixique, la ciprofloxacine, la tétracycline, l'érythromycine et la gentamicine. La détermination des CMI des souches de campylobacter testées pour le plan de surveilance est réalisée au laboratoire de l'AFSSA de Ploufragan. Les souches de campylobacter testées proviennent de prélèvements de *caeca* à l'abattoir à partir d'isolement direct. Le classement des souches se fait à partir des valeurs critiques fournies par le CA-SFM. En 2004 (Hellard and Kempf 2005), les souches de *C. coli* sont plus résistantes que les souches de *C. jejuni* (test du $\chi^2$, $p<0.05$) pour l'acide nalidixique, la ciprofloxacine, la tétracycline et l'érythromycine. Une diminution de la résistance vis à vis de la ciprofloxacine est observée pour *C. jejuni* depuis 2001. Les *C. coli* montrent une forte diminution de la résistance à la tétracycline depuis 2003.

**Tableau 15. Fréquence de résistance de *C. jejuni* selon l'origine du prélèvement (animal à l'abattoir, viande provenant de commerce) prélevé chez la volaille (DANMAP 1999)**

| | Pourcentage de *Campylobacter jejuni* résistants | |
|---|---|---|
| **Antibiotique** | **Animal** | **Viande** |
| Tétracycline | 1 | 13 |
| Chloramphénicol | 0 | 0 |
| Érythromycine | 1 | 0 |
| Gentamicine | 0 | 0 |
| Ciprofloxacine | 3 | 11 |
| Acide Nalidixique | 4 | 20 |
| Nombre d'isolats | 69 | 93 |

**Figure 11. Comparaison des pourcentages de résistance de *Campylobacter jejuni* dans les prélèvements de poulets de chair (caeca) et de viande de poulet de chair d'après (DANMAP 1999; DANMAP 2001; DANMAP 2002; DANMAP 2003; DANMAP 2004; DANMAP 2005)**




T : tétracycline, E : érythromycine, G : gentamicine, C : ciprofloxacine, AN : acide nalidixique

Pour les deux espèces de campylobacter, les pourcentages de résistance les plus élevés sont pour la tétracycline et aucune résistance n'est observée pour la gentamicine. Les taux de résistance observés chez les poulets de chair depuis 1999 sont indiqués dans le tableau 14.

- Comparaison des pourcentages de résistance observés entre les isolats de *caeca* et de peaux de cou (Hellard and Kempf 2005)

En 2004, 55 souches de *C. jejuni* avait été isolées à partir de prélèvements de peaux de cou. Une comparaison des pourcentages de résistance observés entre les 32 souches isolées des *caeca* et les 55 souches isolées soit directement soit après enrichissement des peaux de cou ne montre pas de différence significative.

#### 6.5.2.2 Chez l'homme

En France, les infections à campylobacter sont surveillées par un réseau de laboratoires qui envoient leurs isolats au centre national de référence pour *Campylobacter* et *Helicobacter* (CNRCH). La sensibilité des isolats de campylobacter est déterminée pour 7 antibiotiques : acide nalidixique, ciprofloxacine (depuis 2000), érythromycine, amoxicilline, gentamicine, tétracycline et doxycycline (depuis 2003). Les résultats des plans de surveillance des souches isolées chez l'homme sont présentés dans le tableau 14.

### 6.5.3 Plans de surveillance européens

#### 6.5.3.1 Plan de surveillance de l'Union européenne

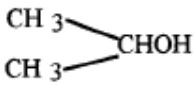
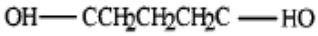
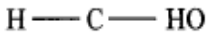
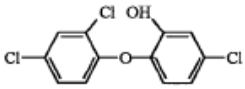
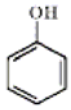
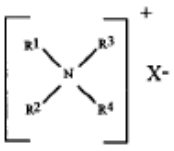
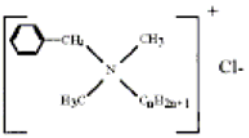
Actuellement, de nombreux états membres de l'Union européenne réalisent une surveillance de la résistance aux antibiotiques d'agents zoonotiques dont campylobacter. Selon la directive 2003/99/EC, les états membres doivent s'assurer que leur plan de surveillance fournit des données entre états membres comparables sur les pourcentages de résistance observés. En février 2007, un rapport de l'European food safety autority (EFSA) (Anonymous 2007) fournit un ensemble de précisions pour la réalisation de ces plans de surveillance nationaux : les antibiotiques retenus, les valeurs seuils à utiliser pour la classification des souches et les gammes de concentrations utilisées pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques de *C. jejuni* et *C. coli* isolés chez les poulets de chair. Les résultats obtenus permettront une surveillance de la résistance aux antibiotiques de campylobacter au niveau européen. Les antibiotiques testés pour campylobacter et les valeurs seuils retenus sont les valeurs proposées par l'EUCAST (voir tableau 10)

#### 6.5.3.2 Le plan de surveillance danois : DANMAP (Danish Integrated Antimicrobial resistance Monitoring and Research Program)

Le plan de surveillance et le programme de recherche sur la résistance aux antibiotiques a été mis en place par les ministères danois en charge de l'agriculture et de la santé. Les objectifs de ce programme sont :

- de surveiller la prévalence de la résistance aux antibiotiques,
- de surveiller la consommation d'antibiotiques (chez l'homme et chez l'animal)

**Tableau 16. Structures chimiques et utilisation des substances actives entrant dans la composition des désinfectants utilisés en industrie agro-alimentaire d'après McDonnell and Russell (1999)**

| Composé | | Formule chimique | Utilisation |
|---|---|---|---|
| Alcool | Éthanol | | Désinfection<br>Conservation |
| | Isopropanol |  | |
| Aldéhydes | Glutaraldéhyde |  | Désinfection<br>Conservation |
| | Formaldéhyde |  | |
| Biphenols | Triclosan |  | Conservation |
| Composés halogénés | Composés chlorés | ◇OCl-, HOCl, $Cl_2$ \| | Nettoyage<br>Désinfection |
| | Composés iodés | ◇$I_2$ \| | |
| Métaux lourds | Composés argentiques | Ag | Désinfection |
| | Composés mercuriques | Hg | Conservation |
| Peroxydes | Peroxyde d'hydrogène | $H_2O_2$ | Désinfection |
| | Ozone | $O_3$ | |
| | Acide peracétique | $CH_3COOOH$ | |
| Composés phénolés | phénol |  | Désinfection<br>Conservation |
| Ammoniums quaternaires | Structure générale |  | Nettoyage<br>Désinfection<br>Conservation |
| | Chlorure de benzalkonium |  | |

- de réaliser des recherches sur l'association entre l'utilisation des antibiotiques chez les animaux et l'homme et la prévalence de la résistance observée chez les animaux, dans les denrées d'origine animale et chez l'homme

Le Danemark a été le premier pays à mettre ne place ce type de surveillance, et les résultats obtenus permettent de suivre l'évolution de la résistance depuis 1995.

Le tableau 15 permet de comparer les fréquences de résistance observées chez les souches prélevées à l'abattoir (animal) et sur les denrées alimentaires durant l'année 1999 au Danemark. Les modalités de surveillance ne permettent pas de faire le lien entre les isolats obtenus à l'abattoir et ceux qui sont obtenus sur les denrées au niveau des commerces. On note toutefois des différences pour certains types de résistance chez *Campylobacter jejuni* (tétracycline, ciprofloxacine et acide nalidixique)

La figure 11 indique les histogrammes des pourcentages de résistance vis à vis des antibiotiques faisant l'objet d'un plan de surveillance de 1999 à 2004. Pour 2000, les données ne sont pas disponibles. A partir de 2001, la distinction est faite entre la viande de volaille produite au Danemark et celle qui est importée, et les chiffres rapportés dans cette figure ne prennent en compte que les résultats observés sur la viande de volaille produite au Danemark. De 1999 à 2002, les pourcentages de résistance observés dans la viande de volaille sont supérieurs à ceux observés sur les poulets de chair. Cette tendance s'inverse à partir de 2003.

# 7 Résistances bactériennes aux désinfectants

## 7.1 Définitions

➢ Nettoyage et désinfection

En industrie agroalimentaire, le **nettoyage** correspond à l'enlèvement des souillures, des résidus d'aliments, de la saleté, de la graisse ou de toute autre matière indésirable. La **désinfection** est la réduction au moyen d'agents chimiques ou de méthodes physiques du nombre de microorganismes présents dans l'environnement jusqu 'à l'obtention d'un niveau ne risquant pas de compromettre la sécurité ou la salubrité des aliments(AFNOR 1999).

➢ Désinfectants

Un désinfectant est un produit chimique qui détruit les microorganismes. Il est destiné à être utilisé sur les objets inanimés ou les surfaces. De nombreuses familles chimiques et leurs composés sont regroupés sous le terme de désinfectant. Dans l'industrie agroalimentaire, l'utilisation des désinfectants vise à éliminer les flores pathogènes et d'altération qui pourraient nuire à la santé du consommateur ou aux qualités organoleptiques du produit. Les principales molécules désinfectantes utilisées en industrie agro-alimentaire sont indiquées dans le tableau 16.

## 7.2 Mécanismes d'action des désinfectants

### 7.2.1 Mécanismes généraux

La compréhension des mécanismes d'action des désinfectants répond à plusieurs objectifs : tout d'abord, ils permettent la mise au point de solutions désinfectantes ayant une efficacité

**Figure 12. Sites d'action des molécules antiseptiques et désinfectantes selon les micro-organismes, d'après Cremieux, Freney et al. (1995).**

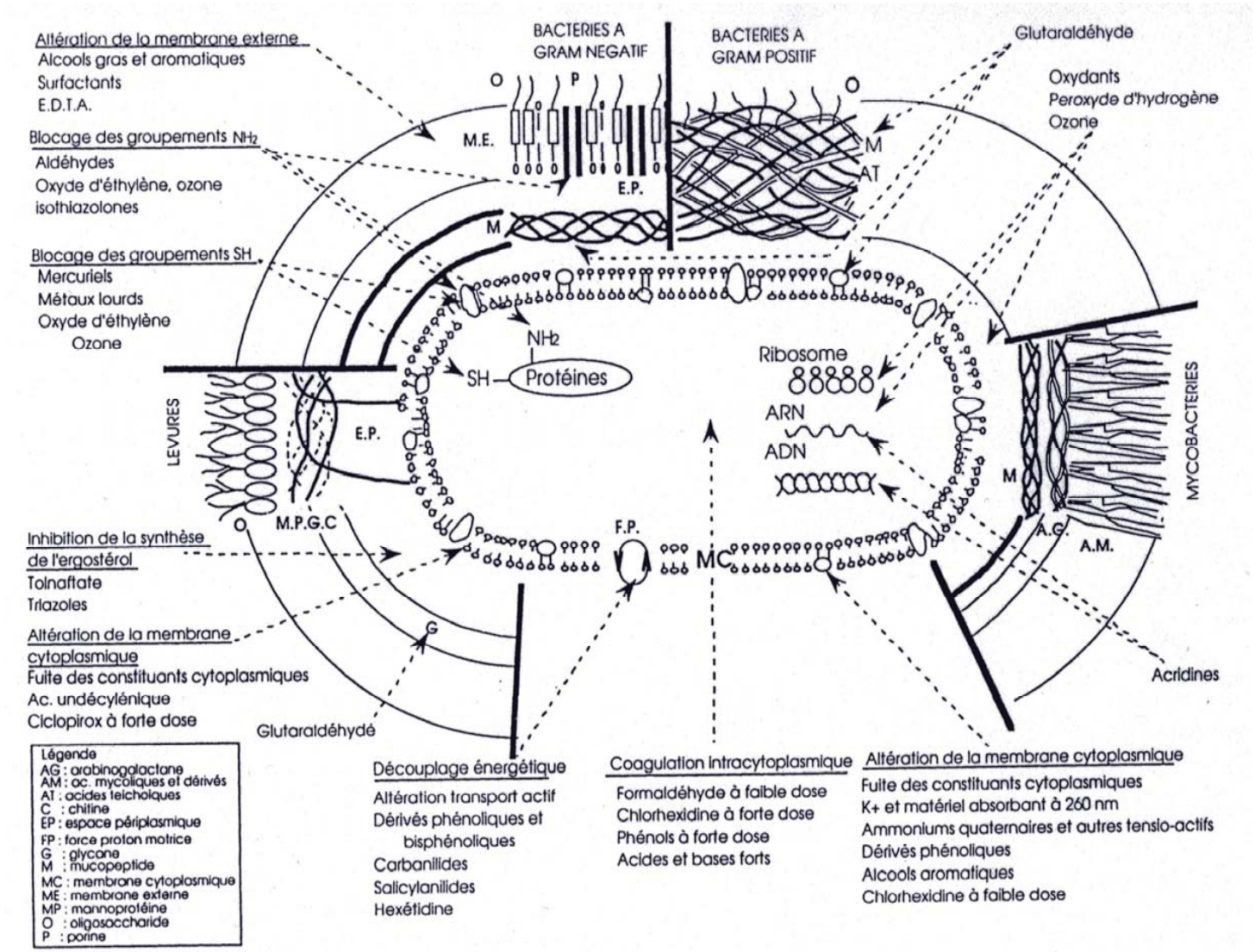



Figure 1 - Sites d'action des molécules antiseptiques et désinfectantes selon les micro-organismes

antimicrobienne améliorée, ensuite, ils participent à la prévention de l'émergence de la résistance bactérienne (Denyer and Stewart 1998; Maillard 2002).

Parmi les désinfectants, on trouve d'une part des composés très réactifs, ayant une action brutale, rapide, temporaire et souvent non spécifique dont des oxydants comme les produits chlorés et d'autre part des composés chimiquement stables, ayant une action plus spécifique, parmi lesquels les composés d'ammoniums quaternaires.

Le mode d'action des désinfectants est plus ou moins bien compris selon les molécules. Fleurette et *al*. (Fleurette, Freney et al.) proposent un mode d'action en cinq étapes:

1/ adsorption à la surface de la cellule suivie de la pénétration dans la paroi (gram positif) ou membrane externe (gram négatif) ;

2/ réactions complexes avec la membrane cytoplasmique, qui est le site d'action primaire, conduisant à sa désorganisation;

3/ sortie des composants de faibles poids moléculaires du cytoplasme;

4/ dégradation des protéines et des acides nucléiques;

5/ lyse de la paroi causée par les enzymes autolytiques.

La figure 12 présente les sites d'actions des désinfectants en fonction des types de micro-organismes.

### 7.2.2 Mécanisme d'action des ammoniums quaternaires

Les composés d'ammoniums quaternaires (QAC : quaternary ammonium compound) sont des tensio-actifs cationiques. Ce sont les désinfectants les plus utilisés en industrie agroalimentaire. Ils s'adsorbent facilement aux surfaces cellulaires. Le site d'action des QAC est la membrane plasmique. Très rapidement, suite à l'adsorption des molécules d'ammoniums quaternaires, la membrane plasmique se désorganise pour aboutir à une lyse et donc à la mort de la cellule bactérienne (McDonnell and Russell 1999).

### 7.2.3 Mécanisme d'action des produits chlorés

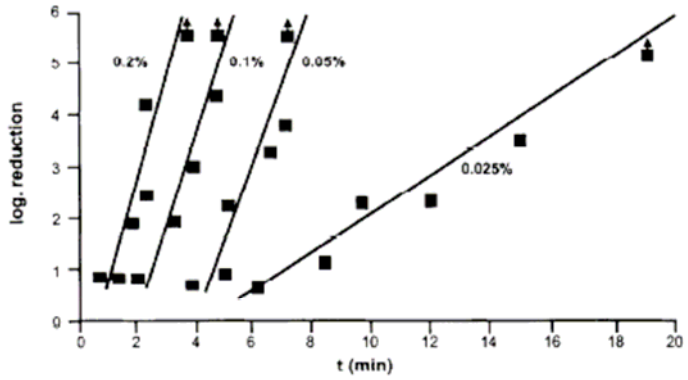
Leur mode d'action est encore mal compris. Ils agissent sur les diverses enzymes de la paroi et de la membrane cellulaire et au niveau du cytoplasme par oxydation des groupements thiols, ayant pour résultat une destruction des protéines et des acides nucléiques (McDonnell and Russell 1999; Beumer, Bloomfield et al. 2000).

## 7.3 Facteurs influençant l'efficacité des désinfectants

### 7.3.1 Concentration et temps de contact

La figure 13 montre la relation entre le temps de contact avec le désinfectant et la réduction logarithmique sur le micro-organisme *Candida albicans.* Le désinfectant utilisé est un composé halogéné. Une augmentation de la concentration en désinfectant diminue le temps de contact nécessaire pour obtenir la même réduction logarithmique en microorganisme et réciproquement.

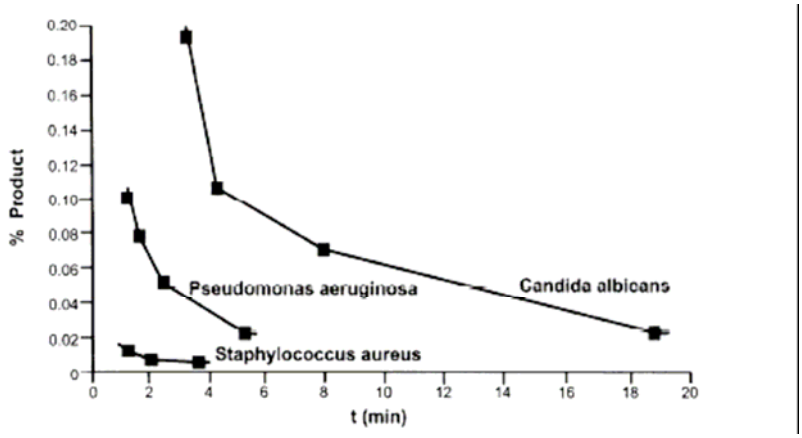
**Figure 13. Activité d'un composé halogéné sur *Candida albicans* d'après Bessems (1998)**




Méthode : Test en suspension CEN

Conditions du test : eau non dure et pas d'ajout de protéine (albumine sérique bovine)

**Figure 14. Activité d'un composé halogéné sur différents microorganismes d'après Bessems (1998)**




Méthode : Test en suspension CEN

Conditions du test : eau non dure et pas d'ajout de protéine (albumine sérique bovine)

### 7.3.2 Le type de microorganisme

Le même type d'expérience que celui présenté sur la figure 13 peut être reproduit pour différents types de microorganismes. Les résultats obtenus permettent de définir le spectre d'activité du désinfectant. Sur la figure 14, la relation temps-concentration nécessaire pour obtenir une réduction de 5 logarithmes est donnée pour *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*. On peut voir sur cette figure que le composé halogéné a une faible activité sur *Candida albicans* : concentration élevée et temps long, et par contre qu'il tue *Staphylococcus aureus* à une concentration relativement faible et en un temps plus court.

Ces résultats indiquent que le type de micro-organisme visé est un paramètre très important dans le choix de la molécule désinfectante, sa concentration et le temps de contact.

### 7.3.3 Importance du nettoyage

Les molécules désinfectantes sont des composés chimiques qui réagissent avec les molécules organiques présentes dans le milieu dans lequel elles sont appliquées. Les désinfectants doivent donc être appliqués sur des surfaces nettoyées auparavant, c'est-à-dire débarrassées des résidus de matière organique.

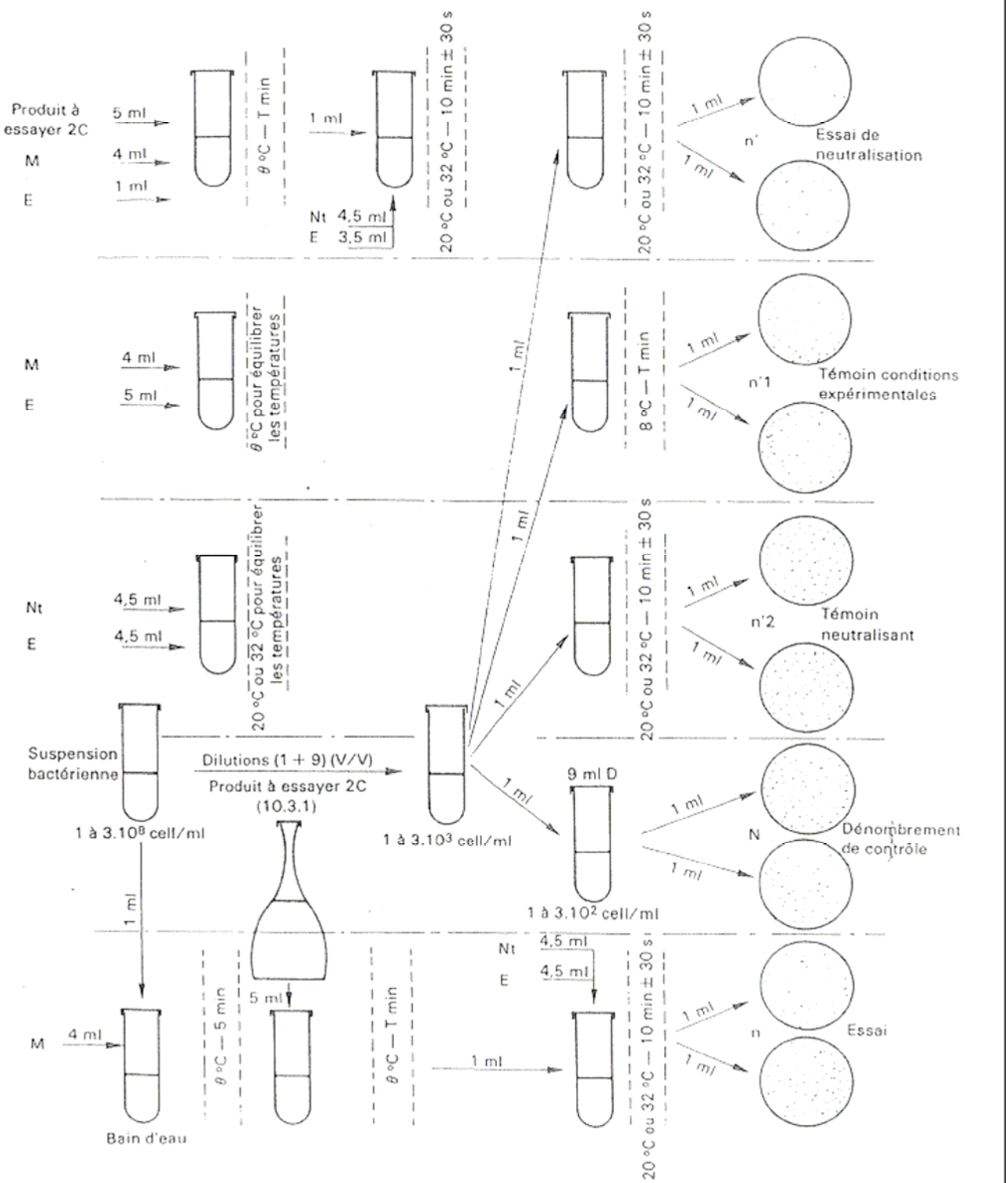
## 7.4 Définition de la résistance aux désinfectants

### 7.4.1 Résistance, sensibilité diminuée, moindre sensibilité

La terminologie et la méthodologie relatives à la résistance aux biocides dérivent des travaux réalisés sur les antibiotiques et on retrouve une tendance à extrapoler des antibiotiques aux désinfectants, sans considérer les différences fondamentales qui existent entre leur mécanisme d'action et les méthodes utilisées pour évaluer leur efficacité. Dans le contexte des antibiotiques, la résistance se réfère à la prévision du succès ou de l'échec thérapeutique. Dans le cas des désinfectants, il n'y a pas de situation clinique, il semble donc préférable d'utiliser les termes de « diminution de la sensibilité » ou de « sensibilité moindre ». Ce terme de « moindre sensibilité » est fréquemment retrouvé dans les études portant sur la sensibilité des bactéries aux désinfectants (McDonnell and Russell 1999; Beumer, Bloomfield et al. 2000; Langsrud, Singh Sidhu et al. 2003).

Comme pour les antibiotiques, plusieurs définitions de la résistance aux désinfectants sont retrouvées dans la littérature, elles font référence à une population et à une méthode d'étude. Le seuil choisi est lié à la méthode d'étude. La résistance peut être définie comme la capacité temporaire ou permanente d'un microorganisme et de sa descendance à rester viables et/ou à se multiplier dans des conditions qui pourraient détruire ou inhiber d'autres souches de la même espèce (Cloete 2003). Cette définition est liée à la mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI). D'autres auteurs (Gilbert and McBain 2003) définissent la résistance comme l'insensibilité relative d'un microorganisme à un désinfectant dans les conditions utilisées en pratique. Il s'agit alors d'une résistance « de terrain » qui peut être étudiée par rapport à la CMB nécessaire pour obtenir un effet visible sur la population bactérienne. Comme pour les antibiotiques, la définition que l'on donne de la résistance est liée à la technique d'étude choisie (CMI ou CMB) (Sidhu, Sorum et al. 2002).

**Figure 15. Essai en suspension pour l'évaluation de l'efficacité bactéricide d'un produit selon la norme AFNOR NFT 72-300**




C = Concentration bactéricide maximale prévue
Nt = Neutralisant à double concentration
M = Milieu de suspension (7.5)
D = Diluant (7.3)
E = Eau (7.1)

### 7.4.2 Pseudo-résistance, adaptation et tolérance

- La pseudo-résistance est une résistance qui est liée à une mauvaise utilisation en pratique du désinfectant, c'est à dire un non respect par l'utilisateur des conditions d'utilisation (spectre d'activité, concentration, température, temps de contact, pH, présence de matière organique). Une pseudo résistance peut également être liée à la nature de la surface à traiter : inaccessibilité ou nature du matériau qui ne permet pas le maintien du désinfectant à sa surface (Heinzel 1998).
- L'adaptation, le plus souvent, fait référence à une résistance qui est entraînée par les conditions du biotope. Ce phénomène peut être provoqué au laboratoire par des cultures successives des bactéries dans des milieux contenant des concentrations de plus en plus importantes de désinfectant. Le phénomène d'adaptation est en général réversible et disparaît quand le désinfectant n'est plus présent dans le milieu
- En raison du manque de standardisation de la définition de la résistance aux désinfectants, le terme de tolérance peut être utilisé à la place du terme de résistance (Anonymous 2007).

## 7.5 Méthodes d'études de la résistance aux désinfectants

Les méthodes d'évaluation des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (respectivement CMI et CMB) sont utilisées pour mettre en évidence des résistances aux désinfectants chez les bactéries (Wang, Powers et al. 1983; Bloomfield 2002; Trachoo and Frank 2002; Chapman 2003; Gilbert and McBain 2003).

### 7.5.1 Mesure de la concentration minimale bactéricide (CMB)

Dans le cadre de l'obtention des AMM (autorisation de mise sur le marché) pour les désinfectants utilisés en industrie agroalimentaire et en élevage (Loi du 22 décembre 1972) l'activité bactéricide du produit est appréciée par des essais, selon des normes standardisées AFNOR (Association française de normalisation ) ou CEN (Centre européen de normalisation). Le schéma opératoire d'une de ces normes est fourni en figure 15. Ce test d'efficacité détermine une concentration minimale bactéricide (CMB) qui est définie comme la plus faible concentration de désinfectant qui permet de réduire d'au moins $10^5$ fois le nombre de bactéries, appartenant à des souches identifiées d'espèces microbiennes, mises en suspension dans un milieu liquide, et dans des conditions de temps et de température choisies et précisément définies (norme AFNOR NFT 72-300). La standardisation porte sur *l'inoculum* bactérien, la dureté de l'eau, les conditions de propreté ou de saleté (simulées par l'ajout d'albumine bovine dans la suspension) et le temps de contact.

En fonction de la méthode, au cours de l'essai, le désinfectant peut être inactivé soit par une méthode de filtration, soit par l'ajout d'un neutralisant dans la suspension contenant les bactéries. La dose d'emploi du produit appliquée sur le terrain doit être au moins égale, sinon supérieure à la valeur de la CMB déterminée selon ces normes d'études. La CMB est à relier à l'efficacité du désinfectant et cette efficacité est exprimée en réduction logarithmique de la population bactérienne étudiée pendant un temps de contact fixé (Bessems 1998).

### 7.5.2 Mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

L'efficacité des antibiotiques est déterminée en mesurant leur CMI. La valeur obtenue a une signification concrète, puisqu'elle est peut être reliée aux concentrations plasmatiques et sériques du patient traité. L'action des antibiotiques est soutenue ou relayée par le système immunitaire du malade. Par contre, les désinfectants n'ont pas de système pour compléter leur action, ils ont en général des cibles cellulaires multiples, l'objectif étant d'obtenir une mort cellulaire rapide. Dans le cas des désinfectants, la mesure de la CMI est adaptée pour évaluer les phénomènes de moindre sensibilité, ayant lieu à des concentrations inférieures à la CMB. Cette situation peut se produire au cours de la désinfection dans les abattoirs si le désinfectant est sous-dosé ou dilué par l'eau de rinçage. En effet, ces phénomènes de moindre sensibilité peuvent être liés, entre autres, à la présence de pompes à efflux dont le fonctionnement est masqué aux concentrations utilisées pour la détermination de la CMB. La CMI correspond à la plus faible concentration de désinfectant qui ralentit ou inhibe la croissance bactérienne, après un temps de contact de 24 à 48 h (fonction des temps de croissance des bactéries). Les méthodes CMI utilisées sont les mêmes que celles qui sont employées pour les antibiotiques ; mais contrairement aux antibiotiques, les méthodes d'étude de la CMI pour les désinfectants ne sont pas standardisées.

### 7.5.3 Difficultés de l'étude de la résistance des bactéries aux désinfectants

#### 7.5.3.1 Facteurs influant sur l'efficacité des désinfectants

La mesure de l'efficacité d'un désinfectant repose sur la détermination de la CMB. Ce test est standardisé et il est difficile de standardiser au laboratoire les conditions d'application des désinfectants en pratique. L'extrapolation des résultats observés au laboratoire est donc délicate.

- Influence de l'*inoculum* bactérien :
  - pour chaque essai, la concentration de départ en bactérie (mesurée en UFC/ml) est déterminée, afin de pouvoir effectivement calculer une réduction de 5 logarithmes. Cependant, les bactéries dans leur état naturel sont très rarement en suspension, et sont le plus souvent attachées aux surfaces. Des tests utilisant des petits coupons d'inox sur lesquels sont fixées des bactéries ont été décrits et les résultats montrent que l'efficacité des désinfectants est diminuée lorsque les cellules bactériennes sont fixées sur une surface (van Klingeren, Bloomfield et al. 1998). Par contre, à la suite d'un brossage (qui mime le nettoyage dans les conditions pratiques d'utilisation), les bactéries sont remises en suspension, et les taux de réduction sont plus élevés que ceux observés sur les bactéries fixées.
  - Le stade physiologique des bactéries devrait également être pris en compte. La vision de l'activité des bactéries est biaisée par les cultures pures de clones uniques, qui ne sont pas représentatives de la situation des bactéries dans leurs biotopes naturels. Dans la nature, les populations bactériennes sont mixtes et chacune des sous-populations a une place définie (McDowell 2004).
  - Pour les tests d'efficacité des désinfectants, les bactéries sont testées au moment de la phase stationnaire de leur croissance après culture dans un milieu « riche », or à l'état naturel, la plupart du temps, les bactéries sont dans des conditions qui ne sont pas favorables. Par

exemple, dans les abattoirs de volailles, les bactéries sont soumises à de nombreux stress (thermiques, chimiques, osmotiques) et leur état ne correspond pas à l'état des bactéries en fin de phase exponentielle ou au début de phase stationnaire. Il a été démontré que des modifications des conditions de croissance des bactéries ou de leur stade de croissance avaient un impact sur leur résistance (Langsrud, Singh Sidhu et al. 2003).

- Standardisation des paramètres des essais d'efficacité
  - Les tests d'efficacité des désinfectants sont réalisés au laboratoire à température constante de 20°C. Cette température est beaucoup plus élevée que celle observée dans les abattoirs de volailles. Dans les zones d'abattage, la température est en général inférieure à 20°C et dans les zones de découpes, la température est maintenue à 4°C.
  - Les conditions de propreté sont mimées par l'ajout d'albumine sérique bovine. En conditions de « propreté », la concentration finale en albumine bovine est de 0,3 g/l, en conditions de « saleté », la concentration finale est de 3 g/l. Ces deux standardisations permettent d'évaluer la perte d'efficacité du désinfectant dans des conditions qui se rapprochent de celles observées sur le terrain, car le nettoyage réalisé en IAA ne permet pas d'éliminer tous les résidus de matière organique.
  - Le type de neutralisant et le mode de neutralisation ont également une influence sur l'efficacité mesurée du désinfectant (Langsrud and Sundheim 1998).
  - Enfin, les mesures d'efficacité ne sont réalisées que sur des souches de collection, des souches « types », or il est démontré que pour certaines espèces bactériennes, la sensibilité observée (mesurée par la CMI ou la CMB) peut varier d'une souche à l'autre (d'un facteur 5 à 50) (Heinzel 1998; Langsrud and Sundheim 1998).

#### 7.5.3.2 Influence des désinfectants sur les milieux de culture et la croissance bactérienne

- Les molécules désinfectantes interagissent avec les molécules organiques. Dans le cas des essais de mesure de CMI où le désinfectant est mélangé au milieu de culture (liquide ou gélosé), la quantité de désinfectant encore efficace après le mélange n'est pas connue. En interagissant avec les molécules organiques, le désinfectant modifie le pH et la nature des composés présents dans le milieu. Le milieu de culture n'est donc plus favorable à la croissance bactérienne et on ne sait pas alors si l'absence de croissance correspond à une inhibition liée à la présence du désinfectant ou à une absence des conditions nécessaires (Langsrud, Singh Sidhu et al. 2003).
- Le milieu de croissance utilisé pour les mesures de CMI peut également avoir une influence sur la sensibilité observée des souches au désinfectant. Une étude a démontré que lors de tests réalisés en suspension, les cellules de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Staphylococcus aureus* étaient significativement plus sensibles aux désinfectants testés que les mêmes bactéries cultivées en milieu gélosé (Brill, Goroncy-Bermes et al. 2006).

## 7.6 Mécanismes de résistance bactérienne aux désinfectants

Les bactéries résistantes peuvent être sélectionnées lorsqu'elles sont mises en contact avec des concentrations sublétales de produits désinfectants. La fréquence de cette situation est probablement

sous-estimée car dans les conditions pratiques, les bactéries peuvent être au sein de biofilms, le désinfectant peut être partiellement inactivé par des substances présentes dans le milieu (persistance de matières organiques suite à un nettoyage imparfait), ou des conditions d'utilisation du désinfectant non respectées (pH, température, temps de contact). Un rinçage insuffisant des surfaces traitées peut également entraîner la présence de désinfectant à des concentrations sublétales et entraîner une exposition des bactéries présentes dans le milieu extérieur à ces concentrations.

### 7.6.1 Résistance intrinsèque des différents groupes bactériens

La résistance des micro-organismes aux désinfectants est dite intrinsèque lorsque toutes les souches de l'espèce considérée sont résistantes au désinfectant testé. Ces observations conditionnent le spectre d'activité du désinfectant. Parmi les bactéries, les bactéries à coloration de Gram négative sont en général relativement moins sensibles que les bactéries à coloration de Gram positive parce que la paroi bactérienne (membrane externe) joue un rôle de barrière qui limite l'entrée dans la cellule de nombreux agents antimicrobiens (Sidhu, Sorum et al. 2002).

### 7.6.2 Mécanismes de résistance acquise aux désinfectants

#### 7.6.2.1 Généralités sur les mécanismes de résistance acquise

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, les conditions environnementales sont très importantes pour l'efficacité des désinfectants et en particulier l'état physiologique des bactéries (c'est à dire leur stade de croissance), leur interaction avec les surfaces, leur présence au sein d'un biofilm, la production de mucus, la présence de matière organique ou d'autres micro-organismes. En fonction de ces conditions, les bactéries sont capables de survivre à la désinfection dans les environnements agroalimentaires même si leur CMI mesurée au laboratoire est plus faible que la concentration d'utilisation du désinfectant (Sidhu, Sorum et al. 2002).

Une résistance bactérienne aux désinfectants a été rapportée pour les composés iodés, les ammoniums quaternaires, les peroxydes, les composés phénols, les composés chlorés et le glutaraldéhyde. Les conséquences de cette résistance sont sanitaires (santé humaine et santé animale) et économiques.

Les substances antibactériennes sont très nombreuses, mais elles ont un nombre limité de mode d'action et les bactéries n'ont finalement développé qu'un nombre limité de stratégies pour résister. La résistance peut résulter d'une mutation, de l'acquisition de nouveaux gènes par un transfert horizontal, de l'expression de gènes auparavant silencieux. Les stratégies disponibles pour les cellules isolées sont (Heinzel 1998; McDonnell and Russell 1999; Sidhu, Sorum et al. 2002; Chapman 2003) :

- Des modifications des sites d'action, cibles des désinfectants dans la cellule bactérienne
- L'inactivation des molécules désinfectantes par un inhibiteur (le plus souvent des enzymes comme les peroxydases)
- La réduction de la concentration intracellulaire de la molécule désinfectante soit en diminuant la perméabilité de la membrane soit en augmentant les mécanismes d'efflux.

**Tableau 17. Occurrences sur Pubmed des références portant sur différents genres bactériens et les mots-clé « désinfectant » ou « biocide »**

| Mot-clé | *Salmonella* | *Listeria* | *Escherichia coli* | *Pseudomonas* | *Campylobacter* |
|---|---|---|---|---|---|
| Disinfectant | 509 | 122 | 1448 | 1264 | **28** |
| Biocide | 486 | 120 | 1407 | 1220 | **26** |
| Disinfectant or Biocide | 522 | 124 | 1480 | 1278 | **29** |

#### 7.6.2.2 Mécanismes de résistance aux composés d'ammoniums quaternaires

La résistance aux ammoniums quaternaires est la résistance qui a été la plus étudiée. Deux mécanismes ont été identifiés : des pompes à efflux et des modifications de la membrane plasmique.

- Les pompes à efflux

La majorité des souches résistantes aux composés d'ammoniums quaternaires (résistance mesurée par rapport à leur CMI) présentent une ou plusieurs pompes à efflux (Heir, Sundheim et al. 1995; Sudheim, Langsrud et al. 1998; Heir, Sundheim et al. 1999; Heir, Sundheim et al. 1999). Ces pompes sont situées dans la membrane plasmique, fonctionnent avec l'énergie proto-motrice et appartiennent soit à la grande famille des protéines de transport soit à la famille des protéines de multirésistance (mdr). Un grand nombre de gènes codant pour ces pompes a été identifié à la fois chez des bactéries à gram positif (*qac*A, *qac*B, *smr*, *qac*G, *qac*H) et à gram négatif (*emr*E, *qac*E et *qac*E∆1) (Chapman 2003). Toutes ces pompes sont capables d'excréter activement les ammoniums quaternaires, ce qui conduit à une résistance plus ou moins élevée en fonction du type de pompe et de l'espèce bactérienne. Les gènes *qac*E et *qac*E∆1 ont été détectés sur des intégrons de bactéries à gram négatif. Ces éléments génétiques mobiles sont susceptibles d'être échangés entre bactéries de la même espèce ou d'espèces différentes.

- Modifications de la membrane plasmique

Un mécanisme de résistance partiel a également été démontré chez une souche de *Pseudomonas aeruginosa* adaptée aux ammoniums quaternaires par culture par passages répétés dans des milieux contenant des concentrations croissantes d'ammoniums quaternaires. Ce mécanisme repose sur une modification de la composition de la membrane plasmique montrant une diminution du taux d'acide palmitique et une augmentation des acides gras hydroxylés ainsi que de l'acide laurique. Cependant, dans ce cas, la sensibilité des souches est rapidement restaurée en l'absence d'ammonium quaternaire.

#### 7.6.2.3 Résistance aux désinfectants des bactéries dans les biofilms

Les populations bactériennes peuvent s'organiser sous la forme d'un biofilm. Cette structure induit une diminution de l'accès du désinfectant aux bactéries par différents moyens (Chapman 2003) :

- Les molécules de désinfectant réagissent avec les composés extracellulaires du biofilm (glycocalix)
- La structure du biofilm diminue la cinétique de diffusion au sein du biofilm

De plus, le gradient de nutriments et de toxiques diffusant au sein du biofilm entraîne des altérations phénotypiques, qui conduisent à l'observation au sein de la population du biofilm de phénotypes sensibles à résistants. Dans les biofilms, des bactéries présentant un phénotype résistant au sein des populations bactériennes sensibles sont nommées « persister » (Lewis 2005).

## 7.7 Résistance de campylobacter aux désinfectants

La résistance de campylobacter aux désinfectants a fait l'objet de très peu d'études comparativement aux autres bactéries isolées des denrées d'origine animale, pathogènes ou non pour l'homme. Le

tableau 17 indique le nombre de références trouvées sur Pubmed pour cette bactérie avec les mots clés « disinfectant » et/ou « biocide ». Le résultat est édifiant avec moins de 30 références pour campylobacter, alors qu'on en compte près de 1500 pour *Escherichia coli*.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer cet apparent « manque d'intérêt » de la communauté scientifique pour ce sujet. Les campylobacters sont des bactéries fastidieuses à cultiver au laboratoire, l'étude de la sensibilité des souches aux désinfectants est également difficile à réaliser, les méthodes d'étude des désinfectants sont peu nombreuses, parfois compliquées à mettre en oeuvre et les résultats difficiles à interpréter. En conséquence, les études de sensibilité ou de résistance aux désinfectants s'intéressent en premier lieu à des bactéries dont la culture est aisée.

De plus, les quelques études réalisées sur campylobacter semblent montrer une grande sensibilité aux désinfectants (Wang, Powers et al. 1983; Blaser, Smith et al. 1986; Trachoo and Frank 2002; Avrain, Allain et al. 2003) et la recherche de ce germe dans les industries agro-alimentaires après nettoyage et désinfection s'est toujours, jusqu'à recemment (Johnsen, Kruse et al. 2007), révélé infructueuse (Miwa, Takegahara et al. 2003; Borck and Pedersen 2005; Cools, Uyttendaele et al. 2005; Malakauskas, Jorgensen et al. 2006). Les conclusions de ces études conduisent à penser que les campylobacters sont globalement sensibles à l'action des désinfectants utilisés en industrie agroalimentaire.

# 8 Facteurs de modulation de la résistance aux antibiotiques

Il est évident que les antibiotiques et leur utilisation sont le pivot central de la sélection de la résistance bactérienne, mais la dissémination des gènes et des bactéries résistantes contribue au problème. La sélection de bactéries résistantes peut se produire pendant ou après un traitement antimicrobien, des résidus d'antibiotiques peuvent être retrouvés pendant de longues périodes après l'arrêt du traitement. En dehors des antibiotiques, il y a une quantité d'autres produits utilisés dans le but de détruire les bactéries et en particulier les biocides et les désinfectants ; ce qui conduit à reconsidérer notre perception de l'écologie microbienne, non seulement en terme de bactéries résistantes versus sensibles, mais également en terme de types de bactéries qui sont capables de survivre à ces traitements (Levy 2002; McDowell 2004).

## 8.1 Origine des gènes de résistance aux antibiotiques

Les déterminants génétiques de la résistance aux antibiotiques sont probablement apparus chez les organismes producteurs d'antibiotiques, chez lesquels ils jouent un rôle protecteur (Baquero, Negri et al. 1998; Alonso, Sanchez et al. 2001 ). De temps en temps, ces gènes ont été transférés aux bactéries voisines qui sont devenues résistantes. Par exemple, les gènes *otr*A et *otr*B confèrent la résistance à la tétracycline. Ils sont présents chez les mycobactéries mais également chez *Streptomyces rimosus*, qui est un champignon producteur de tétracyclines.

Cependant, tous les gènes de résistance aux antibiotiques n'ont pas été retrouvés chez les micro-organismes producteurs d'antibiotiques. Ceci est peut-être lié au fait qu'on estime que moins de 1% des espèces environnementales ont été isolées, et que par conséquent, les microorganismes porteurs de ces gènes n'ont pas encore été isolés. Néanmoins, il est possible que certains gènes de résistance

aux antibiotiques aient un rôle physiologique initial différent de la seule résistance aux antibiotiques et une autre hypothèse est alors que les bactéries voisines des organismes producteurs d'antibiotiques avaient, au cours de mutations aléatoires, modifié des gènes dont le rôle initial a été détourné pour des fonctions d'élimination ou de détoxication des antibiotiques (Baquero, Negri et al. 1998; Alonso, Sanchez et al. 2001 ). Dans le cas des bactéries non productrices d'antibiotiques, si tous les isolats d'une espèce bactérienne portent le (ou les ) même(s) gène(s) de résistance aux antibiotiques, on peut supposer que ces déterminants génétiques ont un rôle différent de la résistance aux antibiotiques, parce que les espèces non productrices d'antibiotiques ne sont pas en permanence sous la pression de sélection des antibiotiques dans l'environnement.

Par exemple, les ß-lactamases codées par le gène *Amp*C entraînent une résistance aux ß-lactamines chez les entérobactéries. Ce gène est présent dans toutes les espèces du genre, ce qui laisse supposer qu'il a été acquis avant la différentiation en espèce, des centaines de milliers d'années avant la découverte des antibiotiques. Il semblerait que les ß-lactamases auraient pour origine des transpeptidases impliquées dans la synthèse de la paroi cellulaire. Bien que leur rôle n'ait pas été démontré, les ß-lactamases pourraient être impliquées dans le métabolisme du peptidoglycane ou être des molécules ancestrales sans rôle clair dans le métabolisme bactérien. Quoiqu'il en soit, certains auteurs pensent que les gènes codant pour les ß-lactamases sont des gènes de ménage et que leur activité antimicrobienne est un à-coté de leur véritable activité physiologique (méconnue) (Alonso, Sanchez et al. 2001).

Certaines pompes à efflux impliquées dans la résistance aux antibiotiques semblent jouer un rôle dans les phénomènes de quorum sensing. *Pseudomonas aeruginosa* synthétise une quinolone naturelle qui participe au quorum sensing et le système d'efflux MexABOprM est capable d'excréter cette molécule. Il a été démontré que des souches de *P. aeruginosa* isolées dans l'environnement avant l'utilisation des quinolones (qui sont des antibiotiques de synthèse) sont capables d'excréter cette molécule. Il est possible que leur action d'efflux des quinolones soit un à-coté du rôle physiologique de cette pompe qui est en fait l'excrétion de cette molécule de quorum sensing. Ainsi, il est possible que les mutants qui portent ce déterminant génétique en grande quantité soient sélectionnés et renforcent le rôle de ces pompes comme déterminants de la résistance.

Ces différents gènes peuvent parfois être transmis à d'autres bactéries (pathogènes ou non). Une fois que ces gènes sont présents dans des bactéries hétérologues, ils ne sont plus sélectionnés pour leur rôle physiologique primaire et leur rôle se limite à l'antibiorésistance.

Ainsi, les gènes de résistance aux antibiotiques ont une origine environnementale, parfois comme mécanisme de résistance aux antibiotiques et parfois avec une fonction différente. L'environnement joue donc probablement un rôle dans la sélection de ces gènes, et la résistance aux antibiotiques n'est pas toujours la conséquence d'une pression de sélection par les antibiotiques (Alonso, Sanchez et al. 2001).

## 8.2 Facteurs environnementaux

Depuis des millénaires, les bactéries ont été continuellement confrontées à des composés organiques ou minéraux qui affectent leur croissance. Pour survivre, les bactéries ont acquis des gènes de résistance.

Les conditions environnementales des bactéries vont définir la pression de sélection. La pression de sélection est un concept global qui comprend les différents facteurs composant un environnement. Ces facteurs vont permettre aux organismes présentant une nouvelle mutation ou de nouvelles caractéristiques acquises de survivre et de se multiplier. La conséquence est une prolifération différentielle des micro-organismes (Baquero, Negri et al. 1998).

Ainsi, la sélection de gènes ayant clairement un rôle dans la résistance aux antibiotiques peut se produire sans la pression de sélection des antibiotiques s'ils sont situés sur des réplicons qui portent également des éléments sélectionnables par l'environnement (Alonso, Sanchez et al. 2001).

### 8.2.1 Les stress environnementaux autres que les désinfectants

#### 8.2.1.1 Définition

Le stress environnemental peut-être défini comme un facteur externe ayant un effet adverse sur le bien-être physiologique des cellules bactériennes, entraînant une réduction du taux de croissance, et dans des circonstances extrêmes, l'inhibition et/ou la mort au niveau des individus ou des populations (McMahon, Xu et al. 2007). Les stress bactéricides ou bactériostatiques sont de nature très variée : températures élevées ou basses, pH, pression osmotique, carence en nutriments, irradiations, présence de composés toxiques comme les antibiotiques, les désinfectants, les métaux lourds.

#### 8.2.1.2 Liaisons entre les gènes de survie et les gènes de résistance aux antibiotiques

- Des liaisons entre les gènes de survie dans l'environnement et les gènes de résistance aux antibiotiques ont été mises en évidence, par exemple, les gènes codant pour les adhésines, qui sont des protéines qui favorisent l'adhésion des cellules aux surfaces dans les environnements liquides (Bower and Daeschel 1999; Alonso, Sanchez et al. 2001).
- Les pompes à efflux intervenant dans la survie au stress environemental et dans la résistance aux antibiotiques
  - Les pompes à efflux sont des protéines membranaires présentes dans toutes les espèces bactériennes et chez des cellules eucaryotes. Elles sont fréquemment impliquées dans la résistance aux antibiotiques. Ces pompes ont probablement un rôle de protection contre les composés toxiques, comme les sels biliaires chez *E. coli*. Les sels biliaires font partie de l'environnement naturel d'*E. coli* depuis des millions d'années, alors que les antibiotiques ne sont utilisés que depuis moins d'un siècle. Ces pompes à efflux ont donc plus probablement été sélectionnées par la présence des sels biliaires même si maintenant, elles contribuent à la résistance intrinsèque d'*E. coli*.
  - De même, la transcription de la pompe à efflux MexABOprD, qui intervient dans la résistance aux antibiotiques chez les *Pseudomonas* est, semble-t-il, régulée par des conditions de stress

comme les chocs osmotiques ou oxydatifs, la phase stationnaire, la présence de sels biliaires ou des carences en nutriments comme le fer (Baquero, Negri et al. 1998).

- Sélection de la résistance aux antibiotiques par les procédés de ressuage et de conservation
  - Dans les aliments, il a été démontré que des procédés de conservation utilisés classiquement, comme les modifications de pH, de salinité ou des températures basses pouvaient conduire au développement de populations bactériennes montrant une sensibilité diminuée vis à vis d'antibiotiques couramment utilisés. Ces diminutions de sensibilité (augmentation de la CMI) peuvent perdurer même après le retrait du stress (McMahon, Xu et al. 2007).
  - Chez campylobacter, il a été démontré que les souches isolées après le ressuage pouvaient présenter des taux de résistance plus élevés à certains antibiotiques (tétracycline, quinolones) en fonction des types de ressuage utilisés (à l'air ou dans l'eau) (Sanchez, Fluckey et al. 2002).

#### 8.2.1.3 Liaison entre les gènes de résistance aux métaux lourds et les gènes de résistance aux antibiotiques

De même, des liaisons entre les gènes de résistance (gènes situés sur le même réplicon par exemple) aux métaux lourds et les gènes de résistance aux antibiotiques ont été mises en évidence, comme les gènes de résistance au cadmium présents dans l'environnement, l'argent (utilisé dans le traitement des brûlures) ou le mercure (présent dans les alliages de dentisterie) (Alonso, Sanchez et al. 2001).
L'accumulation de cuivre dans les sols cultivés pourrait également avoir un impact sur la sélection environnementale des antibiotiques. En agriculture, le cuivre est utilisé comme bactéricide et fongicide. C'est un oligo-élément essentiel, mais il devient toxique à forte dose. Il a été mis en évidence que les sols contaminés par les métaux lourds pouvaient contenir des pourcentages de bactéries résistantes aux antibiotiques plus élevés que les sols non contaminés. La demi-vie du cuivre dans l'environnement est évaluée à des centaines d'années et l'ensemble de ces observations conduit à émettre l'hypothèse que la pollution par les métaux lourds pourrait contribuer à augmenter la résistance aux antibiotiques, par le biais d'une sélection indirecte qui est appliquée sur de très longues périodes car les métaux ne sont pas dégradés (Berg, Tom-Petersen et al. 2005).

### 8.2.2 Liaison entre la résistance aux désinfectants et la résistance aux antibiotiques

Un antibiotique n'est qu'une substance inhibitrice parmi d'autres contre lesquelles les bactéries doivent se défendre. Certaines bactéries ont développé des mécanismes de résistance à d'autres substances inhibitrices ou bactéricides comme les désinfectants. Les sites d'action des molécules désinfectantes sont multiples et les mécanismes de résistance des bactéries vis-à-vis de ces agents sont en général non spécifiques (pompes à efflux, modifications de la composition de la membrane plasmique…). Ces mécanismes étant non spécifiques, ils peuvent également être impliqués dans la résistance aux antibiotiques. De nombreuses études ont mis en évidence un lien entre la résistance aux désinfectants et la résistance aux antibiotiques. Deux mécanismes peuvent être à l'origine de cette observation : la co-résistance et la résistance croisée. Lors de résistance croisée, le même mécanisme est impliqué dans la résistance aux antibiotiques et aux désinfectants (par exemple les pompes à efflux, les modifications de compositions de la membrane plasmique). Lors de co-

résistance, différents mécanismes sont impliqués dans la résistance aux antibiotiques d'une part, et la résistance aux désinfectants d'autre part. Les gènes porteurs de ces résistances sont placés sur le même réplicon ou sur le même élément génétique mobile, ce qui conduit à leur expression simultanée (Courvalin and Trieu-Cuot 2001).

L'application de traitements sublétaux peut induire l'expression de pompes à efflux. Même si ces pompes ne sont pas capables d'entraîner une résistance aux désinfectants aux concentrations d'utilisation, elles sont cependant capables d'entraîner une résistance aux doses thérapeutiques des antibiotiques. Il a donc été largement suspecté qu'une mauvaise utilisation des désinfectants pourrait contribuer à l'apparition et à la persistance de la résistance aux antibiotiques (Russell 1999; Russell, Suller et al. 1999; Aiello and Larson 2003). Cette hypothèse a été confirmée par des études au laboratoire sur des cultures bactériennes pures, cependant, ces observations sont difficiles à extrapoler à l'environnement général dans lequel, le plus souvent, les populations bactériennes cohabitent au sein de biofilm (Gilbert, Allison et al. 2002).

#### 8.2.2.1 Résistance croisée entre les antibiotiques et le triclosan

Le triclosan est un désinfectant dont l'utilisation n'est pas autorisée en industrie agroalimentaire. Cependant, à la différence des autres désinfectants, son mode d'action est mieux compris et il a fait l'objet de nombreuses études pour comprendre les phénomènes de résistance croisée entre le triclosan et les antibiotiques.

- Enoyl-reductase

Des mutants d'*Escherichia coli* ont été identifiés porteurs de la cible génétique du triclosan, l'énoyl-reductase. Cette enzyme est le produit du gène *fabI*. Cette protéine est également la cible de l'isoniazide, qui est une des molécules utilisées dans le traitement de la tuberculose chez l'homme. Une mutation entraînant une modification de l'enzyme conduit à une résistance croisée entre ces deux molécules (Levy 2002).

- Pompes à efflux

Un autre mécanisme de résistance au triclosan est lié aux pompes à efflux non spécifiques, comme la pompe AcrAB chez *Escherichia coli* et les protéines Mex chez *Pseudomonas aeruginosa*. La surexpression de ces pompes entraîne non seulement une résistance aux antibiotiques, mais également une résistance croisée au triclosan et ce phénomène est observé chez *E. coli* et chez *P. aeruginosa* (Levy 2002).

#### 8.2.2.2 Résistance croisée entre les antibiotiques et les composés d'ammoniums quaternaires

- Au cours de la dernière décennie, un nouveau type de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) a émergé dans la communauté urbaine, différent de celui rencontré en milieu hospitalier. Cette bactérie, nommée *S. aureus* acquis dans la communauté (cMRSA), a été isolée aux Etats-Unis, au Canada et en Australie. La caractéristique de cette bactérie est qu'elle est résistante principalement aux antibiotiques de la famille des ß-lactamines et pas, à la différence des souches hospitalières, à de nombreux autres antibiotiques. Des chercheurs japonais ont réussi à sélectionner des mutants cMRSA après une exposition à des composés d'ammoniums

quaternaires. Les mutants obtenus présentaient une résistance élevée à la pénicilline et aux autres antibiotiques de la famille des ß-lactamines, mais pas à d'autres antibiotiques (Levy 2002).

- Chez *E. coli*, une résistance croisée entre des antibiotiques et le chlorure de benzalkonium a été mise en évidence. Une augmentation des phénomènes d'efflux est une des différences observées chez les bactéries adaptées au chlorure de benzalkonium (Braoudaki and Hilton 2004; Langsrud, Sundheim et al. 2004,Braoudaki, 2005 #369).

#### 8.2.2.3 Résistance croisée entre les antibiotiques et la chlorhexidine

La chlorhexidine est un antiseptique cutané qui peut être utilisé pour l'hygiène des mains. Chez *Pseudomonas stutzeri*, la résistance à la chlorhexidine est liée à la résistance à des antibiotiques comme l'érythromycine et l'ampicilline et d'autres désinfectants comme le triclosan et les ammoniums quaternaires (Russell, Tattawasart et al. 1998). Cette résistance semble liée à des modifications de la membrane plasmique qui devient plus hydrophobe chez les souches mutantes (Tattawasart, Maillard et al. 1999).

### 8.3 Biofilm et résistance aux antibiotiques

Un biofilm est constitué d'un consortium de cellules enveloppées par une matrice de polymères extracellulaires (le glycocalix) et des produits de leur métabolisme. La vie au sein d'un biofilm offre probablement de nombreux avantages en terme de protection contre les agressions de l'environnement. Les bactéries présentes au sein d'un biofilm sont significativement plus résistantes aux antibiotiques et aux désinfectants que les bactéries planctoniques. Différentes raisons expliquent cette observation : le biofilm fournit une protection physique contre ces agents, et les concentrations des agents antimicrobiens sont réduites par la présence de la matrice de polymères extracellulaires. Les biofilms, de par leur structure, entraîne un gradient de concentration pour les agents bactéricides, ce qui permet aux clones les moins sensibles de survivre (Gilbert, Allison et al. 2002). Le biofilm favorise également les échanges entre les bactéries et en particulier, les échanges de gènes de résistance aux antibiotiques ou aux désinfectants (McDowell 2004).

## 9 Conclusion et hypothèse

L'environnement joue un rôle dans la sélection des gènes de résistance aux antibiotiques et l'antibiorésistance n'est pas toujours la conséquence d'une pression de sélection par les antibiotiques. Les désinfectants et les stress subis par les bactéries au cours des procédés d'abattage peuvent favoriser la sélection de gènes de résistance aux antibiotiques. L'objectif du travail de thèse est d'analyser l'évolution de la résistance aux antibiotiques des campylobacters au cours des opérations de nettoyage et de désinfection et d'abattage dans les abattoirs de volailles.

# CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

L'objectif de cette thèse est d'explorer l'hypothèse suivante : les stress subis par campylobacter dans les abattoirs de volailles ont-ils un effet sur la résistance de cette bactérie aux antibiotiques ? Les stress que nous avons retenus sont les procédés d'abattage dans leur ensemble et les procédures de nettoyage et de désinfection. Afin d'étudier cette hypothèse, nous avons réalisé une enquête épidémiologique dans 4 abattoirs de volailles. Ce chapitre présente dans une première partie les objectifs et la réalisation de l'enquête épidémiologique et dans une seconde partie, les techniques de laboratoire utilisées.

## 1 Etude épidémiologique

### 1.1 Protocole de l'étude épidémiologique

#### 1.1.1 Objectifs de l'étude

Nous avons retenu d'étudier, d'une part l'influence des procédés d'abattage et d'autre part, l'influence des procédures de nettoyage et de désinfection sur la résistance aux antibiotiques des campylobacters.

Pour étudier l'influence des procédés d'abattage, nous avons choisi de comparer les campylobacters isolés à partir des prélèvements de fientes à l'arrivée des animaux à l'abattoir à ceux isolés à partir des prélèvements de peaux de cou des animaux avant l'entrée des carcasses en ressuage.

L'influence des procédures de nettoyage et de désinfection a été étudiée sur 2 sites :

- Au niveau des caisses de transport des volailles
- Au niveau des surfaces en contact avec les carcasses pendant l'abattage

Pour ces deux sites, les prélèvements sont réalisés avant et après les procédures de nettoyage et de désinfection.

La première partie de l'étude s'attache à déterminer si les campylobacters survivent sur les surfaces dans les abattoirs de volailles après nettoyage et désinfection. La seconde partie vise à étudier le phénotype et le génotype des souches ayant survécu aux opérations de nettoyage et désinfection afin de déterminer si les opérations de nettoyage et désinfection ont un effet sur la résistance de campylobacter aux antibiotiques.

#### 1.1.2 Définitions des populations étudiées

L'influence des procédés d'abattage peut être étudiée au niveau de la population des campylobacters présents sur les volailles pendant l'abattage (analyse des isolats) ou au niveau de la population hôte « volaille » (analyse au niveau des prélèvements).

L'influence des procédures de nettoyage et de désinfection peut-être étudiée également au niveau de la population des campylobacters (analyse des isolats) ou au niveau des surfaces prélevées (analyse des prélèvements).

**Figure 16. Carte de la localisation des élevages de volailles de chair en 2004 et des abattoirs visités (source Agreste 2004)**

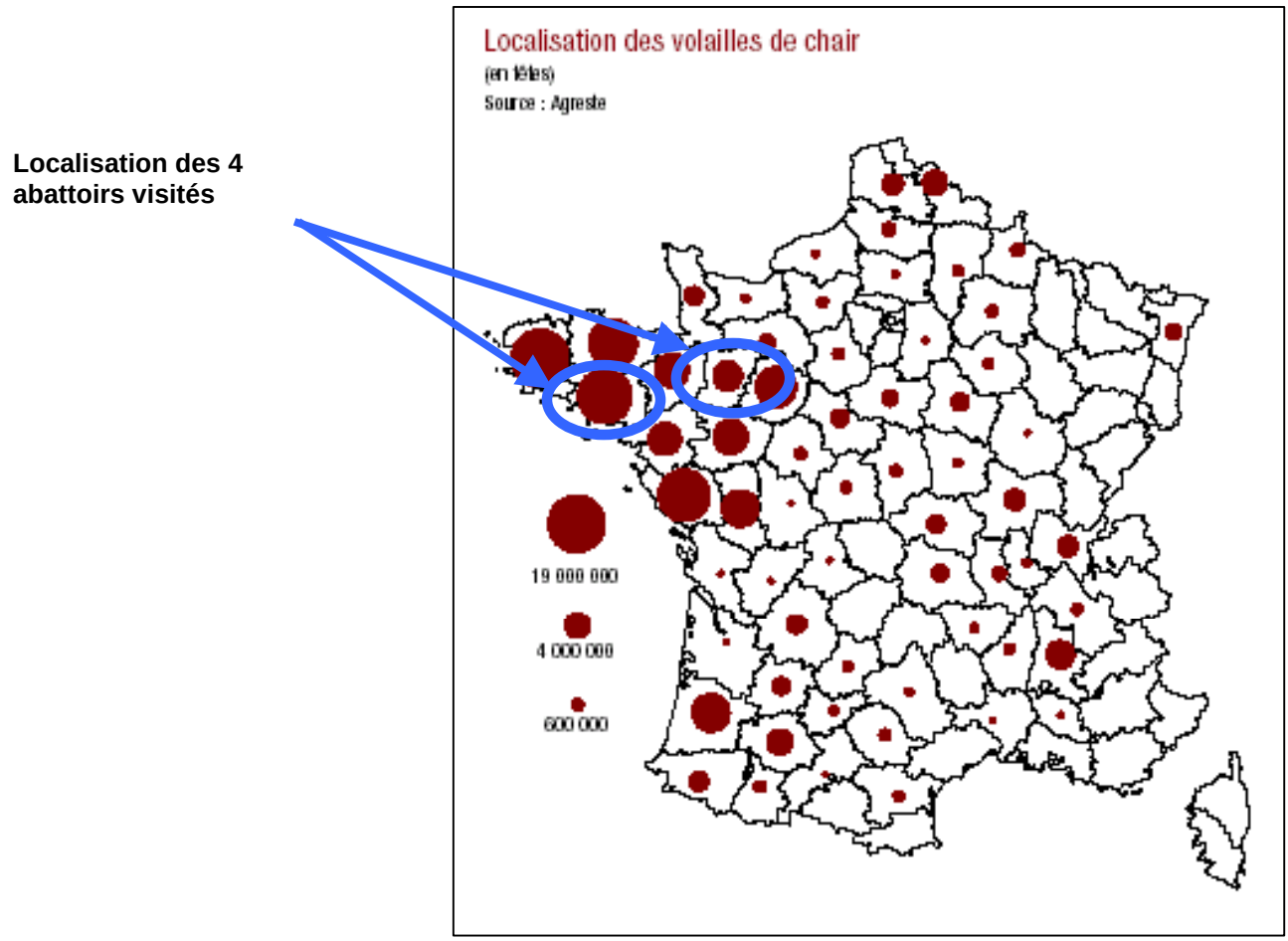



**Tableau 18. Dates et saisons des prélèvements dans les 4 abattoirs visités**

| | 2005 | | | | | 2006 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Eté | | Automne | | | Hiver | | Printemps | | | Eté |
| | A | S | O | N | D | J | F | M | A | M | J |
| Abattoir 1 | x | | | | | | x | x | | | |
| Abattoir 2 | | x | | | | | | | | | |
| Abattoir 3 | | | | | x | | x | | | x | x |
| Abattoir 4 | | | | | | x | | | | | |

x: visite réalisée dans l'abattoir

#### 1.1.3 Définition de l'échantillon étudié

Le nombre de prélèvements et de souches nécessaires pour l'ensemble de l'étude varient en fonction de l'écart de résistance que l'on souhaite mettre en évidence ainsi que du niveau initial de résistance observé. En fixant la puissance de l'étude à 80%, pour mettre en évidence une augmentation de l'ordre de 25% des niveaux de résistance observés, il faut travailler sur des tailles d'échantillons d'environ 50. Nous avions choisi de visiter 4 abattoirs différents, afin que les productions ne soient pas liées et de prélever pour l'ensemble, 50 lots de volailles avant et après abattage et de réaliser 50 prélèvements dans les caisses de transport et sur les surfaces de l'abattoir avant et après nettoyage et désinfection.

#### 1.1.4 Justification du choix des abattoirs

Les abattoirs de volailles étant très standardisés en France, il y a peu de différences de fonctionnement (procédés d'abattage ou procédures de nettoyage et désinfection) entre les abattoirs choisis. Le choix de 4 abattoirs, non liés entre eux (producteurs n'appartenant pas au même groupement par exemple) permet de prélever des animaux provenant d'élevages différents et de groupements de producteurs ayant des pratiques d'élevage différentes. Chaque abattoir devait être visité trois fois afin de pouvoir étudier d'éventuel phénomène de persistance de souches de campylobacter dans l'environnement des abattoirs visités.

### 1.2 Réalisation pratique de l'étude : prélèvements en abattoirs

#### 1.2.1 Caractéristiques des abattoirs visités

##### 1.2.1.1 Localisation géographique

Les prélèvements ont été réalisés dans 4 abattoirs situés dans les régions Bretagne (département 56, Morbihan) et Pays de la Loire (département 53, Mayenne) d'août 2005 à juin 2006. Ces abattoirs sont situés dans les principales zones de production de volaille en France (figure 16).

##### 1.2.1.2 Visites réalisées

Pour des raisons pratiques, seules 9 visites ont été réalisées dans les abattoirs. dont 8 visites sur 2 journées consécutives. L'abattoir 1 a été visité 3 fois, en août 2005, en février et en mars 2006. La visite de l'abattoir 1 en août 2005 n'a eu lieu que sur une seule journée (après le nettoyage et la désinfection de l'abattoir). L'abattoir 2 a été visité une fois, en septembre 2005. L'abattoir 3 possède deux chaînes d'abattage, une chaîne pour les petites volailles (poulets et pintades) et une chaîne pour les grosses volailles (dindes et canards). Sur la chaîne d'abattage des poulets, 3 visites ont été réalisées en décembre 2005, en février et en mai 2006. Sur la chaîne d'abattage des dindes, une visite a été réalisée en juin 2006. L'abattoir 4 a été visité une fois, en janvier 2006. La saison et les dates des prélèvements sont précisés dans le tableau 18.

**Tableau 19. Capacité (nombre d'animaux abattus par an) et cadence (nombre d'animaux abattus par heure) des abattoirs visités pour les poulets**

| Abattoir | Capacité en 2004 | Capacité en 2005 | cadence mini | cadence maxi |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 12 361 564 | 11 847 610 | 7000 | 8000 |
| 2 | 8 584 105 | 9 365 592 | 7000 | 8000 |
| 3 | 13 303 048 | 14 808 937 | 6800 | 6800 |

**Tableau 20. Capacité (nombre d'animaux abattus par an) et cadence (nombre d'animaux abattus par heure) des abattoirs visités pour les dindes**

| Abattoir | Capacité en 2004 | Capacité en 2005 | Capacité en 2006 | cadence mini | cadence maxi |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | nc | 1 175 741 | 402 986 | 1500 | 2000 |
| 3 | 1 831 065 | nc | nc | 1500 | 1800 |
| 4 | nc | 3 308 960 | 420 852 | 1400 | 3200 |

nc : non communiqué

#### 1.2.1.3 Activité des abattoirs visités

- Espèces de volailles abattues

Les abattoirs 1, 2 et 3 abattent plusieurs types de volailles, ce sont des abattoirs multi-espèces. L'abattoir 4 n'est équipé que pour l'abattage des dindes. L'abattoir 2 n'abat pas de dindes.

Les abattoirs 1 et 2 n'ont qu'une chaîne d'abattage. Dans ces deux abattoirs, des poulets (de type standard, fermier ou des poules de réforme), des pintades et des dindes sont abattus sur la même chaîne. Pour les volailles de petite taille, la chaîne est entièrement automatisée. Pour les dindes, l'abattage et la plumaison sont automatisés. L'éviscération et la finition sont réalisées manuellement.

L'abattoir 3 possède deux chaînes d'abattage en fonction de la taille des volailles abattues. Cependant, comme pour l'abattoir 1, l'abattage des petites volailles est entièrement automatisé, et l'abattage des dindes et des canards est partiellement manuel.

- Capacité et cadence d'abattage

Les capacités et cadence des abattoirs visités sont indiquées dans les tableaux 19 et 20. En France, les abattoirs de volailes sont très standardisés, la taille de l'abattoir n'a pas de conséquences sur les procédés d'abattage ou les procédures de nettoyage et désinfection. D'après le guide Orsol Volailles-oeuf (Anonymous 2005), pour la filière poulet, 47 abattoirs ayant une capacité supérieure à 4.5 millions de têtes abattent 88% des volumes. Les abattoirs visités pour les poulets appartiennent à cette catégorie avec des capacités en 2005 de 9 à 15 millions. La cadence des abattoirs varie de 6800 à 8000 pour les poulets. Pour la filière dinde, en 2005, 7 abattoirs en France avaient une capacité supérieure à 4.5 millions de têtes abattues par an, et ces 7 abattoirs abattent 43% des volumes contrôlés. La taille des abattoirs en filière dinde varie beaucoup plus que dans la filière poulet et les abattoirs que nous avons visités ont des capacités qui varient de 1 à 3 millions d'animaux abattus par an.

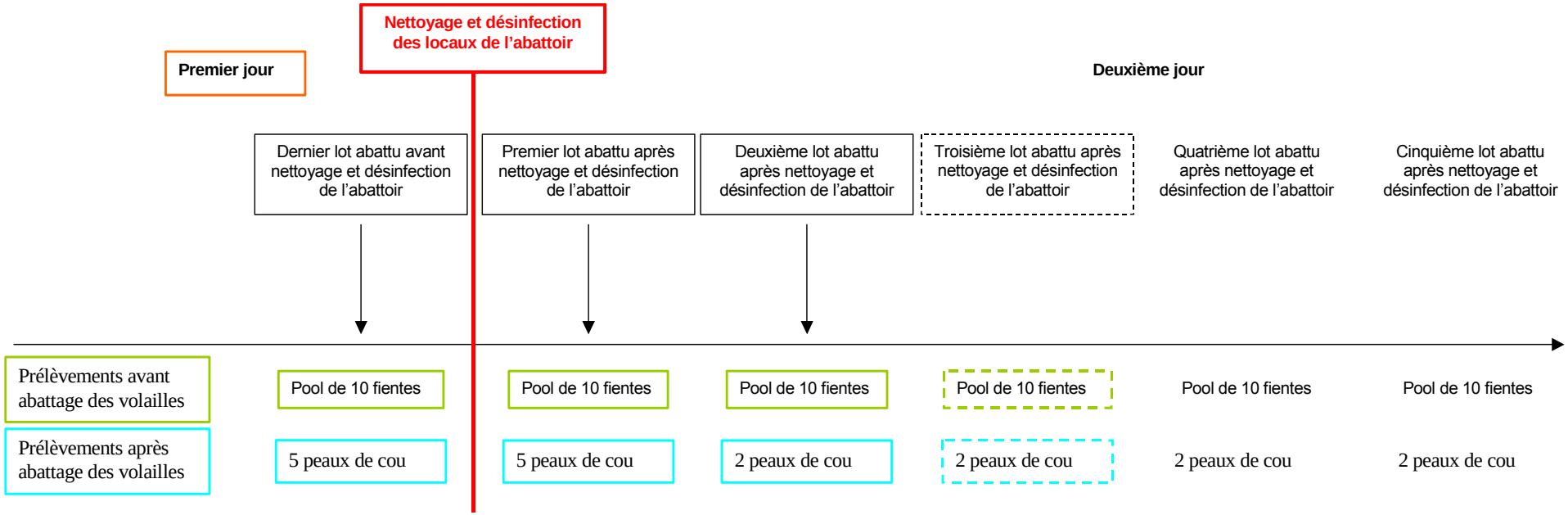
#### 1.2.1.4 Procédures de nettoyage et désinfection appliquées dans les abattoirs

Dans chaque abattoir, un questionnaire portant sur les produits de nettoyage et désinfection utilisés et leurs modalités d'utilisation a été transmis au responsable qualité de l'abattoir. Le questionnaire détaille l'ensemble des zones où sont réalisées des opérations de nettoyage et de désinfection, c'est à dire, les caisses de transport des animaux, les locaux et le matériel de la chaîne d'abattage. L'objectif de ce questionnaire est de déterminer quelles sont les molécules désinfectantes utilisées dans les abattoirs de volailles visités. Pour chaque zone traitée dans l'abattoir, le nom des produits utilisés, leur concentration et le temps de contact sont demandés. L'abattoir 2 n'a pas répondu au questionnaire. Le questionnaire est en annexe 1.

### 1.2.2 Prélèvements réalisés

L'objectif de notre étude est d'étudier l'impact des procédures de nettoyage et de désinfection et des procédures d'abattage sur la résistance aux antibiotiques des campylobacters. Les prélèvements ont donc été faits avant et après nettoyage et désinfection, dans les caisses de transport des animaux et dans les locaux de l'abattoir et sur les animaux, avant l'abattage et avant l'entrée en ressuage des carcasses.

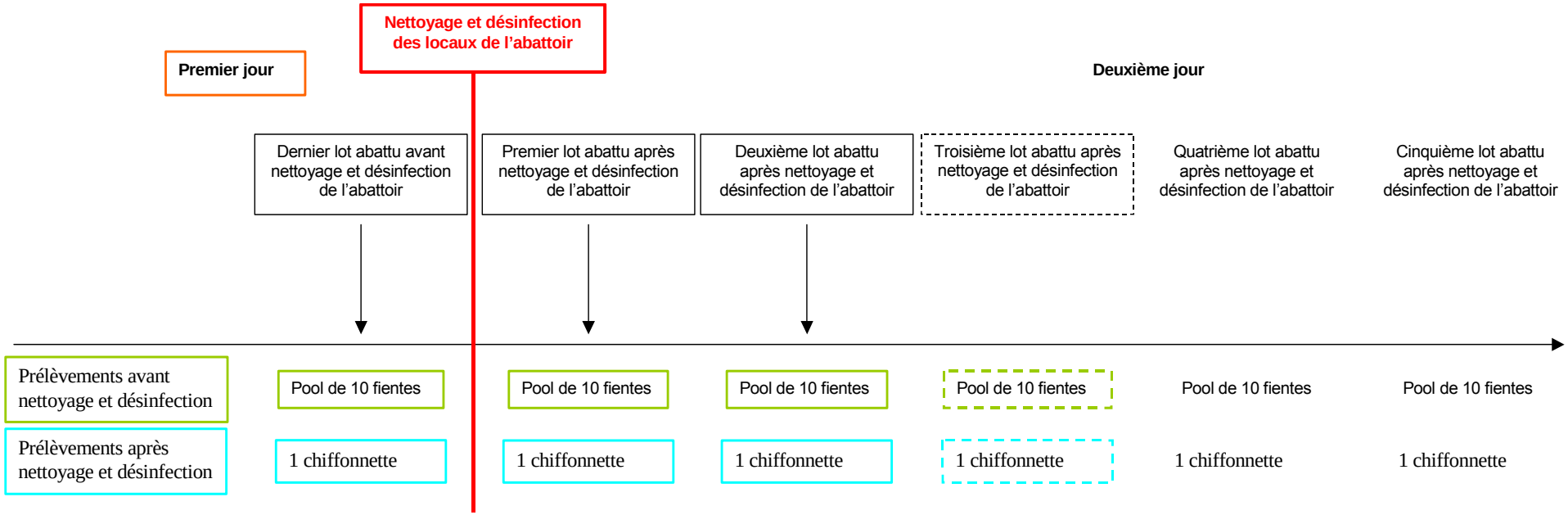
**Figure 17. Schéma récapitulatif des prélèvements réalisés sur les volailles**




Légende :

Prélèvements réalisés en fonction de l'activité de l'abattoir et de la taille des lots

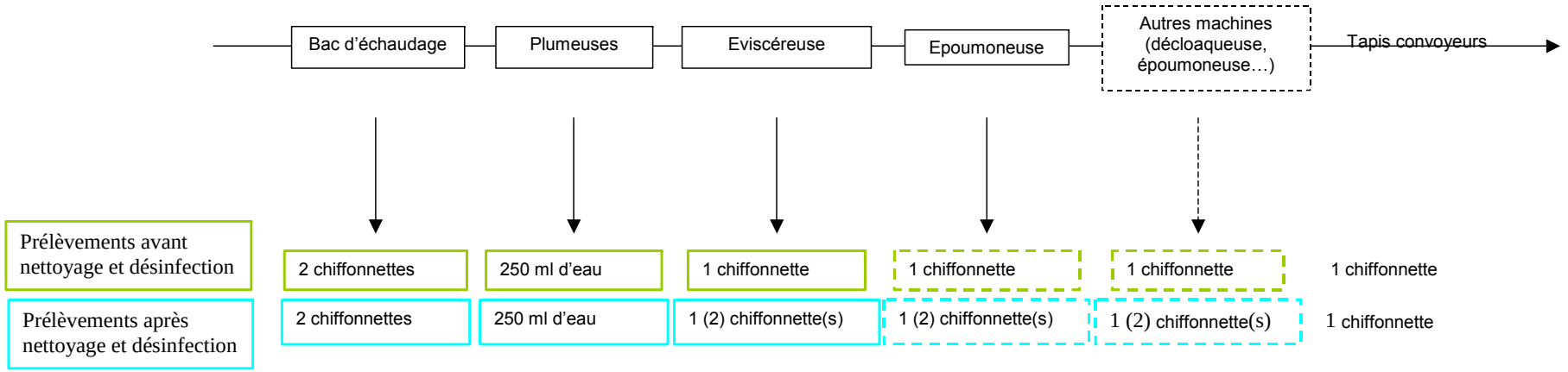
**Figure 18. Schéma récapitulatif des prélèvements réalisés dans les caisses de transport**




Légende:

Prélèvements réalisés en fonction de l'activité de l'abattoir et de la taille des lots

**Figure 19. Schéma récapitulatif des prélèvements sur la chaîne d'abattage**




Légende :

Prélèvements réalisés en fonction de la structure de la chaine d'abattage et des machines de l'abattoir

#### 1.2.2.1 Organisation des prélèvements

- Prélèvements sur les volailles

Les volailles ont été prélevées par lot. Dans notre étude, un lot correspond à un groupe de volailles provenant d'un même élevage, et abattues en même temps.

- Fiche sanitaire d'élevage

La fiche sanitaire d'élevage est un document établi par l'éleveur, transmis au responsable de l'abattoir qui s'assure que les services d'inspection vétérinaire en disposent au moins 24 h avant la date prévue d'abattage des animaux. Sur cette fiche sont portés l'ensemble des traitements (antibiotiques, anti-inflammatoires, vermifuges…) reçus par les animaux pendant la période d'élevage. Pour chaque lot, la fiche sanitaire d'élevage était récupérée lorsqu'elle était disponible.

- Prélèvements avant l'abattage des animaux

Les prélèvements avant l'abattage correspondent à des fientes. Pour des raisons de faisabilité, les fientes sont prélevées avec des gants dans les caisses de transport au moment de l'accrochage des volailles. Pour chaque lot, un pool de 10 fientes prises dans différentes caisses de transport du lot est prélevé. Les prélèvements de fientes sont placés dans des pots de prélèvements stériles de 250 ml.

- Prélèvements après l'abattage des animaux

Les prélèvements après abattage correspondent à des peaux de cou qui sont prélevées avant que les carcasses n'entrent en salle de ressuage. Les peaux de cou sont découpées soit directement sur la chaine lorsque les carcasses restent sur une chaîne pour entrer en salle de ressuage (c'est en général le cas de volailles de petite taille), soit sur les tapis convoyeurs lorsque les carcasses sont placées sur des chariots à épinette puis emmenées en salle de ressuage. Pour chaque peau de cou, les prélèvements sont réalisés avec un bistouri et une pince stériles qui sont changés pour chaque prélèvement. Les peaux de cou sont ensuite placées dans des sacs stomacher stériles (figure 17).

- Prélèvements sur le matériel

- Chiffonnettes utilisées

Les surfaces des caisses de transport et des machines de la chaîne d'abattage sont prélevées avec des chiffonnettes (Sodibox, Nevez, France). Ce sont des chiffonnettes stériles dans un sachet de prélèvement soudé, imprégnée d'un milieu neutralisant pour les désinfectants (dont la composition est fournie en annexe 2), prêtes à l'emploi en emballage unitaire avec deux gants stériles.

- Caisses de transport

Pour chaque lot de volailles, les caisses de transport sont prélevées avant et après nettoyage et désinfection. Les caisses de transport des volailles sont nettoyées et désinfectées après chaque utilisation. Avant nettoyage et désinfection, les prélèvements correspondent aux fientes fraîches prélevées dans les caisses de transport au moment de l'accrochage des volailles (les prélèvements ne sont pas faits en double, il s'agit du même prélèvement que celui réalisé pour les prélèvements animaux). Après nettoyage et désinfection, une chiffonnette est passée sur la surface d'au moins 5 caisses de transport par lot prélevé (figure 18).

**Tableau 21. Nombre de lots prélevés dans les quatre abattoirs**

| Abattoir | Visite n° | Type de volaille | Nombre de lots | FSE |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | Poulet standard | 5 | - |
| | 2 | Dinde | 2 | + |
| | | Poulet standard | 4 | + |
| | 3 | Dinde | 2 | + |
| | | Poulet standard | 4 | + |
| **Sous-total abattoir 1** | | | **17** | |
| 2 | 1 | Poulet standard | 3 | + |
| | | Poulet fermier | 1 | + |
| | | Autre | 2 | - |
| **Sous-total abattoir 2** | | | **6** | |
| 3 | 1 | Poulet fermier | 2 | + |
| | | Autre | 3 | + |
| | 2 | Poulet standard | 2 | + |
| | | Poulet fermier | 2 | + |
| | | Autre | 1 | + |
| | 3 | Poulet standard | 2 | + |
| | | Poulet fermier | 2 | + |
| | | Autre | 1 | + |
| | 4 | Dinde | 3 | + |
| | | Autre | 1 | + |
| **Sous-total abattoir 3** | | | **18** | |
| 4 | 1 | Dinde | 1 | + |
| **Sous-total abattoir 4** | | | **1** | |
| Sous-total par type de volaille | | Poulet standard | 20 | |
| | | Poulet fermier | 7 | |
| | | Dinde | 8 | |
| | | Autre | 8 | |
| **Total** | | | **43** | |

FSE : fiche sanitaire d'élevage

**Tableau 22. Nombre de prélèvements sur les volailles et dans les caisses de transport en fonction du type de volaille**

| Type de volaille | Pool de 10 fientes | Caisse de transport après nettoyage et désinfection | Peaux de cou |
|---|---|---|---|
| Poulet standard | 20 | 20 | 61 |
| Poulet fermier | 7 | 7 | 23 |
| Dinde | 8 | 8 | 31 |
| Autre | 8 | 8 | 31 |
| **Total** | **43** | **43** | **146** |

- Chaîne d'abattage

Le nettoyage et la désinfection des locaux et de la chaîne d'abattage dans les abattoirs sont réalisés quotidiennement dans les abattoirs, à la fin de la journée de travail. Pour les locaux et la chaîne d'abattage, les prélèvements sont réalisés sur deux journées successives : le premier jour, à l'arrêt des machines à la fin de l'activité, avant le nettoyage et la désinfection et le deuxième jour, avant la remise en route de la chaîne, après le nettoyage et la désinfection. Sur les doigts des plumeuses, les machines à éviscérer et les tapis convoyeurs, les prélèvements sont réalisés avec des gants stériles et des chiffonnettes. Dans les plumeuses, les chiffonnettes sont passées sur les doigts en caoutchouc des plumeuses sur au moins 10 doigts différents. Au cours du prélèvement des plumeuses, les rotors sont tournés pour exposer les différents doigts. Pour les machines, les chiffonnettes sont passées vigoureusement sur l'ensemble des surfaces accessibles de la machine, pendant au moins 30 secondes. Dans le bac d'échaudage, le prélèvement de 250 ml d'eau est fait dans un pot stérile. Ces prélèvements sont réalisés avant et après nettoyage et désinfection sur les mêmes sites. Dans certains cas, après nettoyage et désinfection, deux chiffonnettes sont utilisées sur la même machine (figure 19).

#### 1.2.2.2 Nombre de lots de volailles prélevés

Dans chaque abattoir, 5 peaux de cou sont prélevées sur le dernier lot abattu avant nettoyage et désinfection de l'abattoir (premier jour) et sur le premier lot abattu après nettoyage et désinfection (deuxième jour). Le deuxième jour, après le premier lot abattu après nettoyage et désinfection, 1 à 4 lots de volailles sont prélevés, en fonction de l'activité de l'abattoir et de la taille des lots. Pour les lots suivants, 2 peaux de cou sont prélevées par lot (figure 17). Le nombre de lots prélevés par abattoir est indiqué dans le tableau 21.

#### 1.2.2.3 Nombre de prélèvements réalisés

- Prélèvements sur les volailles et dans les caisses de transport

Le tableau 22 indique le nombre de prélèvements réalisés sur les volailles (fientes et peaux de cou) et dans les caisses de transport de chaque lot après nettoyage et désinfection.

- Prélèvements sur l'équipement de la chaîne d'abattage

Le tableau 23 indique le nombre de prélèvements réalisés sur les machines de la chaîne d'abattage et dans le bac d'échaudage avant et après nettoyage et désinfection

Au total, 346 prélèvements ont été faits dans les 4 abattoirs, dont 189 prélèvements sur les volailles avant et après abattage et 157 prélèvements d'environnement avant et après nettoyage et désinfection (figure 20).

#### 1.2.2.4 Conservation des prélèvements avant traitement

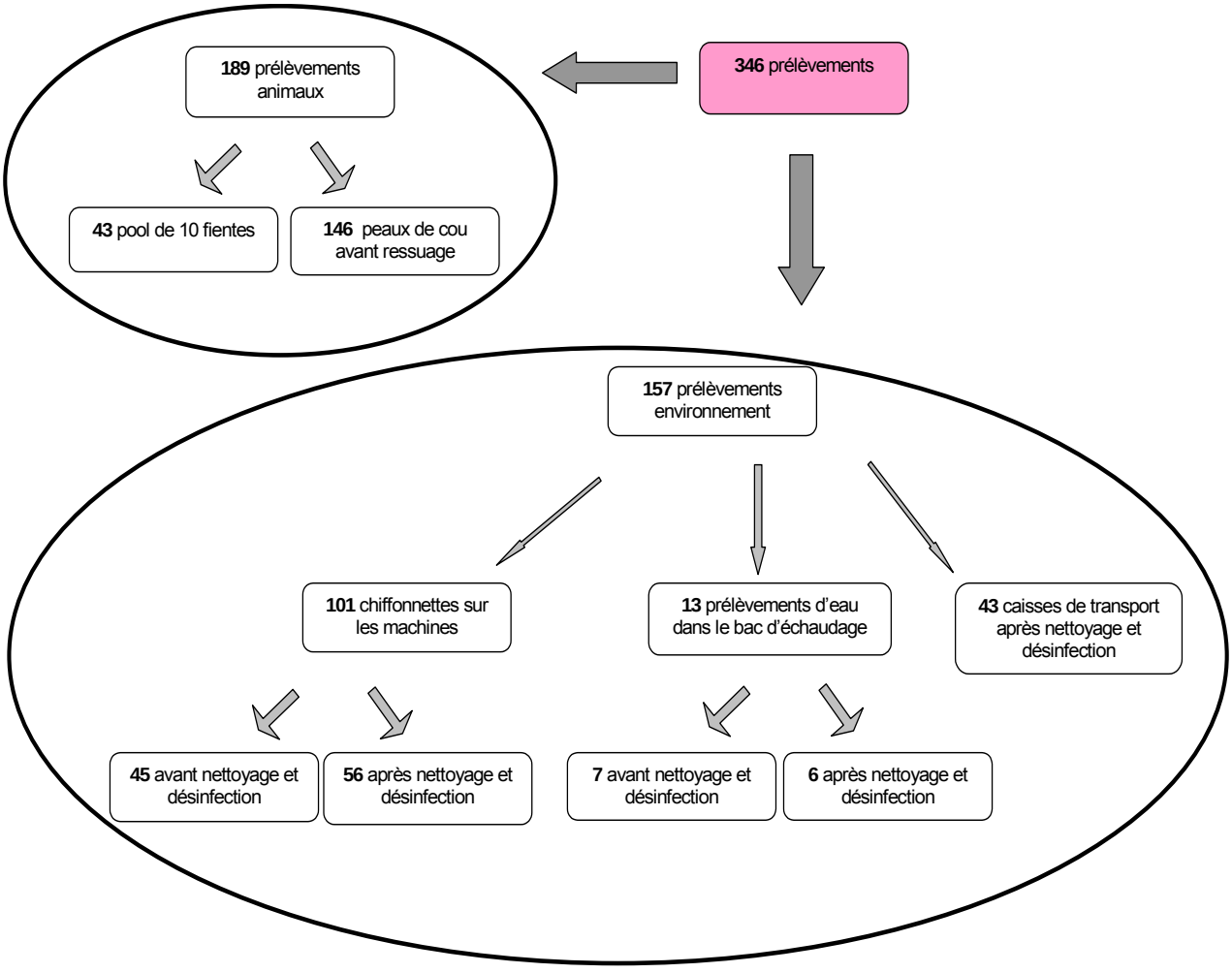
Tous les prélèvements sont conservés dans une glacière avec des blocs de glace, puis en chambre froide à 4°C jusqu'au traitement, sous 48h pour les prélèvements réalisés le premier jour et sous 24h pour les prélèvements réalisés le deuxième jour. Les abattoirs étant situés loin du laboratoire, les prélèvements n'ont pas pu être traités dans des délais plus courts.

**Tableau 23. Nombre de prélèvements sur les machines et le bac d'échaudage en fonction des abattoirs**

| Abattoir | Site de prélèvement | Avant nettoyage et désinfection | | Après nettoyage et désinfection | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | **Prévus** | **Réalisés** | **Prévus** | **Réalisés** |
| 1 | Machines | 18 | 14[1] | 18-27 | 22[1] |
| | Eau | 3 | 2[2] | 3 | 2[2] |
| 2 | Machines | 6 | 6 | 6-9 | 9 |
| | Eau | 1 | 0[2] | 1 | 0[2] |
| 3 | Machines | 24 | 19[3] | 24-36 | 19[3] |
| | Eau | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 4 | Machines | 6 | 6 | 6-9 | 6 |
| | Eau | 1 | 1 | 1 | 0[4] |
| **Total** | **Machines** | **54** | **45** | **54-81** | **56** |
| | **Eau** | **9** | **7** | **9** | **6** |

[1] : Dans l'abattoir 1, la première visite n'a été réalisée qu'après nettoyage et désinfection. Les prélèvements avant nettoyage et désinfection n'ont pas été réalisés.
[2] : Dans les abattoirs 1 et 2, l'eau du bac d'échaudage n'a pas été prélevée au cours de la première visite
[3] : dans l'abattoir 3, la chaine d'abattage des dindes présentait moins de sites de prélèvements que la chaine d'abattage des poulets
[4] : dans l'abattoir 4, il n'y avait pas d'abattage après les opérations de nettoyage et désinfection (journée d'arrêt de l'abattoir), par conséquent, le bac d'échaudage n'avait pas été rempli et le prélèvement d'eau du bac après nettoyage et désinfection n'a pas pu être réalisé

**Figure 20. Synthèse des prélèvements réalisés**



## 1.3 Analyse statistique

### 1.3.1 Analyse multidimensionnelle descriptive

#### 1.3.1.1 Objectif de l'analyse multidimensionnelle descriptive

Les analyses multidimensionnelles descriptives sont des outils permettant de synthétiser et décrire les liens entre variables et entre individus. L'objectif général des analyses multidimensionnelles est de décrire un ensemble de données sur lequel on n'a pas ou peu d'information. Dans le cas des analyses multidimensionnelles descriptives, toutes les variables jouent le même rôle. Leur intérêt par rapport aux analyses mono-dimensionnelles est la prise en compte de l'information globale des variables. La règle générale de robustesse d'une analyse multidimensionnelle est que le nombre d'individus doit être supérieur au nombre de variables introduites.

#### 1.3.1.2 Description des données qualitatives par l'Analyse des Correspondances Multiples (ACM)

L'objectif de notre étude est de décrire la variable de résistance (la variable qualitative étudiée est R ou S) des différents prélèvements réalisés qui sont caractérisés par :

- L'abattoir où ils ont été prélevés
- La saison de prélèvement
- Le type de volaille
- Le moment du prélèvement (avant ou après nettoyage et désinfection/avant ou après abattage)
- Les fiches sanitaires d'élevage des lots de volailles prélevés

L'intérêt de cette méthode est la prise en compte de toutes les résistances observées dans les prélèvements et de l'ensemble des informations disponibles sur l'origine des prélèvements.
Les variables étudiées sont qualitatives et quantitatives ce qui justifie le choix de l'analyse des correspondances multiples. L'ACM de nos données a été réalisée avec le logiciel SPAD® (Spad, Paris, France).

### 1.3.2 Comparaison des niveaux de résistance observés

#### 1.3.2.1 Choix de la population de référence

Dans notre étude, la résistance aux antibiotiques est exprimée en pourcentage d'isolats résistants parmi la totalité des isolats ou en pourcentage de prélèvements comptant des isolats résistants parmi la totalité des prélèvements. Pour chaque prélèvement réalisé, en raison de la nature du protocole d'isolement, de 1 à 8 isolats peuvent être collectés.
En fonction des objectifs de l'analyse, la mesure du pourcentage de résistance sera faite soit sur l'ensemble des isolats collectés soit sur les résistances observées par prélèvement. Pour mesurer la résistance au sein d'un prélèvement, on notera pour chaque antibiotique si la résistance est observée ou non, ce qui permet de tenir compte du fait que plusieurs isolats dans un même prélèvement peuvent être issus d'un même clone. Cette méthode permet de limiter la pondération entraînée par les

prélèvements dans lesquels plusieurs isolats sont obtenus et elle correspond à une description des résistances aux antibiotiques présentes dans les prélèvements.

#### 1.3.2.2 Comparaison des pourcentages de résistance observés

- Principe des tests de comparaison

Les tests de comparaison des pourcentages observés dans plusieurs échantillons permettent de répondre à la question : les populations dont sont issus les échantillons sont-elles identiques ou différentes ? Les comparaisons portent sur les prélèvements collectés et les isolats obtenus avant et après nettoyage et désinfection, et sur les prélèvements collectés et les isolats obtenus avant et après abattage des volailles. La comparaison teste deux hypothèses : l'hypothèse nulle $H_0$ qui considère à priori que les paramètres de populations d'où sont issus les échantillons (ou les isolats) sont identiques et l'hypothèse alternative $H_1$ qui est retenue au cas où les résultats du test conduiraient à rejeter l'hypothèse $H_0$. Pour ces tests, deux risques sont calculés :

- le risque $\alpha$ qui est la probabilité de rejeter l'hypothèse nulle $H_0$ alors que $H_0$ est vraie
- le risque $\beta$ qui est la probabilité de ne pas rejeter $H_0$ alors que $H_1$ est vraie

Le risque $\alpha$ est fixé à priori, dans l'étude, ce risque est fixé à 5% et si l'on observe une différence, la différence observée est significative au risque $p \leq 0.05$.

La puissance du test est la valeur 1-$\beta$. La puissance d'un test est liée à la taille des effectifs des échantillons. Plus la taille augmente, plus la puissance du test augmente et le risque $\beta$ diminue. La puissance désirée pour l'étude peut également être fixée, par exemple à 80%, ce qui permet de calculer le nombre d'individus (dans l' étude, le nombre de prélèvements ou d'isolats) nécessaires.

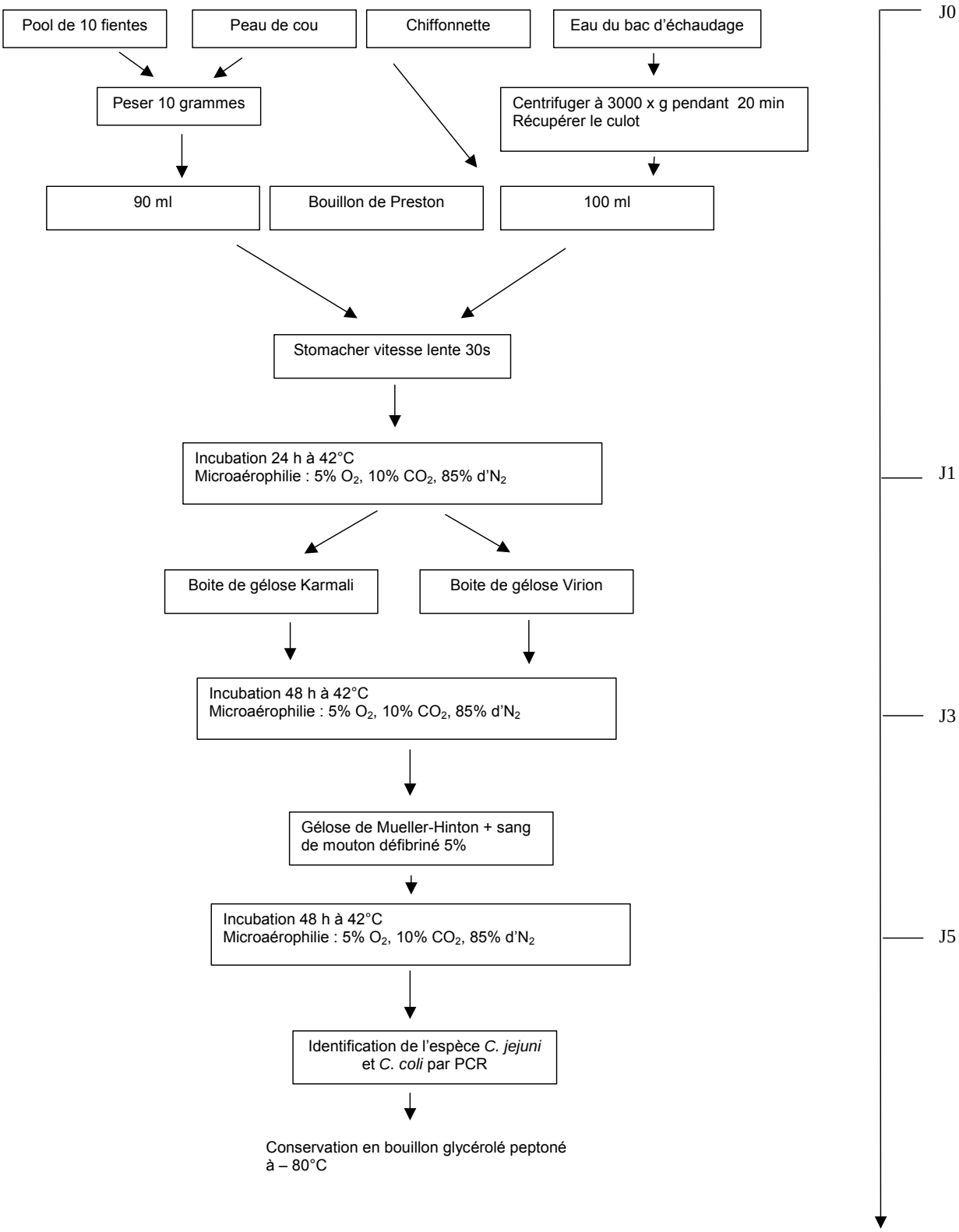
- Tests de comparaison utilisés
  - Le premier test de comparaison utilisé est le test du $\chi 2$ qui consiste à comparer les effectifs des classes de distribution. Pour ce test, des effectifs théoriques sont calculés, ils correspondent à l'effectif théorique qui serait observé si les distributions étaient identiques. Les conditions d'application de ce test nécessitent que les effectifs calculés théoriques soient supérieurs à 5.
  - Lorsque la condition des effectifs calculés supérieurs à 5 n'est pas remplie, il existe une méthode de calcul exacte de tester l'homogénéité de 2 distributions de 2 variables binaires : le test exact de Fisher.

Les tests de comparaisons utilisés dans notre étude seront donc le test du $\chi^2$ et le test exact de Fisher.

#### 1.3.2.3 Corrélation entre les distributions de CMI

Les tests de corrélation sont utilisés afin de rechercher l'existence d'un lien entre la résistance aux antibiotiques et aux désinfectants des souches de campylobacter et de quantifier l'intensité de la liaison. Les distributions de CMI des antibiotiques sont (le plus souvent) bimodales, ce qui conduit à l'utilisation de tests non- paramétriques. Ils sont basés non pas sur la comparaison des valeurs de variables étudiées, mais sur les rangs des individus classés. On appelle rang, le numéro d'ordre d'une valeur après classement de la variable par ordre croissant. Dans notre étude, le test de

**Figure 21. Isolement des campylobacters à partir des prélèvements réalisés en abattoir**



corrélation utilisé est le test de corrélation des rangs de Spearman. Son interprétation est identique à celle du test de corrélation r ($p<0.05$).

Dans notre étude, les tests de comparaisons et le calcul des corrélations ont été réalisés avec le logiciel Systat® (Systat Software Inc., San Jose, California, USA).

# 2 Méthodes de laboratoire

## 2.1 Isolement des campylobacters

L'ensemble de la procédure d'isolement des campylobacters est schématisée sur la figure 21. Dans toute l'étude, le milieu microaérophile correspond à une atmosphère composée de 5% de $O_2$, 10% de $CO_2$ et 85% d'$N_2$.

### 2.1.1 Traitement des prélèvements et phase d'enrichissement

Les isolements sont réalisés selon la méthode interne de l'AFSSA Ploufragan : Recherche de *Campylobacter* thermotolérants qui correspond à une méthode adaptée à partir de la norme NF ISO 10272. La composition des différents milieux utilisés au cours de l'étude est fournie dans l'annexe 3.

Tous les échantillons sont soumis à une phase d'enrichissement en bouillon de Preston avant l'isolement des campylobacters.

- Préparation des prélèvements

Pour les prélèvements de pool de fientes et pour les prélèvements de peau de cou, 10 g sont prélevés stérilement. Pour les prélèvements d'eau du bac d'échaudage, le prélèvement est centrifugé à 3000 x g pendant 20 min et le culot de centrifugation est récupéré.

- Ajout du bouillon de Preston

Le bouillon d'enrichissement de Preston est préparé avec un bouillon nutritif n°2 (Oxoid, Basingstoke, RU) complémenté avec le supplément sélectif pour campylobacter (Oxoid réf. SR0117E). Les échantillons de fientes et de peau de cou sont placés dans des sacs stomacher stériles avec 90 ml de bouillon d'enrichissement de Preston. Le culot de centrifugation du prélèvement d'eau du bac d'échaudage et les chiffonnettes sont placées dans des sacs stomacher stériles avec 100 ml de bouillon de Preston.

Tous les sacs sont agités en vitesse lente, avec un stomacher (BagMixer®, Interscience, Saint nom, France), pendant 30 s.

- Incubation

Les sacs stomacher contenant les prélèvements sont placés dans des jarres étanches avec des sachets générateurs de $CO_2$ (GenBox, Biomérieux, Marcilly l'Etoile, France), créant un milieu microaérophile, et sont mis à incuber dans une étuve maintenue à 37°C pour les prélèvements réalisés jusqu'en décembre 2005 puis à 42°C pour les prélèvements réalisés après cette date. L'incubation dure 18 à 24h en milieu microaérophile. A 37°C, de nombreuses boites s'avéraient faussement positives pour campylobacter. Les boites contenant les milieux sélectifs de *Campylobacter* présentaient des colonies caractéristiques macroscopiquement qui s'avéraient négatives en PCR. La température de 37°C permettait la croissance de bactéries du genre

*Comamonas* espèce *aquatica* (Wauters, De Baere et al. 2003). Cette bactérie avait également été identifiée au cours d'une étude par le centre technique Aerial et caractérisée par séquençage au centre national de référence des campylobacters. La mise en culture à 42°C permet d'éviter sa croissance et diminue le nombre de boites faussement positives pour campylobacter.

### 2.1.2 Milieux sélectifs utilisés

Tous les milieux de croissance gélosés sont distribués dans des boites de Pétri rondes de 90 mm de diamètre.

Après incubation, 10 µl des bouillons d'enrichissement sont ensemencés sur deux milieux sélectifs pour les campylobacters : le milieu de Karmali (Oxoid réf. CM935) complémenté avec le supplément sélectif de Karmali pour campylobacter (Oxoid réf. SR0167E) et le milieu de Virion. Les antibiotiques ajoutés dans le milieu de Virion sont fournis par Sigma Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). La composition de ces milieux est indiquée dans l'annexe 3. Les boites sont ensuite placées à incuber en condition microaérophile (5% $O_2$, 10% $CO_2$ et 85% $N_2$) dans une étuve à débit gazeux réglable pendant 48 h à 37°C pour les prélèvements réalisés jusqu'en décembre 2005 puis à 42°C par la suite.

### 2.1.3 Isolement

Après 48 h d'incubation des boites de Karmali et de Virion, deux colonies par boite sont prélevées et ensemencées sur la gélose de Mueller-Hinton (Difco-Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France) complémentée avec 5% de sang de mouton défibriné (AES laboratories, Combourg, France). Ces boites sont placées à incuber à 42 °C pendant 48 h dans une étuve en milieu microaérophile.

### 2.1.4 Conservation des isolats de campylobacter

Les cultures pures de campylobacter peuvent être conservées pendant plusieurs années à –80°C en cryotubes de 1.8 ml dans du bouillon glycérolé peptoné. La composition du bouillon glycérolé peptoné est indiquée dans l'annexe 3.

## 2.2 Détermination de l'espèce *C. jejuni* et *C. coli* par amplification génique (PCR)

### 2.2.1 Préparation des échantillons à partir d'une colonie bactérienne isolée sur milieu gélosé

A partir des isolements de campylobacter obtenus, une colonie est prélevée et remise en suspension dans 1 ml d'eau distillée stérile (soit $10^5$ à $10^6$ bactéries par essai PCR).

Les tubes contenant les suspensions bactériennes sont incubés au bain-marie à sec à 95-100° C pendant 10 min puis transférés dans de la glace pendant au moins 10 min. Le choc thermique engendré casse les membranes des bactéries et libère l'ADN.

La PCR peut être réalisée immédiatement ou les échantillons dénaturés conservés à +4°C sont analysés le lendemain.

**Tableau 24. Amorces utilisées pour l'identification des espèces *C. jejuni* et *C. coli* par PCR d'après (Denis, Soumet et al. 1999)**

| Gène cible | Amorces | Séquence (5'→3') | Température d'hybridation | Taille du produit (pb) |
|---|---|---|---|---|
| *mapA* | MDmapA1 | CTA TTT TAT TTT TGA GTG CTT GTG | 52°C | 589 |
| | MDmapA2 | GCT TTA TTT GCC ATT TGT TTT ATT A | | |
| *ceu*E | MDCOL3 | AAT TGA AAA TTG CTC CAA CTA TG | 52°C | 462 |
| | MDCOL2 | TGA TTT TAT TAT TTG TAG CAG CG | | |

### 2.2.2 Préparation du mélange PCR

Les réactions PCR sont réalisées sur l'appareil GenAmp$^{TM}$ 9700 (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT, USA). Les mélanges réactionnels sont réalisés dans un volume final de 50 µl pour une réaction PCR dans des microtubes Thin Walled PCR (Perkin Elmer). En concentration finale, les réactifs nécessaires sont :

- Tampon Gene Amp PCR Buffer II (sans $MgCl_2$) 1 X (Applied biosystem, Les Ulis, France) (Tris Hcl pH 8,3 : 10 mM, Kcl : 50 mM).
- Mélange de dNTP avec en final 200 µM de chaque dNTP.
- Solution de $MgCl_2$ (2,5 mM)
- Amorces, synthétisées par Sigma Aldrich, aliquotées à la concentration de 10 pmol/µl. Les amorces utilisées à la concentration de 0.42 µM. Les amorces issues du gène mapA sont spécifiques de C. jejuni et celles du gène ceuE sont spécifiques de C. coli (tableau 24).
- Amplitaq Gold (Perkin Elmer):1.5 unités

Deux µl d'échantillon lyses sont ajouté à 48 µl du mélange PCR pour un volume final de 50 µl.

### 2.2.3 Conditions des cycles PCR

Le programme PCR comprend un cycle initial de 2 min à 95°C pour activer la polymérase, puis 35 cycles de 30 s à 94°C (dénaturation de la matrice), 30 s à 52°C (hybridation des amorces), 30 s à 72°C (polymérisation). Une extension finale est réalisée à 72°C pendant 5 min avant conservations des produits de la réaction à +4°C.

### 2.2.4 Electrophorèse des acides nucléiques

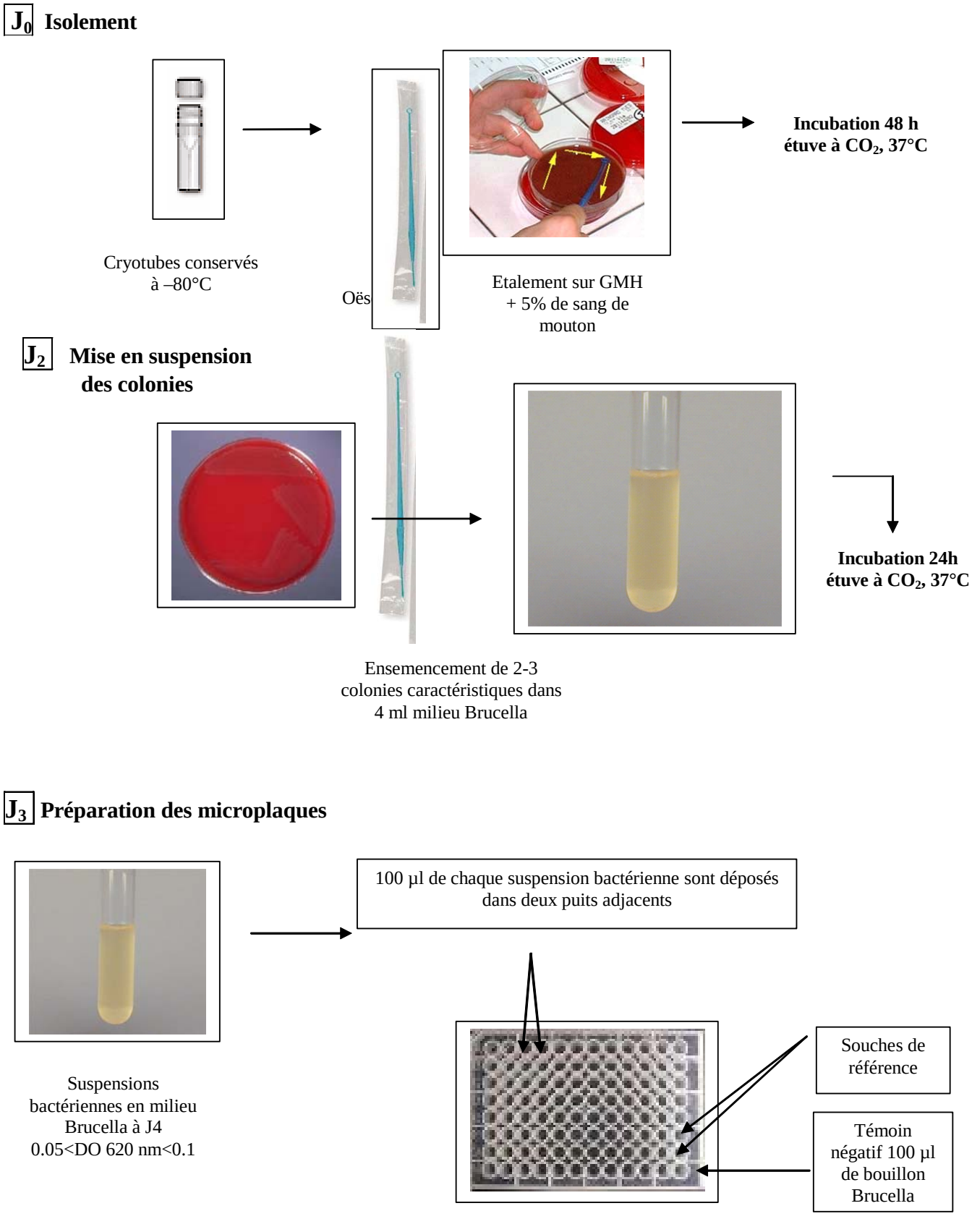
Les produits amplifiés sont analysés selon leur poids moléculaire par migration sur un gel d'agarose (agarose standard, Eurobio, France) 1% dans du tampon TBE 1X (Tris-borate EDTA ; Tris HCl 89 mM, acide borique 89 mM, EDTA 2 mM pH 8). Les dépots sont de 10 µl de produits PCR additionnés à 2 µl de tampon de charge 6X (orange loading dye, Promega, Charbonnières les Bains, France). Un marqueur de poids moléculaire est également déposé pour déterminer approximativement la taille des fragments analysés. Il s'agit soit de 5 µl PCR Markers (Promega) ou 5 µl du 100 pb DNA ladder (Promega). A pH 8 (pH de la solution), l'ADN chargé négativement migre vers la cathode. Après migration à 3-4 volts/cm pendant 1 h 30, les produits sont colorés dans une solution de bromure d'éthidium (BET) à 0.5 µg/ml. Ils sont visualisés sous UV et photographiés avec l'analyseur d'image Bio 1-D (Fisher Bioblock, Illkirch, France).

## 2.3 Mesure de la résistance aux antibiotiques

### 2.3.1 Antibiotiques testés

Les antibiotiques utilisés sont l'ampicilline (béta-lactamine), la tétracycline, l'érythromycine (macrolide), la gentamicine (aminoglycoside), l'enrofloxacine (quinolone 3$^{ème}$ génération) et la streptomycine (aminoglycoside). Tous les antibiotiques sont commercialisés par Sigma (Saint Quentin, France).

**Figure 22. Préparation des suspensions bactériennes pour la mesure de CMI**



### 2.3.2 Préparation des suspensions bactériennes pour la mesure des CMI (figure 22)

Les souches de campylobacter conservées à – 80 °C sont ensemencées sur des boites de Pétri contenant une gélose de Mueller-Hinton additionnée de 5% de sang de mouton défibriné. Ces boites sont incubées dans l'étuve à $CO_2$ Heracell 240 (Kendro, Courtaboeuf, France) en milieu microaérophile à une température de 37°C pendant 48 h. Une colonie par boite est ensuite transférée dans un tube stérile contenant 4 ml de bouillon Brucella. Les tubes sont incubés dans l'étuve à $CO_2$ en milieu microaérophile à 37°C pendant 24 h. A partir de chaque tube, 200 µl de suspension bactérienne sont transférés dans une microplaque (Greiner, VWR International, Pessac, France) à 96 puits. Chaque microplaque contient également un témoin négatif (bouillon Brucella) et deux souches de référence : *C. jejuni* ATCC 35560 et *C. coli* ATCC 35559. Ces souches sont utilisées à chaque mesure de CMI.

### 2.3.3 Mesure de la concentration minimale inhibitrice par une méthode de dilution en milieu gélosé

#### 2.3.3.1 Dénombrement des suspensions bactériennes

Après le transfert des suspensions bactériennes dans une microplaque de 96 puits, la densité optique (DO) est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Spectracount®, Packard Instuments, Rungis, France) à 620 nm et elle doit être comprise, pour chacun des puits, entre 0.05 et 0.1 ce qui correspond à $1.10^8$ à $2.10^8$ UFC/ml.

#### 2.3.3.2 Préparation des géloses contenant les dilutions d'antibiotiques

Pour chaque antibiotique, une série de dilutions de facteur 2 est préparée suivant les recommandations du CLSI (anciennement NCCLS (M7-A6-Vol.23 N°2-Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically ; approved standard- Sixth Edition-Janvier 2003). La préparation des géloses contenant les antibiotiques est illustrée dans la figure 23. Les concentrations finales sont les suivantes : pour l'ampicilline de 2 à 32 µg /ml, la tétracycline de 1 à 64 µg /ml, l'érythromycine de 0.25 à 32 µg /ml, la gentamicine de 0.25 à 8 µg /ml, l'enrofloxacine de 0.25 à 16 µg /ml et la streptomycine de 1 à 64 µg/ml.

#### 2.3.3.3 Ensemencement des géloses

Pour chaque série de concentrations testées, deux boites témoins de gélose GMH additionnée de 5% de sang sont préparées. Ces géloses ne contiennent pas d'antibiotiques et correspondent au témoin avant et après inoculation. A l'aide d'un multi-inoculateur, 1 à 2 µl des suspensions bactériennes de la microplaque sont déposés à la surface de la gélose (soit environ $10^5$ bactéries par spot). La première boîte ensemencée, témoin « 0-pré », permet de vérifier que les souches testées se multiplient. Les géloses sont ensuite inoculées dans l'ordre croissant des concentrations. Enfin, la dernière boîte de gélose inoculée, témoin « 0-post », permet de vérifier qu'il n'y a pas eu de transfert d'antibiotique par le biais de l'inoculateur entre chaque gélose. Les boites sont ensuite placées 48 h dans l'étuve à $CO_2$.

**Figure 23. Préparation des géloses contenant les antibiotiques ou les désinfectants**

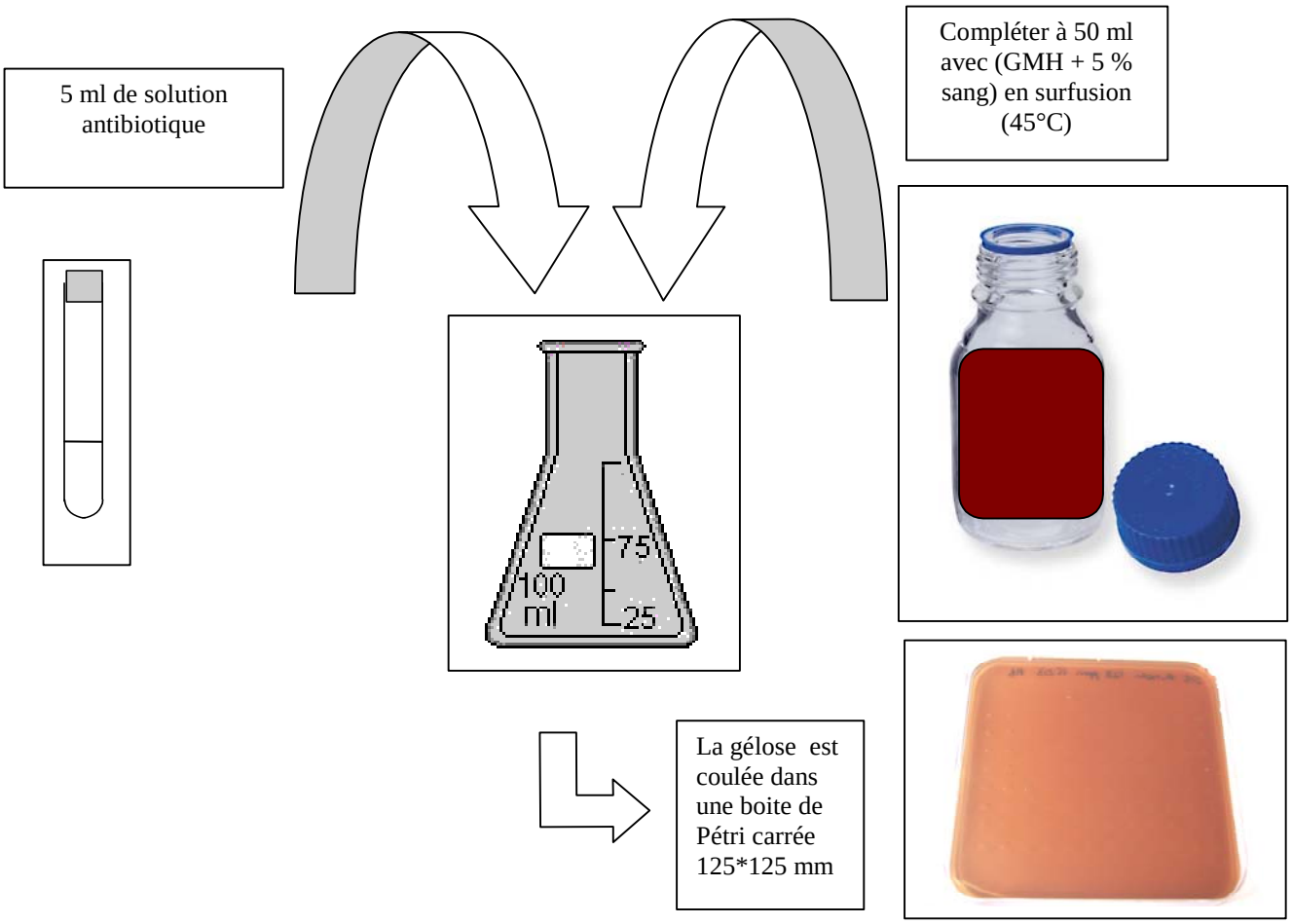



**Tableau 25. Valeurs de CMI admises pour *C. jejuni* (ATCC 33560) par la technique de dilution en milieu gélosé. (NCCLS 2002)**

| Antibiotique | CMI en µg/ml |
|---|---|
| Ciprofloxacine | 0.12-1 |
| Erythromycine | 1-8 |
| Gentamicine | 0.5-4 |
| Acide nalidixique | 8-32 |
| Tétracycline | 1-4 |

#### 2.3.3.4 Lecture des résultats

On observe le développement bactérien. La CMI correspond à la première concentration pour laquelle on n'observe plus de croissance. Les résultats sont validés si :

- la densité optique du puits de la microplaque est comprise entre 0.05 et 0.1
- les CMI des souches de référence sont comprises dans la fourchette des valeurs admises pour ces souches (tableau 25)
- il n'y a pas de croissance dans les puits des témoins négatifs
- la même croissance pour les souches est observée sur les boîtes « 0 pré » et « 0 post ».

Toutes les mesures de CMI ont été faites deux fois afin de confirmer la valeur observée. Lorsque les mesures étaient discordantes, une troisième mesure était réalisée. Si la troisième mesure était également discordante, la CMI de la souche n'était pas retenue pour le reste de l'étude.

#### 2.3.3.5 Contrôle des résultats de mesure des CMI

En 2004 et 2005, nous avons participé aux essais inter-laboratoire du programme ARBAO (antibiotic resistance in bacteria of animal origin) pour l'évaluation de la sensibilité de campylobacter aux antibiotiques par la méthode de dilution en milieu gélosé. Ces essais consistaient à analyser par an 8 souches de campylobacter (*C. jejuni et C. coli*) envoyé par le laboratoire de référence de l'Union européenne. Les résultats que nous avons obtenus correspondaient aux résultats attendus.

## 2.4 Mesure des CMI des désinfectants

Plusieurs techniques ont été utilisées pour mesurer la sensibilité des campylobacters aux désinfectants. Les résultats obtenus avec ces méthodes sont présentés dans le chapitre 3.

### 2.4.1 Désinfectants testés

Les désinfectants utilisés sont indiqués dans le tableau 26. Il s'agit de principes actifs de la famille des ammoniums quaternaires (le chlorure de didécyl-diméthyl ammonium CDDA (Bardac 22®)et le chlorure de benzalkonium CB (BTC 50®)) et de la famille des chlorés avec l'hypochlorite de sodium (XY12®).

### 2.4.2 Dilution en milieu gélosé

La préparation est identique à celle des géloses contenant les concentrations d'antibiotiques (figure 23 ). Les gammes de concentrations finales de désinfectant sont les suivantes : CDDA et CB de 0.5 à 32 µg/ml en ammoniums quaternaires. Ce protocole ne peut pas être utilisé pour l'hypochlorite de sodium car le produit réagit avec la gélose (formation de mousse et modification de couleur).

### 2.4.3 Diffusion en milieu gélosé

Les composés chlorés réagissant très fortement avec le milieu de croissance, l'étude de la sensibilité des campylobacters à ce désinfectant a été réalisée avec une méthode de diffusion en milieu gélosé. Cette méthode permet de limiter le contact entre le désinfectant et le milieu de croissance.

**Tableau 26. Produits désinfectants utilisés pour la détermination des CMI**

| Nom déposé et fournisseur | Principe actif | % de principes actifs | Famille |
|---|---|---|---|
| Bardac 22®<br>Lonza AG (Basel, Suisse) | Chlorure de N,N-didécyl-N,N-diméthylammonium (CDDA) | 50 | Ammoniums quaternaires |
| BTC 50®<br>Stepan Europe (Voreppe, France) | Chlorure de N-alkyl-N,N-diméthyl-N-benzylammonium (CB) | 50 | Ammoniums quaternaires |
| XY12®<br>Ecolab (Issy-les-Moulineaux, France) | Hypochlorite de sodium | 12.5 à 15 en chlore actif | Composés chlorés |

**Figure 24. Diffusion en milieu gélosé pour l'étude de la sensibilité à l'hypochlorite de sodium**

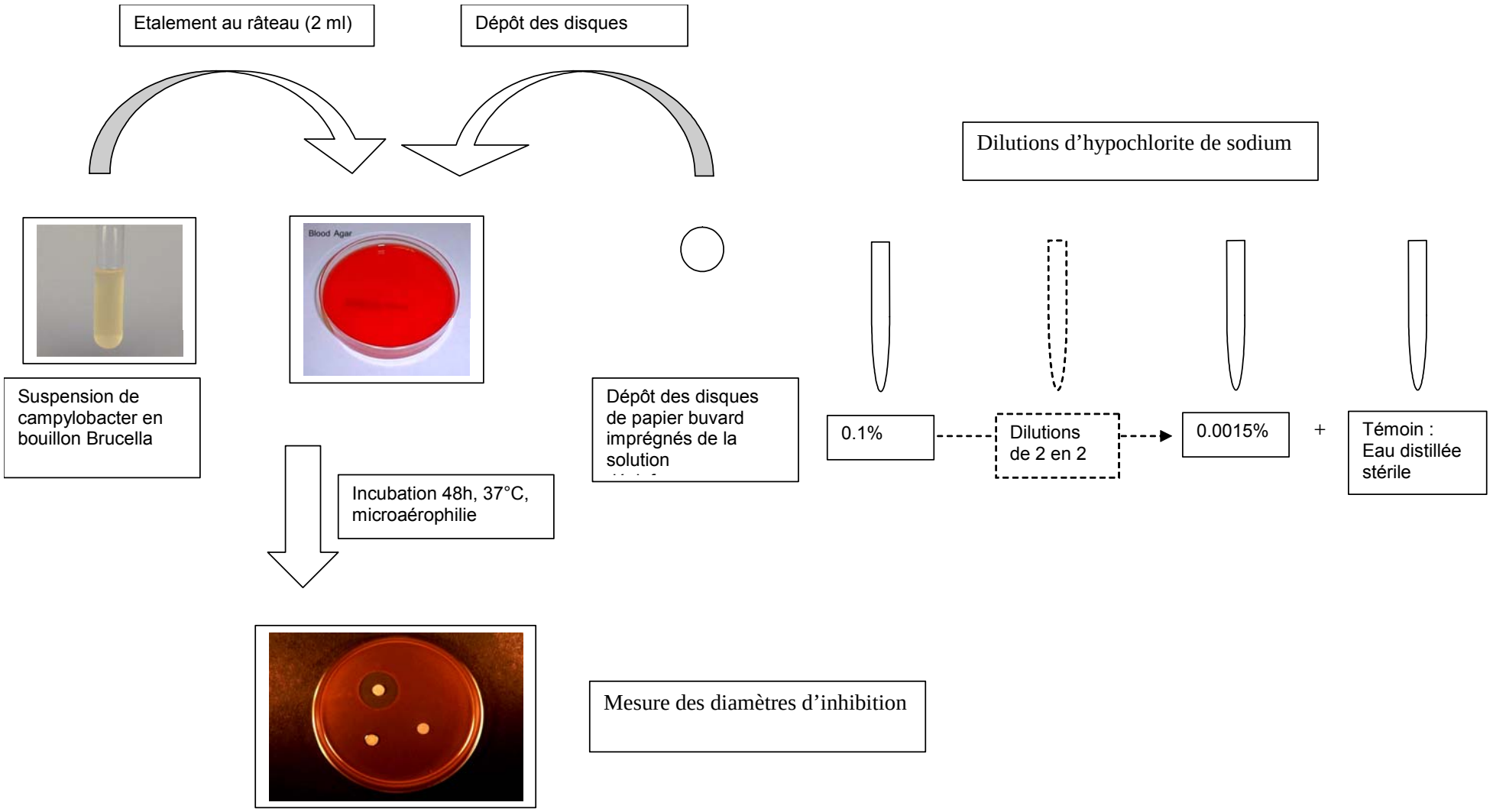


**Tableau 27. Séquences des amorces des gènes P*fla* et *gyr*A (Ragimbeau, Salvat et al. 1998)**

| Séquence amorce : 5'->3' | Identification | Taille des produits PCR (pb) |
|---|---|---|
| CTG GTT CTA GCC TTT TGG AAG C | GYR 1 | 2661 |
| GGA CAC TTA GCG ATG CTA ACC A | GYR 2 | |
| GAG CTT GTT TTA AAC ACG CGT GGT CGC | PFLA1 | 2026 |
| TGA TAG TCA ATG GCC TTA GGT GCG | PFLA2 | |

**Tableau 28. Mélange réactionnel pour la PCR des gènes P*fla* et *gyr*A**

| | Concentration | Volume (µl) pour une réaction | Concentration finale |
|---|---|---|---|
| XL PCR buffer II (Perkin Elmer) | 3.3 X | 15.15 | 1 X |
| Mg(OAc)2 (Perkin Elmer) | 25 mM | 2 | 1 mM |
| Amorce PflA sens | 20 µM | 0.25 | 0.1µM |
| Amorce PflA anti-sens | 20 µM | 0.25 | 0.1µM |
| Amorce Gyr A sens | 20 µM | 2.5 | 1 µM |
| Amorce Gyr A anti-sens | 20 µM | 2.5 | 1 µM |
| dNTP (Perkin Elmer) | 10 mM | 4 | 200 µM |
| r*Tth* polymerase XL (Perkin Elmer) | 2 U/µl | 1 | 2 U |
| Eau distillée stérile | | Qsp 45 µl | |

#### 2.4.3.1 Principe

Des disques de papier buvard, imprégnés du désinfectant à tester, sont déposés à la surface d'une gélose de Mueller-Hinton complémentée à 5% de sang de mouton défibriné, préalablement ensemencée avec une culture pure de la souche de campylobacter à étudier. Dès l'application des disques, le désinfectant diffuse en théorie de manière uniforme si bien que sa concentration est inversement proportionnelle au diamètre de la zone d'inhibition. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture. Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition ne dépendent uniquement que de la sensibilité du germe. A la limite des zones d'inhibition, il existe dans la gélose des concentrations de désinfectant égales aux CMI. Les méthodes de diffusion ne permettent pas de chiffrer directement ces valeurs. Toutefois, la sensibilité des souches les unes par rapport aux autres vis à vis de ce désinfectant peut être comparée par rapport à la taille du diamètre de la zone d'inhibition.

#### 2.4.3.2 Protocole expérimental (figure 24)

Dans chaque boite de Pétri, 2 ml de la suspension bactérienne en bouillon Brucella sont ensemencés avec un râteau. Le surplus est aspiré puis, dans chacune des boites, on place 4 disques de buvard stériles et sur chaque disque, on dépose 30 µl de chacune des concentrations que l'on veut tester. Les dilutions sont faites de deux en deux de 0.015% à 0.1% en chlore actif. Les boites sont ensuite placées à incuber pendant 48h à 37°C en milieu microaérophile. Les diamètres d'inhibition sont mesurés avec une règle graduée (en mm) après 48h d'incubation.

## 2.5 Typage moléculaire des campylobacters par PCR-RFLP des gènes polymorphes P*fla*/*gyr*A et *fla*A d'après (Ragimbeau, Salvat et al. 1998)

### 2.5.1 Préparation de l'ADN bactérien pour la PCR

Les bactéries sont cultivées à 37°C sur une gélose de Karmali en microaérophilie pendant 48 h. A l'aide d'une öese, le tapis bactérien est prélevé et remis en suspension dans 2.5 ml de Tris NaCl (10 mM Tris-HCl et 1 M NaCl pH 7.6). Après centrifugation (5000 g, 5 min), les bactéries sont récupérées et lavées à 2 reprises avec 2 ml de Tris NaCl. L'ADN bactérien est extrait avec un kit d'extraction rapide (Dneasy Tissue Kit$^{TM}$, Qiagen) selon les recommandations du fabricant. Les extraits d'ADN sont conservés à +4°C. Des dilutions peuvent être nécessaires pour obtenir une DO de 0.1 à 260 nm (équivalent à 5 ng/µl). La réalisation pratique de la PCR est identique à celle utilisée pour l'identification des espèces *C. jejuni* et *C. coli*. Les amorces des gènes et les températures des cycles PCR ont été optimisées pour les gènes étudiés (Ragimbeau, Salvat et al. 1998).

### 2.5.2 Conditions de la PCR multiplex des gènes *gyrA* et *pflA*

Les séquences des gènes P*fla* et *gyr*A sont indiquées dans le tableau 27.
Les réactifs nécessaires à la réaction de PCR des gènes P*fla* et *gyr*A sont indiqués dans le tableau 28.

**Tableau 29. Séquence des amorces du gène *fla*A (Ragimbeau, Salvat et al. 1998)**

| Séquence amorce : 5'->3' | Identification | Taille produits PCR (pb) |
|---|---|---|
| ATG GGA TTT CGT ATT AAC | Pg50 | 1448 |
| GCA CCY TTA AGW GTR GTT ACA CCT GC | RAA19 | |

W : A+T ; Y : C+T ; R : A+G

**Tableau 30. Préparation du mélange réactionnel pour la PCR du gène *fla*A**

| | Concentration | Volume (µl) par réaction | Concentration finale |
|---|---|---|---|
| XL PCR buffer II (Perkin Elmer) | 3.3 X | 15.15 | 1 X |
| Mg(OAc)2 | 25 mM | 2 | 1 mM |
| Amorce flaA 1 | 20 µM | 1 | 0.4 µM |
| Amorce flaA2 | 20 µM | 1 | 0.4 µM |
| dNTP (Perkin Elmer) | 10 mM | 4 | 200 µM chaque dNTP |
| r*Tth* polymerase XL (Perkin Elmer) | 2U/µL | 1 | 2 U |
| Eau distillée stérile | | Qsp à 45 | |

La matrice d'ADN nécessaire pour la réaction est de 25 ng d'ADN génomique (soit 5 µl d'une solution ADN à 5ng/µl). Le volume réactionnel final est de 50 µl.
Les paramètres d'amplification sont les suivants :

- Hotstart : 95°C – 3 min
- 18 cycles : 94°C 15 s – 60°C 30 s – ramp à 68°C 5 min
- 18 cycles : 94°C 15 s – 60°C 30 s – ramp à 68°C 6 min
- extension finale : 72°C – 10 min.
- maintient à +4°C

L'amplification a été réalisée sur le thermocylceur GenAmp$^{TM}$ 9700 (Applied Biosystems).

### 2.5.3 Conditions de la PCR du gène *fla*A

Les séquences des amorces du gène *fla*A sont indiquées dans le tableau 29.
Les réactifs nécessaires à la PCR du gène *fla*A sont indiqués dans le tableau 30.
La matrice d'ADN nécessaire pour la réaction est de 25 ng d'ADN génomique (soit 5 µl d'une solution ADN à 5ng/µl). Le volume réactionnel final est de 50 µl.
Les paramètres d'amplification sont les suivants :

- Hot start : 95°C – 60 s
- 30 cycles : 94°C 15 s – 45°C 30 s – ramp à 68°C 2 min
- extension finale : 72°C – 10 min
- maintient à +4°C

### 2.5.4 Séparation des produits amplifiés par électrophorèse en gel d'agarose

La présence des produits d'amplification est vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose 1%. Cinq µl de produit PCR sont déposés et 3 µl du marqueur Raoul (Eurobio, Les Ulis, France). Après migration pendant 1h30 à 3V/cm et coloration avec une solution de BET (0.5µg/ml), ils sont visualisés et analysés à l'aide de l'analyseur Bio-Capt. Les tailles attendues sont :

- Pour le produit PCR du gène *gyr*A : 2661 pb
- Pour le produit PCR du gène P*fla* : 2026 pb
- Pour le produit PCR du gène *fla*A : 1448 pb

### 2.5.5 Analyse par restriction enzymatique des produits de la PCR Multiplex et électrophorèse

#### 2.5.5.1 Restriction enzymatique des produits PCR issus des gènes P*fla* et *gyr*A

La restriction enzymatique est réalisée sur 8 µl de produits PCR *gyrA/PflA*. Les enzymes et les quantités utilisées sont :

- 5 U Hind III (10 U/µl,Q Biogene, Illkrich, France)
- 5 U Hinf I (10 U/µl,Q Biogene)
- 5 U Dde I (10 U/µl,Q Biogene)
- 5 U Hha I (10 U/µl,Q Biogene)

Le tampon 2 (Q Biogène) 1 X avec BSA (0.1 mg/ml) est ajouté et le tube est complété à 15 µl avec de l'eau distillée stérile. Il est placé pour l'incubation pendant 3 à 4 heures à 37°C au bain-marie.

#### 2.5.5.2 Restriction enzymatique du produit du gène *fla*A

La restriction enzymatique est réalisée sur 8 µl de produits PCR *fla*A. L'enzyme utilisée pour la restriction est DdeI (10 U/µl,Q Biogene) et 5 U sont nécessaires pour la restriction.
Le tampon 3 (Q Biogène) 1 X avec BSA (0.1 mg/ml) est ajouté en final et le tube est complété à 15 µl avec de l'eau distillée stérile. Il est placé pour l'incubation pendant 3 à 4 h à 37°C au bain-marie.

### 2.5.6 Séparation des fragments PCR digérés par une électrophorèse en gel d'agarose à 2.5 %

Un gel d'agarose à 2.5 % est préparé dans le tampon TBE 1 X auquel est ajouté une solution de BET. Quinze µl de chaque échantillon sont déposés sur le gel d'agarose avec un marqueur de poids moléculaire tous les 6 puits (5 µl de marqueur φX174-HaeIII, Promega). L'électrophorèse dure 4 h à 3 V/cm.
Les temps de migration doivent être respectés pour avoir des résultats reproductibles et comparables entre les différentes souches testées.

### 2.5.7 Analyse des profils d'électrophorèse

Les images des gels sont capturées sous UV par un système vidéo Bio-Capt (Fisher Bioblock, Illkirch, France) et enregistrées sous le format Tif (pour être exploitables sous le logiciel Molecular Analyst Software FingerPrinting, Biorad – disponible à Ploufragan). Les profils électrophorétiques sont comparés en terme de positions communes ou différentes des bandes observées (Ragimbeau, Salvat et al. 1998; Rivoal, Denis et al. 1999).

# CHAPITRE 3. RESULTATS PRELIMINAIRES : METHODOLOGIE DE L'ETUDE DE LA SENSIBILITE AUX DESINFECTANTS

## 1 Introduction

L'ensemble des méthodes utilisées pour mesurer la sensibilité des bactéries aux désinfectants sont des méthodes initialement élaborées pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

Les méthodes de mesure de la sensibilité rejoignent les objectifs des méthodes de typage et doivent donc présenter les qualités suivantes :

- Elles doivent avoir un pouvoir discriminant suffisant pour permettre le classement des souches en sous-population sensible et résistante
- Elles doivent être répétables et reproductibles
- Elles doivent pouvoir être applicables à toutes les souches bactériennes de l'espèce ou du genre considéré
- Elles doivent être faciles à mettre en œuvre, pour un coût modéré

Les antibiotiques et les désinfectants présentent des modes d'action différents et les désinfectants sont beaucoup plus sensibles aux conditions physico-chimiques du milieu que les antibiotiques.

Ainsi, l'étude de la sensibilité aux désinfectants pose deux problèmes majeurs par rapport aux antibiotiques : l'un d'ordre terminologique et l'autre d'ordre méthodologique :

- Il n'existe pas pour l'instant de définition standardisée de la résistance aux désinfectants et les différentes définitions données dans la littérature sont le plus souvent propres aux auteurs qui les proposent. La définition de la résistance étant intrinsèquement liée à la méthode d'étude choisie, l'idéal serait de pouvoir disposer d'une méthode permettant la mise en évidence, sans avoir recours à un seuil arbitraire, de deux sous-populations ou plus, comme cela est souvent le cas pour les distributions de CMI des bactéries vis à vis des antibiotiques.
- Les désinfectants sont très sensibles à la présence de la matière organique. Lorsqu'ils sont mélangés dans un milieu de culture pour les bactéries on ignore quelle quantité de désinfectant est encore active et disponible dans le milieu et si le milieu est toujours favorable à la croissance bactérienne.

A l'heure actuelle, seule la méthode de mesure des CMB permet d'évaluer l'efficacité des désinfectants. Malheureusement, cette méthode ne permet pas de mettre en évidence de petites variations de sensibilité des bactéries aux désinfectants.

Les méthodes présentées dans ce chapitre, que nous avons évaluées, avaient pour objectifs :

- soit d'améliorer le pouvoir discriminant de méthodes disponibles pour l'évaluation de la sensibilité au désinfectant (diminution des pas de dilution, ajout de désinfectant dans un milieu sélectif),
- soit de mettre au point des méthodes permettant de s'affranchir des difficultés liées aux interactions entre les désinfectants et les milieux de culture (diffusion en milieu gélosé).

**Figure 25. Distribution des CMI des souches de *C. jejuni* pour le chlorure de benzalkonium (gamme de dilutions de 2 en 2)**

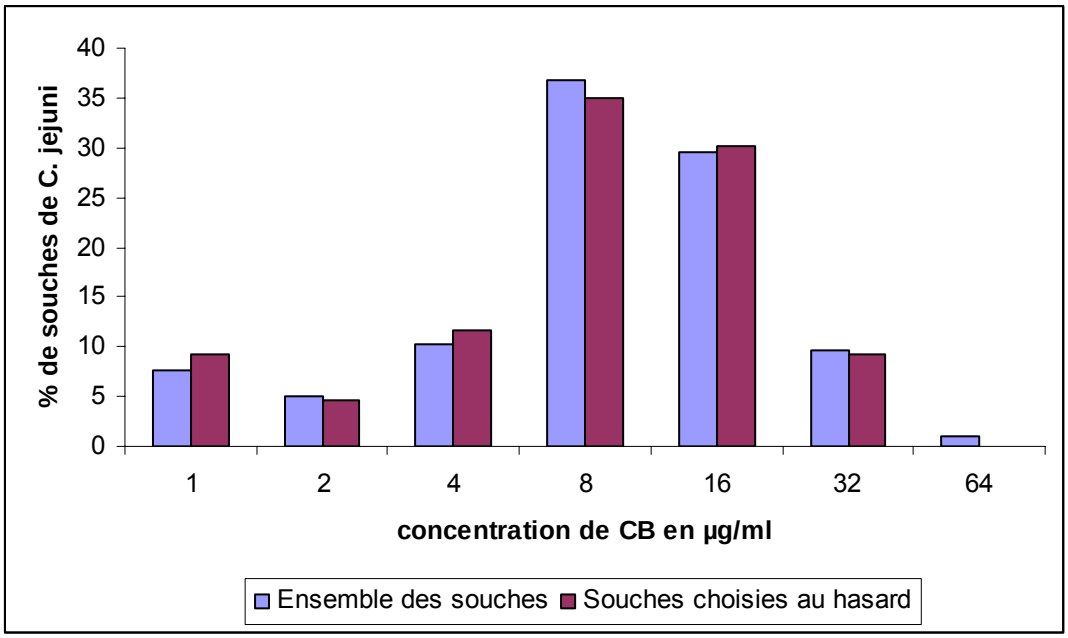
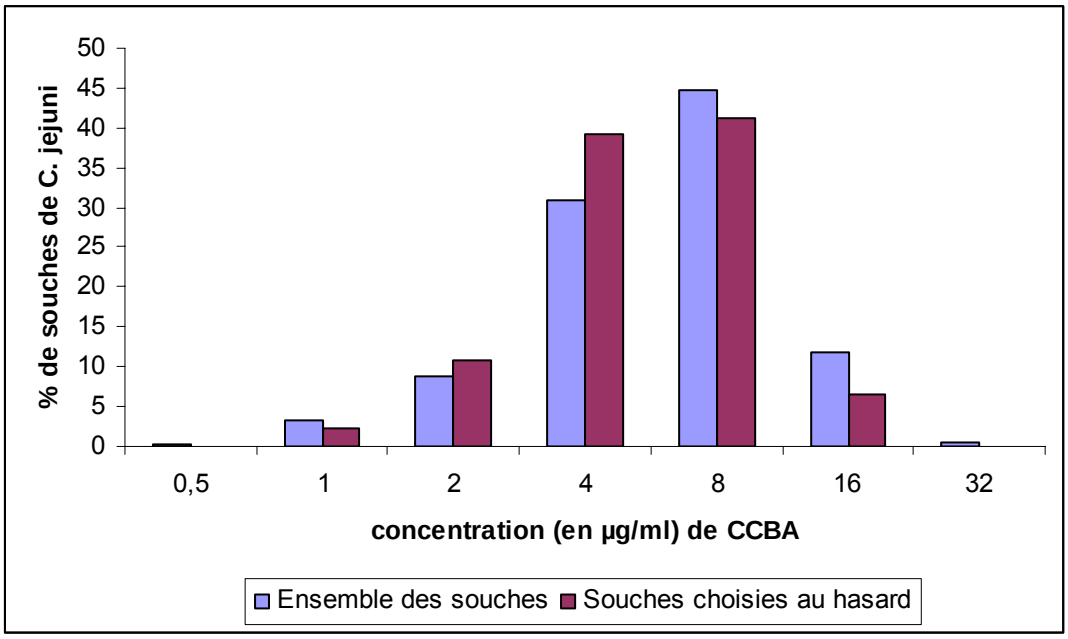



**Figure 26. Distribution des CMI des souches de *C. jejuni* pour le chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium (CDDA) (gamme de dilutions de 2 en 2)**



# 2 Diminution des pas de dilution des solutions désinfectantes

La méthode de dilution en milieu gélosé utilisée dans notre étude pour les désinfectants est adaptée directement de la méthode utilisée pour les antibiotiques. Les pas de dilutions sont de 2 en 2, ce qui entraîne de grands écarts de concentrations pour les premières dilutions. Pour la majorité des antibiotiques, les courbes de distribution obtenues ont une allure bimodale ce qui permet aisément de distinguer deux sous-populations au sein de la population testée. Pour les composés d'ammoniums quaternaires, les courbes de distributions des CMI des souches de notre étude sont monomodales. Afin de vérifier qu'une courbe bimodale des distibutions n'était pas masquée par de trop grands pas de dilution, une gamme de dilution a été repréparée avec des pas de dilution plus petits pour les valeurs de CMI les plus fréquemment observées.

## 2.1 Sélection des souches

Dans notre collection d'isolats (651 isolats), la majorité appartient à l'espèce *C. jejuni*, nous avons donc sélectionné au hasard 60 souches de *C. jejuni*. Les distributions de CMI de l'ensemble des souches de la collection et des souches sélectionnées pour le chlorure de benzalkonium (CB) et le didécyl-diméthyl ammonium (CDDA) sont représentées respectivement sur les figures 25 et 26. Les souches tirées au hasard sont représentatives de l'ensemble des souches de la collection.

## 2.2 Gammes de dilutions étudiées

### 2.2.1 Chlorure de benzalkonium

Pour le chlorure de benzalkonium, près de 70% des isolats de *C. jejuni* ont une valeur de CMI égale à 8 ou 16 µg/ml. Pour ce désinfectant, les concentrations testées sont : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 16, 24 et 32 µg/ml.

### 2.2.2 Chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium

Pour le chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium, près de 80% des isolats de *C. jejuni* ont une valeur de CMI égale à 4 ou 8 µg/ml. Pour ce désinfectant, la gamme de dilution est donc étendue entre 2 et 10 µg/ml. Les concentrations testées sont : 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 16 et 32 µg/ml.
Pour chaque mesure, l'expérience a été répété deux fois.

## 2.3 Courbes de distribution des CMI avec des pas de dilution réduits

Les courbes de distribution sont présentées sur la figure 27 pour le chlorure de benzalkonium et sur la figure 28 pour le chlorure de didécyl-diméthyl ammonium.
Pour le chlorure de benzalkonium, les souches qui présentaient une CMI de 8 ou 16 µg/ml sont dispersées sur les valeurs intermédiaires entre 4 et 12 µg/ml. Comme les pas de dilution sont petits (12 pas de dilution) et qu'il y a peu de souches testées (43 valeurs retenues pour le chlorure de benzalkonium), la distribution est étalée assez uniformément sur l'ensemble des valeurs étudiées.

**Figure 27. Courbes de distribution des CMI du chlorure de benzalkonium (pas de dilution réduits)**

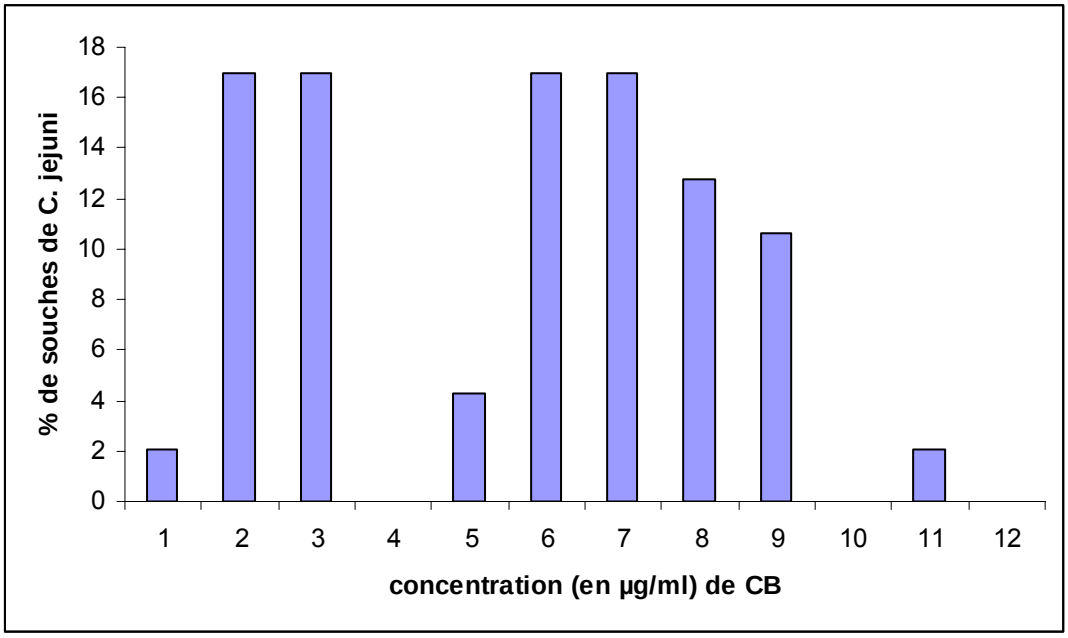
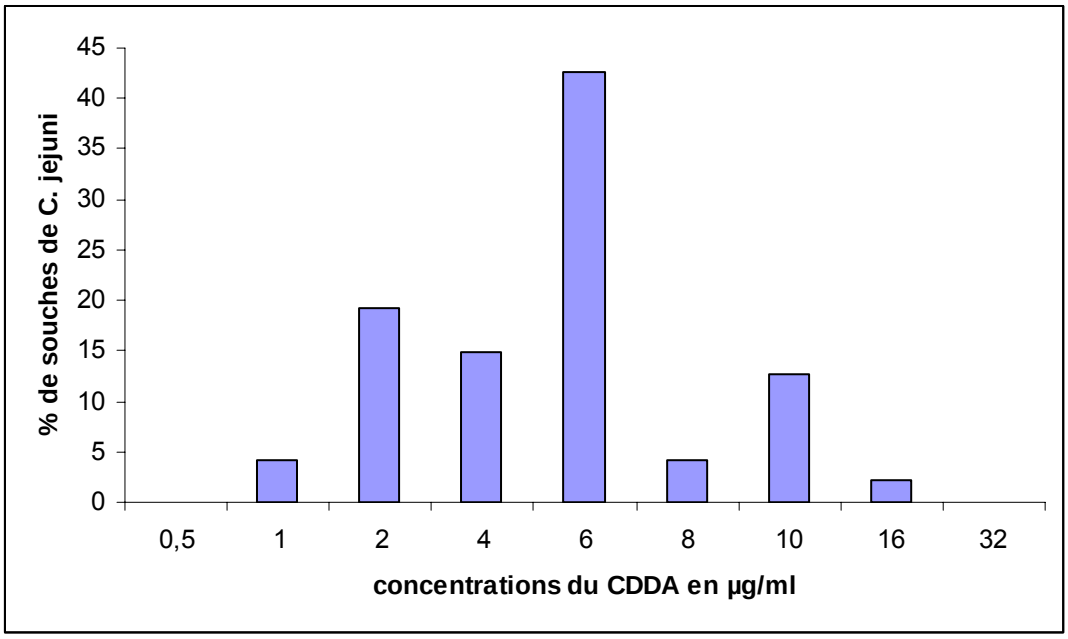



**Figure 28. Courbes de distribution des CMI du chlorure de didécyl-diméthyl ammonium (pas de dilutions réduits)**



Pour le chlorure de didécyl diméthyl ammonium, la courbe de distribution des CMI est proche de celle observée avec les pas de dilution de 2 et les souches qui étaient auparavant sur les valeurs 4 et 8 µg/ml se retrouvent sur les valeurs 4 et 6 µg/ml.

## 2.4 Intérêt de la diminution des pas de dilution des molécules désinfectantes pour l'étude de la sensiblité aux antibiotiques

Pour ces deux molécules, la diminution des écarts de dilution dans la gamme ne permet pas de mettre en évidence deux sous-populations distinctes. Il n'y a donc pas d'intérêt, pour *C. jejuni* et pour ces deux molécules d'ammoniums quaternaires d'augmenter le nombre de dilutions testées.

# 3 Utilisation de molécules désinfectantes dans le milieu sélectif de Virion

## 3.1 Principe

L'étude de la résistance aux désinfectants suppose de travailler sur un phénomène rare. Par conséquent, on peut supposer que les souches résistantes aux désinfectants sont peu représentées dans les populations de bactéries prélevées dans les abattoirs. En raison de la méthode d'isolement utilisée, seules les bactéries les plus compétitives sont détectables. Pour favoriser la détection de bactéries présentes en petit nombre au départ, un milieu sélectif additionné d'un désinfectant dédié à leur sélection a été utilisé.

## 3.2 Méthode

Les milieux sélectifs utilisés pour l'isolement des campylobacters à partir des prélèvements d'abattoir sont le milieu de Karmali et le milieu de Virion. Cette méthode n'a été utilisée qu'au cours de 2 visites.

### 3.2.1 Comparaison des CMI en milieu de Karmali par rapport à la GMH

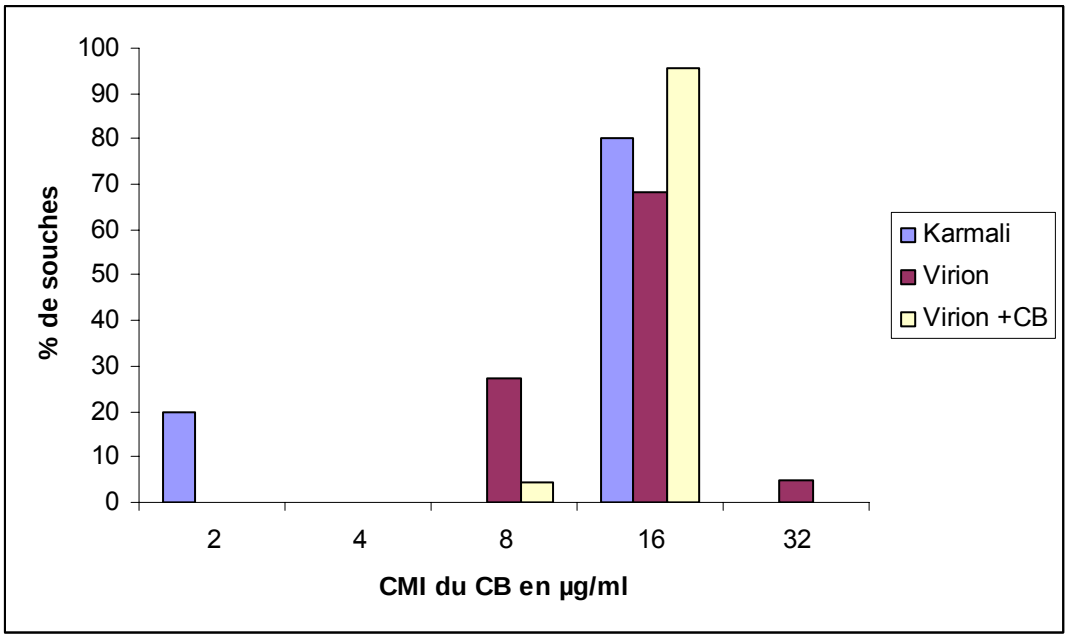
Le milieu de Karmali est un milieu contenant du charbon. Sur ce milieu contenant des concentrations croissantes de CB (de 0 à 25 µg/ml), 8 souches de *C. jejuni* présentant des CMI en GMH de 1.5 à 25 µg/ml ont été testées. Pour toutes les souches, la croissance était identique à la croissance dans la boite témoin quelque soit la concentration de CB ajoutée au milieu de Karmali. Le CB n'est donc plus actif en milieu de Karmali.

### 3.2.2 Comparaison des CMI en milieu de Virion par rapport à la GMH

Le milieu de Virion est une gélose de Mueller-Hinton complémentée avec du sang de mouton défibriné (5%) et des antibiotiques. Les deux souches de référence *C. jejuni* ATCC 33560 (CMI du CB en GMH=6.25 µg/ml)et *C. coli* ATCC 33559 (CMI du CB en GMH=12.5µg/ml) ont été utilisées. De la même façon que pour le milieu de Karmali, le milieu de Virion a été additionné avec des concentrations croissantes de CB de 0 à 32 µg/ml. Les résultats obtenus montrent que :

- Le milieu de Virion reste sélectif en présence de chlorure de benzalkonium aux concentrations testées

**Figure 29. Distribution des CMI du chlorure de benzalkonium en fonction du milieu d'isolement**



- La CMI observée avec le milieu de Virion est augmentée d'une dilution par rapport à la CMI mesurée avec la GMH.

Le milieu retenu est donc le milieu de Virion.

### 3.2.3 Choix de la concentration de chlorure de benzalkonium ajoutée dans le milieu de Virion

La concentration de chlorure de benzalkonium ajoutée dans le milieu de Virion a été calculée en fonction de la $CMI_{90}$ déterminée à partir de l'ensemble des isolats issus des prélèvements réalisés dans les abattoirs. Cette $CMI_{90}$ est de 16 µg/ml. La CMI correspond à la première concentration pour laquelle on n'observe pas de croissance, la concentration retenue a donc été de 8 µg/ml ($CMI_{90}$ diminuée d'une dilution).

## 3.3 Résultats

Lors du premier essai, à la concentration de chlorure de benzalkonium de 8 µg/ml, tous les isolements réalisés à partir des prélèvements positifs sur les milieux de Karmali et de Virion pour campylobacter étaient négatifs. La concentration de chlorure de benzalkonium ajoutée dans le milieu sélectif a donc été diminuée à 4 µg/ml. Cette concentration a été utilisée pour le traitement des prélèvements au cours d'une visite dans l'abattoir 3.

A 4 µg/ml, toutes le boites d'isolement contenant le milieu de Virion additionné de CB étaient positives pour campylobacter (si des campylobacters étaient présents sur les deux autres boites Karmali et Virion). Cette concentration a été utilisée pour le traitement des prélèvements collectés au cours d'une visite dans l'abattoir 4. Au cours de cette visite, 8 isolats ont été collectés sur milieu de Karmali, 22 sur le milieu de Virion et 23 sur le milieu de Virion additionné de CB (4 µg/ml). La distribution des CMI des isolats collectés, en fonction de leur milieu d'isolement, est indiquée sur la figure 29. Les isolats obtenus sur le milieu de Virion additionné de CB ne présentaient pas une CMI augmentée par rapport aux autres isolats obtenus dans le même prélèvement. Cependant, on peut noter que les souches présentant la CMI la plus élevée (32 µg/ml) n'ont pas été isolées à partir du milieu contenant le chlorure de benzalkonium.

## 3.4 Conclusion : intérêt des milieux sélectifs contenant un désinfectant pour la sélection des bactéries résistantes aux désinfectants

De la même façon que les résistances rares des bactéries aux antibiotiques peuvent être détectées en réalisant les isolements sur des milieux complémentés en antibiotiques, il doit être possible de détecter les bactéries résistantes aux désinfectants sur des milieux additionnés en désinfectant. Pour des raisons matérielles (fin des prélèvements), la recherche de la concentration sélective de chlorure de benzalkonium à ajouter dans le milieu de Virion n'a pas pu être achevée, cependant, il aurait pu être intéressant de tester les concentrations intermédiaires (entre 4 et 8 µg/ml). Ces premiers résultats ne démontrent pas l'intérêt d'un milieu sélectif contenant du chlorure de benzalkonium.

**Figure 30. Diamètres d'inhibition pour *C. jejuni***

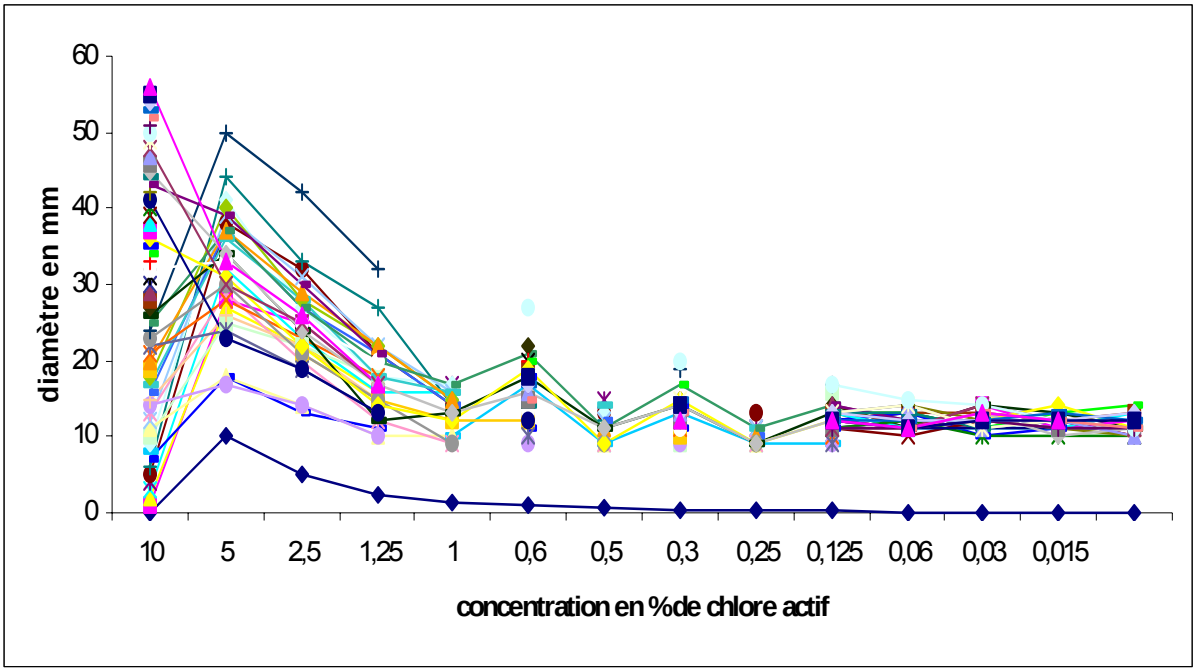
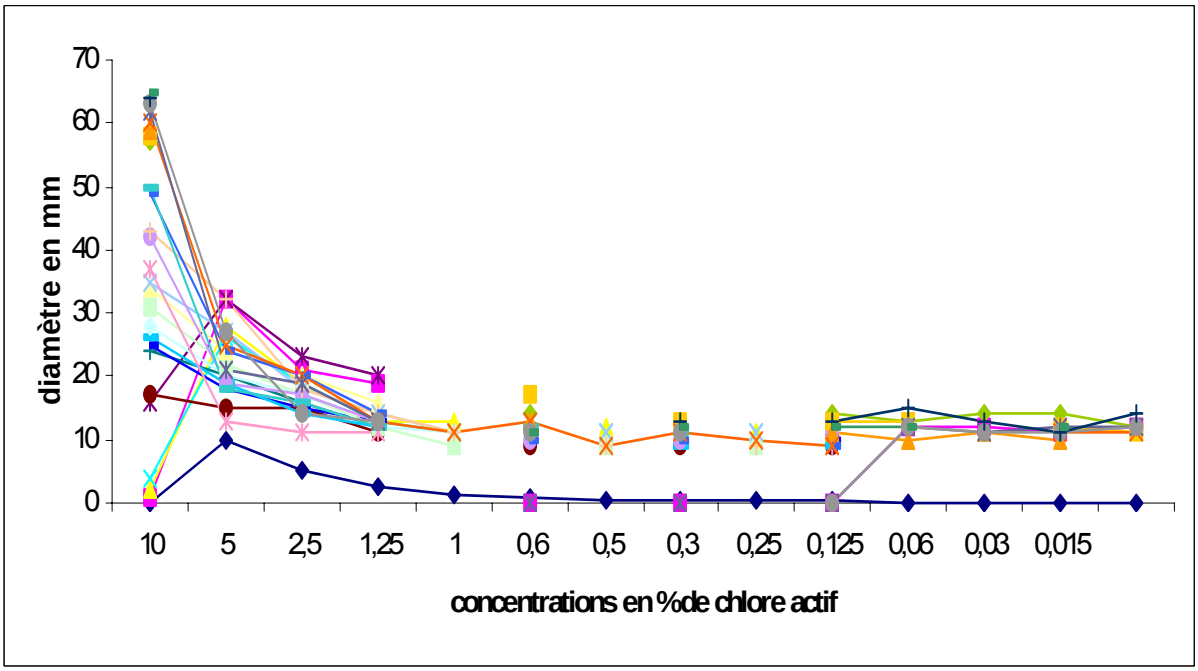



**Figure 31. Diamètres d'inhibition pour *C. coli***



# 4 Mesure de la CMI de l'hypochlorite de sodium par la méthode de diffusion en milieu gélosé

La détermination des CMI de l'hypochlorite de sodium ne peut pas être mesurée en ensemençant les souches sur des géloses contenant ce désinfectant. En effet, le mélange de la gélose avec les produits chlorés entraîne une réaction gazeuse avec formation de mousse à la surface et décoloration de la gélose. Après incubation dans l'étuve à $CO_2$, les colonies ne présentent pas de croissance, ce qui est probablement lié à une altération du milieu de croissance. Nous avons donc tenté d'adapter pour cette molécule une méthode de diffusion utilisée pour les antibiotiques.

## 4.1 Souches de campylobacter utilisées

Pour l'étude de la sensibilité à l'hypochlorite de sodium, 56 souches de *C. jejuni* et 25 souches de *C. coli* ont été utilisées. Ces souches, d'origine aviaire, nous ont été fournies par l'AFSSA site de Ploufragan.

## 4.2 Courbes des diamètres d'inhibition

Les diamètres d'inhibition sont mesurés en millimètres. L'expérimentation a été répétée à deux reprises pour 28 souches.

Les courbes des diamètres d'inhibition pour l'espèce *C. jejuni* et *C. coli* sont indiquées sur les figures 30 et 31 respectivement. On observe pour les deux espèces que le diamètre d'inhibition est d'autant plus grand que la quantité d'hypochlorite de sodium déposée sur le disque est importante.

## 4.3 Distribution des diamètres

Pour l'espèce *C. jejuni*, les souches sont discriminées pour les concentrations comprises entre 1,25 et 10% de chlore (figure 30). Pour *C. coli*, il n'y a plus de différence de valeur de diamètre d'inhibition à partir de la concentration de 2.5% de chlore (figure 31).

Sur ces figures, les souches semblent se répartir sur les différentes valeurs des diamètres d'inhibition ce qui ne permet pas de séparer deux ou plusieurs sous-populations au sein des échantillons de souches de campylobacter testées.

## 4.4 Intérêts et inconvénients de la mesure des diamètres d'inhibition

Le chlore est une molécule très réactive qui ne peut être étudiée comme les autres molécules désinfectantes avec la méthode de dilution en milieu gélosé. La diffusion en milieu gélosé permet donc une première approche de la sensibilité à ce désinfectant. Cependant, elle ne permet pas plus que la méthode de dilution en milieu gélosé de distinguer des sous-population différentes. Cette méthode présente l'inconvénient par rapport à la méthode de mesure des CMI en milieu d'être très lourde à mettre en œuvre car elle nécessite beaucoup de matériel (deux boites de Petri par mesure et par souche) et elle est très chronophage.

# 5 Conclusion et conséquences pour la suite de l'étude

L'étude de la sensibilité des bactéries et de campylobacter en particulier aux désinfectants est délicate car nous ne possédons pas, pour l'instant, de méthode d'étude qui nous permette d'observer, comme pour les antibiotiques, des caractéristiques fondamentales permettant de distinguer des bactéries sensibles ou résistantes. Il semble que, de la même manière que ce qui est observé pour les antibiotiques, la résistance aux désinfectants doive se concevoir dans un contexte global d'écologie microbienne et non pas seulement au niveau de la cellule bactérienne.

Les résultats de ces pré-études nous ont permis d'éliminer certaines hypothèses : quelle que soit la méthode choisie, nous ne distinguons pas de sous-populations. Néanmoins, nous pouvons mettre en évidence des différences de sensibilité des bactéries qui se traduisent par des écarts entre les résultats observés.

Pour les désinfectants, quelles conclusions pouvons-nous tirer des observations faites au laboratoire ? Les molécules désinfectantes ne sont pas utilisées seules, mais le plus souvent au cours d'une procédure de nettoyage et de désinfection, qui implique l'utilisation de différentes molécules. La présence de souches bactériennes après nettoyage et désinfection sur le terrain est-elle le résultat d'une résistance spécifiquement orientée contre une molécule désinfectante ou d'une résistance provenant de la combinaison de mécanismes complexes non identifiés à ce jour et de toute façon impossible à élucider dans le cadre des études au laboratoire trop restrictives pour l'écologie microbienne.

Pour la suite de notre étude, la méthode retenue pour l'étude de la sensibilité des campylobacters aux désinfectants est la méthode de dilution en milieu gélosé. Ses principaux inconvénients sont que les concentrations de désinfectants réellement actives dans le milieu ne sont pas connues et elle ne permet pas de discrimination nette au sein de la population de campylobacter étudiée. De plus, les concentrations qui peuvent être testées sont très faibles par rapport aux concentrations utilisées sur le terrain. Mais elle présente l'avantage d'être très standardisée et applicable facilement à un grand nombre de souches. La conséquence de l'utilisation de cette méthode pour campylobacter est terminologique : le terme de « moindre sensibilité » semble le plus adapté pour décrire les souches qui présentent une CMI élevée par rapport aux autres souches.

# CHAPITRE 4. ISOLEMENT DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* APRES NETTOYAGE ET DESINFECTION DANS LES ABATTOIRS DE VOLAILLES : ANALYSE D'UNE SOURCE POTENTIELLE DE CONTAMINATION DES CARCASSES

## 1 Introduction

En France, une étude réalisée en 1994 a montré que 60 à 100% des volailles entrant à l'abattoir étaient contaminées par campylobacter (Rivoal, Denis et al. 1999). Le plan de surveillance des campylobacters sur les volailles en 2004 a mis en évidence que 85% des prélèvements réalisés à l'abattoir étaient positifs pour campylobacter (Hellard and Kempf 2005).

Les sources de contamination des carcasses et les mécanismes de contamination croisée des carcasses par les campylobacters au cours de l'abattage des volailles ne sont pas complètement élucidés. Les sources de contamination identifiées des carcasses par campylobacter sont principalement le matériel de la chaîne d'abattage (Rivoal, Denis et al. 1999; Alter, Gaull et al. 2005) et les caisses de transport (Slader, Domingue et al. 2002; Hansson, Ederoth et al. 2005; Rasschaert, Houf et al. 2007).

La maîtrise de la contamination des carcasses de volaille pendant les procédés d'abattage, en particulier pour les lots de volailles initialement indemnes de campylobacter, pourrait être un moyen de diminuer le risque pour le consommateur. Cependant, en raison de l'automatisation et de la rapidité de l'abattage des volailles et de l'utilisation intensive d'eau pendant les procédés d'abattage, il est très difficile (voire impossible) d'empêcher la contamination croisée des carcasses (Borck and Pedersen 2005).

Une approche proposée pour empêcher la contamination des lots de volailles initialement indemnes pour campylobacter est de déterminer le statut du lot avant l'abattage et donc de faire abattre les lots négatifs avant les lots positifs (Wagenaar, Mevius et al. 2006). Cette approche nécessite d'avoir une méthode fiable pour la détermination du statut du lot, et ne prend pas en compte les risques de contamination des volailles au cours du transport par des caisses contaminées. Cette mesure sous-entend également que les campylobacters ne peuvent pas persister dans l'environnement de l'abattoir après les procédures de nettoyage et de désinfection.

Le peu d'études sur la sensibilité des campylobacters aux désinfectants montrent que les campylobacters sont sensibles aux désinfectants utilisés en industrie agroalimentaire (Blaser, Smith et al. 1986; Avrain, Allain et al. 2003). De plus, jusqu'à récemment(Johnsen, Kruse et al. 2007), les campylobacters n'avaient jamais été isolés de prélèvements réalisés dans les abattoirs de volailles après nettoyage et désinfection (Borck, Stryhn et al. 2002; Miwa, Takegahara et al. 2003; Cools, Uyttendaele et al. 2005; Malakauskas, Jorgensen et al. 2006).

L'objectif de cette étude est de déterminer si les campylobacters peuvent être isolés sur des surfaces en contact avec les carcasses pendant les procédés d'abattage, après les procédures de nettoyage et de désinfection dans les abattoirs de volailles. Le deuxième objectif est de déterminer si les campylobacters isolés après nettoyage et désinfection sur la chaîne d'abattage sont une source potentielle de contamination des carcasses de volailles.

# 2 Publication

## 2.1 Résumé

Les campylobacters sont la première cause d'entérite d'origine bactérienne chez l'homme dans le monde. Ces bactéries sont généralement considérées sensibles à l'action des molécules désinfectantes utilisées en industrie agroalimentaire. L'objectif de cette étude est de déterminer si les campylobacters peuvent survivre aux opérations de nettoyage et désinfection dans les abattoirs de volaille et si les souches isolées après nettoyage et désinfection peuvent contaminer les carcasses pendant l'abattage des volailles. Des prélèvements ont été réalisés dans l'environnement de 4 abattoirs avant et après nettoyage et désinfection (caisses de transport, surfaces en contact avec les carcasses pendant l'abattage et eau du bac d'échaudage) et sur les volailles (fientes dans les caisses de transport et peaux de cou avant l'entrée en salle de ressuage des carcasses). Au total, 7 visites ont eu lieu dans les 4 abattoirs. Des souches de *C. jejuni* ont été isolées à partir de prélèvement de surfaces après nettoyage et désinfection dans 3 des 4 abattoirs visités (9 prélèvements étaient positifs sur les 51 prélèvements réalisés). La suite de l'étude a été restreinte à un seul abattoir afin d'étudier le passage des souches isolées après nettoyage et désinfection sur les carcasses pendant l'abattage. Le phénotype (P) de résistance aux antimicrobiens ( 6 antibiotiques et 2 molécules d'ammoniums quaternaires) des souches de *C. jejuni* collectées à partir des prélèvements des volailles et de l'environnement a été déterminé par la méthode de dilution en milieu gélosé. Sur l'ensemble des souches isolées dans cet abattoir, 9 phénotypes ont été observés dont trois qui étaient également identifiés sur des isolats collectés après nettoyage et désinfection. Le génotype (G) des souches présentant un de ces trois phénotypes d'intérêt a été déterminé par la technique de PCR-RFLP. La combinaison des résultats du phénotype et du génotype a conduit à l'identification de types (P*G) d'isolats. Ces isolats ont ensuite été comparés en fonction de leur origine (fientes, caisses de transport, peaux de cou, surfaces après nettoyage et désinfection) et de leur type (P*G). Un seul type (P*G) a été observé à la fois sur les surfaces après nettoyage et désinfection et sur les carcasses avant ressuage, mais ce type a également été détecté dans les prélèvements des caisses de transport. Nos résultats démontrent que les campylobacters sont capables de survivre aux opérations de nettoyage et de désinfection dans les abattoirs de volailles. Nos résultats suggèrent que ces souches puissent contaminer les carcasses de volailles pendant les procédés d'abattage mais l'hypothèse d'une contamination à partir des caisses de transport n'a pas pu être éliminée.

## 2.2 Article soumis à International Journal of Food Microbiology le 08 juin 2007

# 3 Perspectives

## 3.1 Critique de la méthode de phénotypage utilisée

Dans cette étude, nous n'avons pas pu conclure formellement que les souches de *C. jejuni* isolées après nettoyage et désinfection sur les surfaces de l'abattoir contaminaient les carcasses de volaille pendant les procédés d'abattage puisque le même type P2G1 a été retrouvé dans les prélèvements des caisses de transport des volailles. Le problème est donc de déterminer précisément d'où provient le type P2G1 isolé à partir des prélèvements de peaux de cou de volailles car il a été isolé dans les prélèvements de surfaces après nettoyage et désinfection, mais également dans les caisses de transport des volailles. Or, il a été démontré que les campylobacters présents dans les caisses de transport pouvaient entraîner une contamination superficielle du plumage des volailles pendant le transport (Rasschaert, Houf et al. 2007). Le type P2G1 n'a été isolé dans aucun des prélèvements de fientes des lots abattus, on peut donc exclure (sous réserve du bais d'échantillonage) que le type P2G1 provienne du tube digestif des oiseaux abattus. Afin de déterminer précisément l'origine du type P2G1 retrouvé sur les peaux de cou, deux approches sont possibles, séparément ou combinées : soit en améliorant le plan de prélèvement, soit en améliorant la méthode de typage.

- Amélioration du plan de prélèvement

Dans cette étude, nous ne pouvons pas expliquer la présence du type P2G1 dans les caisses de transport. Le prélèvement des caisses de transport avant le chargement des animaux aurait permis dans un premier temps de savoir si ce type était présent initialement dans les caisses de transport. Dans le cas où ce type n'aurait pas été détecté dans les caisses de transport avant le chargement des oiseaux, cette observation aurait permis de renforcer l'hypothèse que les isolats du type P2G1 retrouvés sur les peaux de cou provenaient de l'environnement de l'abattoir.

Alors, au moins une hypothèse aurait permis d'expliquer la présence du type P2G1 dans les caisses de transport après nettoyage et désinfection : les caisses de transport des volailles sont nettoyées par trempage dans des tunnels. Les procédures de nettoyage et désinfection des caisses de transport sont inefficaces, notamment parce qu'elles ne permettent pas de retirer l'ensemble de la matière organique présente dans les caisses de transport, mais également parce que les bacs contenant les solutions de nettoyage sont souillés par la présence de matière organique. La matière organique accumulée dans les tunnels de nettoyage et désinfection des caisses de transport inhibent l'action des désinfectants (Langsrud, Singh Sidhu et al. 2003). Le type P2G1 a été isolé dans l'environnement de l'abattoir avant nettoyage et désinfection, il est donc probable qu'il provenait du tube digestif d'un lot de volailles abattu la veille, et la contamination de la caisse de transport pouvait provenir d'une contamination croisée dans les tunnels de nettoyage.

- Amélioration de la méthode de typage

Dans cette étude, les souches sont classées dans un premier temps en fonction de leur phénotype de résistance aux antibiotiques. Comme pour toutes les techniques de typage, le choix du seuil conditionne le pouvoir discriminant. Nous avons choisi de classer les isolats en fonction du seuil de sensibilité du CA-SFM. Par conséquent, dans cette étude, les souches sont considérées résistantes

lorsque leur CMI est supérieure à la valeur du seuil sensible du CA-SFM. Les 3 phénotypes d'intérêt dans cette étude étaient :

- Résistant à l'érythromycine
- Résistant à la tétracycline
- Résistant à l'érythromycine et à la tétracycline.

La résistance à la tétracycline n'est pas un marqueur très discriminant, parce qu'elle est très fréquente parmi les souches de l'espèce *C. jejuni*. En ce qui concerne l'érythromycine, elle présente la particularité d'avoir une distribution de CMI monomodale et non pas bimodale comme la plupart des autres antibiotiques. Or, le seuil de sensibilité du CA-SFM coupe la population sauvage sensible de *C. jejuni* pratiquement en son milieu.

Par conséquent, on se rend compte que les seuils retenus dans cette étude pour la détermination des phénotypes ne permettent pas une bonne discrimination des souches. Si au lieu de choisir le seuil de sensibilité du CA-SFM, on avait choisi les cut-off épidémiologiques proposés par l'EUCAST, alors, les souches résistantes à l'érythromycine auraient été considérées sensibles et regroupées avec les souches sensibles. Il n'y aurait pas de modifications pour les souches résistantes à la tétracycline. L'utilisation des cut-off épidémiologiques de l'EUCAST diminue le nombre de phénotypes d'intérêt (c'est à dire retrouvés sur les surfaces après nettoyage et désinfection) et entraîne une augmentation considérable du nombre de souches à génotyper. Le choix du phénotype comme méthode de typage est donc insuffisant.

De nombreuses méthodes de génotypage sont décrites pour campylobacter. Le choix de la méthode de génotypage des campylobacters est complexe non seulement parce que la diversité des génotypes de campylobacter est très importante mais aussi parce que les campylobacters présentent une forte instabilité génétique (Wassenaar and Newell 2000). La méthode de génotypage que nous avons retenue (PCR-RFLP sur trois gènes P*fla*, *gyr*A et *fla*A) présente un niveau de discrimination équivalent à celui de la technique de pulsotypage par champ pulsé (PFGE) (Ragimbeau, Salvat et al. 1998). La technique de pulsotypage par PCR-RFLP du seul gène *fla*A est même considérée comme suffisamment discriminante pour les études épidémiologiques au sein des abattoirs (Newell, Shreeve et al. 2001). Malgré tout, cette méthode ne nous a pas permis de conclure sur l'éventuelle contamination des carcasses par des souches ayant persisté dans l'environnement après nettoyage et désinfection. Nous pouvons supposer que nous n'avons pas sélectionné les bons marqueurs épidémiologiques et qu'il pourrait être interessant de typer les souches de cette étude avec une autre technique souvent employée dans les études épidémiologique à l'abattoir comme la technique AFLP (Alter, Gaull et al. 2005; Johannessen, Johnsen et al. 2007; Johnsen, Kruse et al. 2007).

## 3.2 Mise en évidence de la survie des campylobacters aux opérations de nettoyage et désinfection dans les abattoirs de volailles

L'étude réalisée dans les abattoirs est uniquement qualitative. Une étude quantitative par dénombrement des souches de campylobacters isolées pourrait permettre de quantifier l'efficacité des opérations de nettoyage et de désinfection sur les surfaces et dans les caisses de transport. En effet, l'objectif de la désinfection en industrie agroalimentaire n'est pas de stériliser les surfaces, mais de

réduire le nombre de micro-organismes présents dans l'environnement à un niveau ne risquant pas de compromettre la sécurité ou la salubrité des aliments. Cependant, pour les organismes pathogènes comme campylobacter dont la dose infectieuse est très faible, on peut se demander si le niveau ne risquant pas de compromettre la sécurité ou la salubrité des aliments n'est pas zéro. La présence de campylobacter sur les surfaces de l'abattoir et dans les caisses de transport après nettoyage et désinfection devrait être prise en compte lors de l'analyse du risque quantitative de la contamination des volailles et des carcasses par campylobacter. La maîtrise du risque « campylobacter » pour le consommateur doit s'appuyer sur la prévention de la contamination au niveau des élevages et sur la prévention de la contamination croisée des carcasses pendant les procédés d'abattage. Pour réussir à maîtriser ce risque, il est nécessaire d'améliorer le nettoyage des caisses de transport pour permettre aux désinfectants d'être efficace. Ce point est d'autant plus important que d'autres pathogènes alimentaires sont présents sur les volailles, comme les salmonelles, et que l'observation de la contamination des caisses de transport par ce pathogène a également été mis en évidence (Corry, Allen et al. 2002). La contamination des carcasses ne pourra pas être évitée si les oiseaux abattus sont porteurs d'organismes pathogènes comme salmonelle ou campylobacter, cependant, elle pourra être diminuée et partiellement contrôlée si les opérations de nettoyage et de désinfection des caisses de transport et des surfaces dans l'abattoir sont améliorées. Les améliorations devraient porter entre autre sur le retrait total de la matière organique dans les caisses de transport et sur les surfaces de la chaîne d'abattage dans l'abattoir ainsi que sur le strict respect des conditions d'utilisation des désinfectants, selon les recommandations du producteur (concentrations, température d'utilisation et temps de contact).

# CHAPITRE 5. CARACTERISATION PHENOTYPIQUE ET GENOTYPIQUE DES ISOLATS DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* COLLECTES APRES NETTOYAGE ET DESINFECTION DANS LES ABATTOIRS DE VOLAILLES

## 1 Introduction

Les bactéries du genre *Campylobacter* sp. sont difficiles à cultiver au laboratoire : elles sont très sensibles aux stress environnementaux et nécessitent une atmosphère microaérophile constituée de 5% d'oxygène, de 10% de gaz carbonique et de 85% d'azote. Les campylobacters thermotolérants ont une température optimale de croissance de 37°C à 42°C (ce qui correspond à la température du tube digestif des oiseaux, chez qui les campylobacters sont le plus souvent commensaux) et ne sont pas capables de se multiplier en dessous de 30°C. Un des aspects les plus étonnants lors de l'étude des campylobacters résident dans le fait que ces bactéries qui paraissent extrêmement sensibles aux conditions du milieu extérieur sont néanmoins capables de survivre à tous les stress liés à la fabrication et à la conservation des aliments pour parvenir à contaminer les consommateurs (Park 2005).

Dans les abattoirs de volailles, les locaux et les équipements sont nettoyés quotidiennement à la fin de la journée d'activité et les caisses de transport sont nettoyées et désinfectées entre chaque utilisation. Les campylobacters sont généralement reconnus comme sensibles aux désinfectants (Wang, Powers et al. 1983; Blaser, Smith et al. 1986; Trachoo and Frank 2002; Avrain, Allain et al. 2003), pourtant ils sont fréquemment isolés dans les caisses de transport des volailles après nettoyage et désinfection (Newell, Shreeve et al. 2001; Slader, Domingue et al. 2002; Rasschaert, Houf et al. 2007).

L'amélioration de l'hygiène dans les industries agroalimentaires a entraîné une augmentation de l'utilisation des désinfectants et en particulier ceux contenant des ammoniums quaternaires. Il a été émis l'hypothèse que ces molécules pouvaient être à l'origine d'une pression de sélection dans l'environnement qui pourrait conduire à la sélection de bactéries résistantes aux désinfectants (Langsrud, Singh Sidhu et al. 2003). Il a également été montré que des mécanismes de co-sélection ou de résistance croisée pouvait sélectionner des souches résistantes à la fois aux désinfectants et aux antibiotiques (Russell 2000), ce qui accroît la menace pour la santé publique.

La survie des bactéries aux stress engendrés par les procédures de nettoyage et de désinfection dépend de la présence et de l'expression de gènes de résistance à ces stress (Newell, Shreeve et al. 2001). Par conséquent, la diversité génétique des campylobacters est probablement modulée par les opérations de nettoyage et de désinfection.

Ces observations nous ont conduit à émettre l'hypothèse que les campylobacters isolés après nettoyage et désinfection pouvaient présenter une résistance augmentée vis à vis des antibiotiques et que seuls certains génotypes pouvaient survivre aux opérations de nettoyage et de désinfection. Pour tester ces hypothèses, nous avons comparé les CMI des antibiotiques des souches de *Campylobacter jejuni* isolées avant et après nettoyage et désinfection et nous avons recherché les corrélations entre les niveaux de sensibilité aux antibiotiques et aux désinfectants. Puis, nous avons examiné les

génotypes déterminés par PCR-RFLP des gènes Pfla, gyrA et flaA des isolats collectés après nettoyage et désinfection. L'objectif était de déterminer la diversité des génotypes isolés après nettoyage et désinfection et de rechercher si le même génotype pouvait être isolé au cours de plusieurs campagnes de prélèvements successives dans le même abattoir.

# 2 Publication

## 2.1 Résumé

Les campylobacters sont la principale cause mondiale d'entérite d'origine bactérienne chez l'homme et la viande de volaille est considérée comme la principale source de contamination pour l'homme. Dans les abattoirs de volailles, les opérations de nettoyage et de désinfection sont réalisées quotidiennement et il a été suggéré que les molécules désinfectantes puissent sélectionner des souches résistantes aux antibiotiques si les sites cibles ou les mécanismes de résistance bactériens impliqués étaient communs entre les molécules désinfectantes et les antibiotiques. Le nettoyage et la désinfection peuvent également sélectionner des génotypes spécifiques capables de survivre à ces stress. Entre août 2005 et juin 2006, 4 abattoirs ont été visités au cours de 9 visites. Des prélèvements ont été collectés dans les caisses de transport des volailles et sur les surfaces en contact avec les carcasses pendant l'abattage, avant et après les opérations de nettoyage et désinfection. Les CMI des souches isolées à partir de ces prélèvements ont été mesurées pour 6 antibiotiques (ampicilline, tétracycline, gentamicine, érythromycine, streptomycine et enrofloxacine) et 2 désinfectants de la famille des ammoniums quaternaires (chlorure de benzalkonium et chlorure de didécyl-diméthyl ammonium). Les isolats de *C. jejuni* collectés après nettoyage et désinfection ont été génotypés par PCR-RFLP des gènes Pf*la/gyr*A et *fla*A. A l'issue de 5 visites dans 3 des 4 abattoirs visités, 21 isolats de *C. jejuni* et 1 isolat de *C. coli* ont été isolés après nettoyage et désinfection des surfaces. Nos résultats montrent que les opérations de nettoyage et désinfection ne sélectionnent pas les souches résistantes aux antibiotiques pour l'espèce *C. jejuni*. Au cours de chaque visite dans les abattoirs après nettoyage et désinfection, seul un ou deux génotypes ont pu être isolés, ce qui laisse supposer que ces génotypes sont particulièrement adaptés à la survie au stress du nettoyage et de la désinfection. La compréhension des mécanismes de survie des campylobacters doit permettre à terme d'orienter les stratégies de lutte contre ce microorganisme afin de diminuer la menace que ce pathogène représente pour la santé publique.

## 2.2 Article accepté dans Veterinary Microbiology

# 3 Perspectives

## 3.1 Intérêt d'une étude quantitative : dénombrement des campylobacters dans les prélèvements

Notre étude des phénotypes et génotypes n'est que qualitative, nous ne savons pas dans quelle proportion les différents phénotypes et génotypes observés sont présents. Notre étude a montré que les phénotypes observés après nettoyage et désinfection étaient moins variés qu'avant mais elle ne permet pas de savoir si les phénotypes observés après nettoyage et désinfection étaient les plus représentés ou non. Par conséquent, on ne peut pas conclure si la survie de ces souches est liée à des mécanismes spécifiques ou à leur nombre initial plus important. L'analyse de la diversité d'une population dans un environnement donné est extrêmement complexe à réaliser. Différentes méthodes peuvent être envisager, mais elles sont, dans tous les cas, difficiles à mettre en œuvre. L'une d'entre elle consiste à réaliser, à partir d'un prélèvement, des isolements directs sur des milieux sélectifs contenant les antibiotiques utilisés pour le phénotypage. Une autre technique pourrait consister à isoler chacune des colonies obtenues pour *Campylobacter* sp. après isolement direct, puis à phénotyper l'ensemble de ces colonies. De plus, les phénotypes faiblement représentés peuvent malgré tout être sous-estimé ou non détecté en raison des dilutions réalisées à partir des prélèvements pour les dénombrements.

## 3.2 Génotypage des souches isolées avant nettoyage et désinfection

Le génotypage des souches isolées avant nettoyage et désinfection aurait permis de confirmer l'hypothèse que seul certains génotypes de campylobacter sont capables de survivre aux opérations de nettoyage et de désinfection. Avant nettoyage et désinfection de l'abattoir, on peut supposer que l'environnement est contaminé par de nombreux isolats présentant des génotypes variés. Ces isolats ont été déposés sur les surfaces par les différents lots abattus pendant la journée de travail. Le génotypage des souches collectées avant nettoyage et désinfection aurait permis d'éliminer l'hypothèse que les différentes souches de campylobacters meurent au cours de la journée et que seules les dernières déposées sur les surfaces sont collectées dans les prélèvements. Pour étudier cette question, il est possible d'augmenter le rythme des prélèvements à l'abattoir pendant la période d'activité et de réaliser des prélèvements sur les surfaces des différentes machines de la chaîne d'abattage entre chaque lot abattu. Cela permettrait d'avoir une vision des différents types présents sur les surfaces au cours de la journée de travail dans l'abattoir. Il faut cependant prendre en compte la sous-estimation de la diversité des génotypes en relation avec la méthode d'isolement (compétitivité des souches présentent dans le prélèvement (Corry, Post et al. 1995), nombre de colonies génotypées par boite d'isolement (Johnsen, Kruse et al. 2007)) Dans une étude récente, il a été montré que les génotypes majoritaires isolés dans l'environnement provenaient du lot en cours d'abattage (Johnsen, Kruse et al. 2007).

## 3.3 Etude de la survie des campylobacters et résistance aux opérations de nettoyage et de désinfection dans les abattoirs

La survie des campylobacters aux opérations de nettoyage et de désinfection peut être expliquée par une mauvaise application des procédures de nettoyage et désinfection.

Cependant, plusieurs facteurs peuvent expliquer la survie des campylobacters aux opérations de nettoyage et de désinfection sur les surfaces des abattoirs. Une hypothèse est que certains clones sont plus adaptés que d'autres à la survie (Newell, Shreeve et al. 2001). Il est également possible que les campylobacters soient protégés au sein d'un biofilm sur les surfaces de l'abattoir (Trachoo, Frank et al. 2002). Une augmentation de la résistance aux désinfectants a également été mise en évidence lorsque les campylobacters sont présents au sein de protozoaires (Axelsson-Olsson, Waldenstrom et al. 2005; Snelling, McKenna et al. 2005; Snelling, Moore et al. 2006). La survie des campylobacters sur les surfaces peut-être étudiée à l'aide de méthode *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, les résultats des études s'accordent à observer que les campylobacters ne survivent pas plus de quelques heures (maximum 4h) sur les surfaces, et il semble que la durée de survie soit augmentée sur les surfaces humides (Humphrey, Mason et al. 1995; Kusumaningrum, Riboldi et al. 2003; Cools, Uyttendaele et al. 2005). La dynamique de survie des campylobacters pourraient être explorée *in vivo*, c'est à dire dans les abattoirs de volailles et les ateliers de découpes de produits de volailles au cours de la production.

**Tableau 31. Nombre de lots prélevés en fonction des abattoirs, de l'espèce de volaille et de la saison**

- Abattoirs et espèces de volaille

| Espèce<br>Abattoir | Poulet standard | Poulet fermier | Dinde | Autre | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 13 | - | 4 | - | 17 |
| 2 | 3 | 1 | - | 2 | 6 |
| 3 | 4 | 6 | 3 | 6 | 19 |
| 4 | - | - | 1 | - | 1 |
| Total | 20 | 7 | 8 | 8 | 43 |

- Abattoirs et saisons

| Saison<br>Abattoir | Printemps | Eté | Automne | Hiver | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 6 | 5 | - | 6 | 17 |
| 2 | - | 6 | - | - | 6 |
| 3 | 5 | 4 | 5 | 5 | 19 |
| 4 | - | - | - | 1 | 1 |
| Total | 11 | 15 | 5 | 12 | 43 |

- Espèces de volaille et saisons

| Saison<br>Espèce | Printemps | Eté | Automne | Hiver | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| Poulet standard | 6 | 8 | - | 6 | 20 |
| Poulet fermier | 2 | 1 | 2 | 2 | 7 |
| Dinde | 2 | 3 | - | 3 | 8 |
| Autre | 1 | 3 | 3 | 1 | 8 |
| Total | 11 | 15 | 5 | 12 | 43 |

# CHAPITRE 6. COMPARAISON DES NIVEAUX DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES ET AUX DESINFECTANTS DE *C. JEJUNI* ET *C. COLI* AVANT ET APRES LES PROCEDES D'ABATTAGE DANS LES ABATTOIRS DE VOLAILLES

## 1 Introduction

Les campylobacters sont considérés comme la première cause bactérienne de diarrhée d'origine alimentaire dans le monde (Anonymous 2004). *C. jejuni* et *C. coli* sont des commensaux d'un grand nombre de mammifères et d'oiseaux. La contamination de l'homme se fait le plus souvent par le biais de l'alimentation (viande de volaille, lait) (Anonymous 2003). Les principaux symptômes sont digestifs. Les infections dues à *Campylobacter* sp. peuvent être responsables d'atteintes extra-digestives (septicémie) chez certains patients (jeunes enfants, patients immunodéprimés) et de complications post-infectieuses (syndrome de Guillain-Barré). Bien que les gastro-entérites dues à *Campylobacter* sp. rétrocèdent le plus souvent spontanément, il est dans certains cas nécessaire de traiter les patients avec des antibiotiques. En France, les pourcentages de résistance aux antibiotiques des campylobacters des filières avicole et porcine font l'objet d'un plan de surveillance (Moore, Barton et al. 2006).

Si la sélection de bactéries résistantes chez l'animal traité pendant la période d'élevage par des antibiotiques a été démontrée, l'effet des différentes étapes de transformation en industrie agro-alimentaire, ainsi que de la désinfection des environnements comme source de re-contamination des denrées ou de modulation de la sélection des souches résistantes sont mal connus. Ces observations nous ont conduit à émettre l'hypothèse que les procédés d'abattage pouvaient avoir un impact sur la résistance aux antibiotiques des campylobacters. Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé l'étude suivante : à partir de prélèvements réalisés en abattoirs de volailles au début et à la fin des opérations d'abattage (fientes et peaux de cou), nous avons mesuré la résistance aux antibiotiques et aux désinfectants des souches de campylobacter collectées et nous avons comparé les niveaux de résistance observés en fonction des sites de prélèvement. L'objectif de cette étude est donc de contribuer à améliorer les connaissances sur l'influence de la première étape de transformation dans les abattoirs de volailles sur la sélection de souches de campylobacter résistantes aux antimicrobiens.

## 2 Matériels et méthodes

### 2.1 Prélèvements et souches de campylobacters utilisés pour l'étude

Dans les 4 abattoirs visités, 43 lots de volailles ont été prélevés au niveau des caisses de transport (fientes) et au niveau de l'entrée en salle de ressuage des carcasses (peaux de cou). Le nombre de prélèvements réalisés en fonction des abattoirs, du type de volaille prélevé et de la saison sont indiqués dans le tableau 31.

## 2.2 Mesure de la résistance aux antibiotique et aux désinfectants

### 2.2.1 Dilution en milieu gélosé

Toutes les mesures de sensibilité aux antibiotiques et aux désinfectants ont été réalisées avec la méthode de dilution en milieu gélosé décrite dans le chapitre 2.

### 2.2.2 Mesure de la résistance

#### 2.2.2.1 Choix de la population de référence

Les espèces *C. jejuni* et *C. coli* sont traitées séparément.

D'après sa définition, la résistance se mesure par rapport à une population de référence.

La résistance aux antibiotiques peut être mesurée par rapport à 2 populations de référence différentes :

- La première correspond à l'ensemble des campylobacters isolés dans les prélèvements de fientes et de peaux de cou et dont l'antibiogramme complet a été déterminé. Le dénominateur du pourcentage est la somme des isolats pour lesquels la résistance est mesurée.
- La deuxième correspond à une mesure de la résistance dans une population « hôte » des campylobacters, c'est à dire dans les types prélèvements de volaille. Le dénominateur des pourcentages est le nombre de prélèvements par type.

#### 2.2.2.2 Méthodes utilisées pour mesurer la résistance en fonction de la population de référence

- Mesure de la résistance sur l'ensemble des prélèvements

Deux méthodes différentes peuvent être utilisées pour mesurer la résistance des campylobacters au niveau des volailles abattues:

- La première méthode consiste à noter, pour chaque prélèvement, la ou les résistances aux antibiotiques observées sur les isolats du prélèvement considéré. Pour chaque antibiotique, on note pour le prélèvement la valeur observée pour chaque isolat.

Les résultats obtenus avec cette méthode correspondent aux résultats « R observée » dans les tableaux 33 et 34.

- La deuxième méthode consiste à pondérer la résistance observée dans les prélèvements en prenant en compte le nombre d'isolats collectés par prélèvement. La formule utilisée est celle de (Davison, Low et al. 2000) :

$$P = \frac{1}{N}\left[\sum_{i=1}^{N} 1-(1-p_i)^{b_i}\right]$$

avec N= nombre de prélèvement (par type de prélèvement, fientes ou peau de cou)

$p_i$=résistance calculée par prélèvement (=$nR_i/b_i$)

$nR_i$ nombre de résistance observé

$b_i$=nombre d'isolats par prélèvement

Les résultats obtenus avec cette méthode correspondent aux résultats « R estimée » des tableaux 33 et 34 : pourcentage de résistance estimé. Le logiciel Matlab® a été utilisé pour faire les calculs.

**Tableau 32. Isolement des campylobacters dans les prélèvements de fientes et de peaux de cou dans les 4 abattoirs**

| | Fientes | Peaux de cou | Total |
|---|---|---|---|
| Nombre de lots prélevés | 43 | 43 | 43 |
| Nombre de prélèvements | 43 | 146 | 189 |
| Nombre de prélèvements positifs | 35 | 102 | 137 |
| Nombre de prélèvements positifs pour *C. jejuni* | 28 | 99 | 127 |
| Nombre de prélèvements positifs pour *C. coli* | 12 | 9 | 21 |
| Nombre d'isolats *C. jejuni* | 72 | 293 | 365 |
| Nombre d'isolats *C. coli* | 23 | 16 | 39 |

## 2.3 Analyse statistique

### 2.3.1 Analyse en correspondance multiple

Les données ont été analysées avec le logiciel SPAD®.

### 2.3.2 Tests de comparaisons

Les tests de comparaison ont été réalisés avec le logiciel Systat®. Le test du $\chi^2$ ou le test exact de Fisher sont utilisés pour comparer les pourcentages de résistance observés. Le risque $\alpha$ est choisi à 5% ($p \leq 0.05$). Le coefficient de Spearman a été utilisé pour mesurer les corrélations entre les distributions de CMI des molécules antibiotiques et désinfectantes testées.

# 3 Résultats

## 3.1 Déséquilibre du plan de prélèvement

La répartition des lots de volailles prélevés en fonction des abattoirs, de l'espèce de volaille prélevée et de la saison sont indiqués dans le tableau 31.

- Abattoirs

Plus de 80% des lots prélevés proviennent des abattoirs 1 et 3 (36/43). Les abattoirs 2 et 4 n'ont été visités qu'une seule fois.

- Saisons

Les prélèvements sont principalement répartis sur trois saisons (printemps, été et hiver). Seuls 11,6% (5/43) des lots ont été prélevés en automne.

- Espèces de volailles prélevées

Presque la moitié (46.5%) des prélèvements a été réalisée sur des volailles de type poulet de chair standard. Les nombres de lots prélevés pour la dinde, les poulets de type fermier et autres espèces de volaille sont équilibrés (environ 17%). Dans la catégorie « autre » espèce de volailles se trouvent les lots de pintades, de poules pondeuses et de canards.

Les déséquilibres observés seront pris en compte lors de l'analyse des comparaisons entre les différents pourcentages de résistance.

## 3.2 Isolement des campylobacters dans les prélèvements

### 3.2.1 Espèces de campylobacter isolées

Au total, 43 lots de volailles ont été prélevés dans les 4 abattoirs, ce qui correspond à 43 pools de fientes et 146 peaux de cou.

Sur l'ensemble des prélèvements, 72,5% (137/189) étaient positifs pour campylobacter. Parmi les prélèvements positifs, 92,7% (127/137) étaient positifs pour *C. jejuni* et 15,3% (21/137) pour *C. coli*. Ces prélèvements ont permis l'isolement de 404 isolats dont 365 (90,3%) *C. jejuni* et 39 (9,7%) *C. coli*. L'isolement des campylobacters dans l'ensemble des lots prélevés sont présentés dans le tableau 32.

**Tableau 33. Pourcentages de résistance aux antibiotiques mesurés pour *C. jejuni***

| Prélèvements | Méthode de mesure | | Ampicilline | | Tétracycline | | Erythromycine | | Enrofloxacine | | Streptomycine | | Multirésistance | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | % | IC | % | IC | % | IC | % | IC | % | IC | % | IC |
| Fientes | R estimée | n=21 | **27.5** | | **48.3** | | **6.6** | | **32.1** | | **0.0** | | **35.6** | |
| | R observée | n=21 | **33.3** | 11.6-58.9 | **52.4** | 25.7-75.7 | **9.5** | 0.3-32.5 | **38.1** | 14.8-63.4 | **0.0** | 0.0-16.1 | **42.9** | 18.2-67.7 |
| Peaux de cou | R estimée | n=40 | **43.6** | | **64.5** | | **4.1** | | **32.5** | | **6.7** | | **45.9** | |
| | R observée | n=40 | **47.5** | 28.8-65.3 | **70.0** | 50.2-84.3 | **5.0** | 0.2-18.3 | **37.5** | 20.3-55.8 | **7.5** | 0.8-21.8 | **52.5** | 33.2-69.8 |

IC : intervalle de confiance à 95% ; R : résistance, n= nombre de prélèvements

**Tableau 34. Pourcentages de résistance aux antibiotiques observés pour *C. coli***

| Prélèvements | Méthode de mesure | | Ampicilline | | Tétracycline | | Erythromycine | | Enrofloxacine | | Streptomycine | | Multirésistance | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | % | IC | % | IC | % | IC | % | IC | % | IC | % | IC |
| Fientes | R estimée | n=10 | **16.9** | | **100.0** | | **17.5** | | **59.4** | | **17.5** | | **59.4** | |
| | R observée | n=10 | **20.0** | 0.6-58.1 | **100.0** | 64.5-100 | **10.0** | 0.0-47.3 | **50.0** | 13.2-82.7 | **20.0** | 0.6-58.1 | **60.0** | 19.7-88.8 |
| Peaux de cou | R estimée | n=6 | **33.3** | | **83.3** | | **16.7** | | **50.0** | | **0.0** | | **66.7** | |
| | R observée | n =6 | **33.3** | 1.0-79.6 | **83.3** | 24.5-99.8 | **16.7** | 0.0-66.8 | **50.0** | 5.8-89.3 | **0.0** | 0.0-45.9 | **66.7** | 13.7-96.2 |

IC : intervalle de confiance à 95% ; R : résistance, n= nombre de prélèvements

### 3.2.2 Analyse par lot de volaille

Au total, 43 lots de volailles ont été prélevés dans les 4 abattoirs, ce qui correspond à 43 pools de fientes et 146 peaux de cou.

- Dans les prélèvements de fientes, 35 étaient positifs pour campylobacter dont 28 pour *C. jejuni* et 12 pour *C. coli*. Dans 5 prélèvements, les deux espèces ont été isolées. Dans les prélèvements de fientes, 72 isolats de *C. jejuni* et 23 isolats de *C. coli* ont été collectés.
- Parmi les peaux de cou, 102 étaient positives pour campylobacter, dont 99 pour *C. jejuni* et 9 pour *C. coli*. Dans 6 peaux de cou, les deux espèces ont été isolées. Au total à partir des peaux de cou, 293 isolats de *C. jejuni* et 39 isolats de *C. coli* ont été collectés. Pour l'analyse et la comparaison des résistances observées, les prélèvements de peau de cou sont regroupés par lot de volaille dont ils sont issus.

## 3.3 Niveaux de résistance observés par molécule d'antibiotique testée

### 3.3.1 Pour l'espèce *C. jejuni*

Les 2 pourcentages de résistance mesurés (observé et estimé) sont indiqués dans le tableau 33.

Quel que soit le type de prélèvement, aucune résistance à la gentamicine n'a été observée.

- Dans les fientes, le pourcentage de résistance le plus élevé est observé pour la tétracycline (de 48,3% à 52,4%) et le pourcentage de résistance le plus faible est observé pour la streptomycine (0%).
- Dans les peaux de cou, le pourcentage de résistance le plus élevé est également observé pour la tétracycline (de 43,6% à 47,5%) et le plus faible est observé pour l'érythromycine (4,1% à 5,0%).

### 3.3.2 Pour l'espèce *C. coli*

Les pourcentages de résistance observés en fonction de la méthode de mesure sont indiqués dans le tableau 34.

Quel que soit le type de prélèvement ou la méthode d'échantillonnage, aucune résistance à la gentamicine n'a été observée.

- Dans les fientes, le pourcentage de résistance le plus élevé est observé pour la tétracycline (100%) et le pourcentage de résistance le plus faible est observé pour l'érythromycine (de 10% à 17.5%).

**Tableau 35. Comparaison des pourcentages de résistance observés entres les prélèvements de fientes et de peaux de cou pour *C. jejuni* et *C. coli*. Valeurs de p (test du $\chi^2$ ou test exact de Fisher)**

| | *C. jejuni* | *C. coli* |
|---|---|---|
| Ampicilline | 0.707 | 0.604 |
| Tétracycline | 0.271 | 0.375 |
| Erythromycine | 0.444 | 1.000 |
| Enrofloxacine | 0.705 | 1.000 |
| Streptomycine | 0.171 | 0.500 |
| Multirésistance | 0.609 | 1.000 |

**Tableau 36. Pourcentages de résistances observés pour *C. jejuni* sur les prélèvements de fientes et de peau de cou en fonction de l'abattoir et valeur de p (test du $\chi^2$ ou exact de Fisher)**

| | Abattoir | | | | p |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| n prélèvements | 29 | 7 | 24 | 1 | |
| Ampicilline | 31 | 0 | 7 | 100 | **0.003** |
| Tétracycline | 52 | 1 | 92 | 100 | **$<10^{-3}$** |
| Erythromycine | 0 | 0 | 13 | 100 | **$<10^{-3}$** |
| Enrofloxacine | 41 | 0 | 42 | 100 | 0.102 |
| Streptomycine | 7 | 0 | 0 | 100 | **$<10^{-3}$** |
| Multirésistance | 0 | 0 | 71 | 100 | **0.005** |

**Tableau 37. Pourcentages de résistances observés pour *C. jejuni* sur les prélèvements de fientes et de peau de cou en fonction du type de volaille abattue et valeur de p (test du $\chi^2$ ou exact de Fisher)**

| | Type de volaille | | | | p |
|---|---|---|---|---|---|
| | Poulet standard | Poulet fermier | Dinde | Autre | |
| n prélèvements | 31 | 13 | 11 | 6 | |
| Ampicilline | 26 | 69 | 27 | 100 | **0.001** |
| Tétracycline | 42 | 85 | 82 | 100 | **0.003** |
| Erythromycine | 0 | 0 | 18 | 33 | **0.006** |
| Enrofloxacine | 26 | 38 | 64 | 50 | 0.144 |
| Streptomycine | 6 | 0 | 9 | 0 | 0.671 |
| Multirésistance | 32 | 69 | 45 | 100 | **0.008** |

**Tableau 38. Pourcentages de résistances observés pour *C. jejuni* sur les prélèvements de fientes et de peau de cou en fonction de la saison et valeur de p (test du $\chi^2$ ou exact de Fisher)**

| | Saison | | | | p |
|---|---|---|---|---|---|
| | Printemps | Eté | Automne | Hiver | |
| n prélèvements | 18 | 24 | 6 | 13 | |
| Ampicilline | 39 | 33 | 100 | 38 | **0.028** |
| Tétracycline | 56 | 58 | 100 | 69 | 0.220 |
| Erythromycine | 0 | 4 | 0 | 23 | 0.053 |
| Enrofloxacine | 33 | 17 | 50 | 77 | **0.004** |
| Streptomycine | 0 | 8 | 0 | 8 | 0.561 |
| Multirésistance | 33 | 33 | 100 | 77 | **0.002** |

**Tableau 39. Pourcentages de résistances observés pour *C. coli* sur les prélèvements de fientes et de peau de cou en fonction de l'abattoir et valeur de p (test du $\chi^2$ ou test exact de Fisher)**

| | Abattoir | | | | p |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| n prélèvements | 7 | 0 | 7 | 2 | |
| Ampicilline | 0 | | 57 | 0 | **0.032** |
| Tétracycline | 100 | | 86 | 100 | 0.504 |
| Erythromycine | 14 | | 14 | 0 | 0.849 |
| Enrofloxacine | 29 | | 57 | 100 | 0.180 |
| Streptomycine | 14 | | 0 | 50 | 0.166 |
| Multirésistance | 43 | | 71 | 100 | 0.274 |

**Tableau 40. Pourcentages de résistances observés pour *C. coli* sur les prélèvements de fientes et de peau de cou en fonction du type de volaille abattue et valeur de p (test du $\chi^2$ ou test exact de Fisher)**

| | Type de volaille | | | | p |
|---|---|---|---|---|---|
| | Poulet standard | Poulet fermier | Dinde | Autre | |
| n prélèvements | 5 | 0 | 4 | 7 | |
| Ampicilline | 0 | | 0 | 57 | **0.032** |
| Tétracycline | 100 | | 100 | 86 | 0.504 |
| Erythromycine | 20 | | 0 | 14 | 0.654 |
| Enrofloxacine | 20 | | 75 | 57 | 0.230 |
| Streptomycine | 0 | | 50 | 0 | **0.032** |
| Multirésistance | 40 | | 75 | 71 | 0.453 |

**Tableau 41. Pourcentages de résistances observés pour *C. coli* sur les prélèvements de fientes et de peau de cou en fonction de la saison et valeur de p (test du $\chi^2$ ou test exact de Fisher)**

| | Saison | | | | p |
|---|---|---|---|---|---|
| | Printemps | Eté | Automne | Hiver | |
| n prélèvements | 3 | 6 | 4 | 3 | |
| Ampicilline | 67 | 17 | 25 | 0 | 0.261 |
| Tétracycline | 100 | 100 | 75 | 100 | 0.362 |
| Erythromycine | 0 | 17 | 25 | 0 | 0.677 |
| Enrofloxacine | 67 | 33 | 25 | 100 | 0.172 |
| Streptomycine | 0 | 0 | 0 | 67 | **0.019** |
| Multirésistance | 67 | 50 | 50 | 100 | 0.477 |

- Dans les peaux de cou, le pourcentage de résistance le plus élevé est également observé pour la tétracycline (de 83,3%) et le plus faible est observé pour la streptomycine (0,0%).

## 3.4 Comparaison des pourcentages de résistance aux antibiotiques observés

### 3.4.1 Comparaison des pourcentages de résistance avant « fientes »et après « peaux de cou » abattage des volailles

La comparaison des niveaux de résistance est faite entre les pourcentages de résistances observées entre les fientes et les peaux de cou, en notant pour chaque prélèvement les résistances observées sur les isolats. L'objectif est de déterminer si les procédés d'abattage ont un effet sur les pourcentages de résistance aux antibiotiques des campylobacters dans les prélèvements de volailles.
La comparaison des résistances aux antibiotiques pour *C. jejuni* et *C. coli* (tableau 35) ne met en évidence aucune différence entre les fientes et les peaux de cou (test du $\chi^2$ ou test exact de Fisher).

### 3.4.2 Comparaison des pourcentages de résistance en fonction des abattoirs, du type de volaille et de la saison

#### 3.4.2.1 Pour l'espèce *C. jejuni*

- Influence de l'abattoir sur les pourcentages de résistance observés (tableau 36)

Les pourcentages de résistance aux antibiotiques sont significativement différents entre les abattoirs ($p<0.05$), sauf pour l'enrofloxacine. On constate que dans tous les prélèvements collectés dans l'abattoir 4 une résistance à chacun des antibiotiques testés est observée. Au contraire, dans l'abattoir 2, la résistance observée sur les prélèvements est nulle sauf pour la tétracycline (1%).

- Espèce de volaille abattue (tableau 37)

Sauf pour l'enrofloxacine ($p=0144$) et la streptomycine ($p=0.671$), on observe une différence significative des pourcentages de résistance aux différents antibiotiques testés en fonction de l'espèce de volaille abattue. Dans notre étude, le type « poulet standard » présente les pourcentages de résistance les plus faibles aux antibiotiques testés.

- Influence de la saison sur les pourcentages de résistance observés (tableau 38)

Pour 3 antibiotiques (l'ampicilline, l'enrofloxacine et le pourcentage de prélèvements présentant une multirésistance), on observe une différence significative entre les saisons. L'hiver et l'automne sont les saisons qui présentent les pourcentages de résistance les plus élevés par rapport aux saisons printemps et été.

#### 3.4.2.2 Pour l'espèce *C. coli*

- Influence de l'abattoir sur les pourcentages de résistance observés (tableau 39)

Dans les prélèvements de fientes et de peaux de cou, seuls 16 prélèvements étaient positifs pour *C. coli*. Par conséquent, les différences sont plus difficiles à mettre en évidence. Une différence significative entre les pourcentages de résistance à l'ampicilline est observée entre les abattoirs, la résistance à l'ampicilline est nulle dans les abattoirs 1 et 4 et très élevée dans l'abattoir 3 (57%).

- Espèce de volaille abattue (tableau 40)

**Tableau 42. Corrélations entre les CMI observées pour les antibiotiques et les désinfectants testés dans les prélèvements de fientes et de peaux de cou pour *C. jejuni* (n=61)**

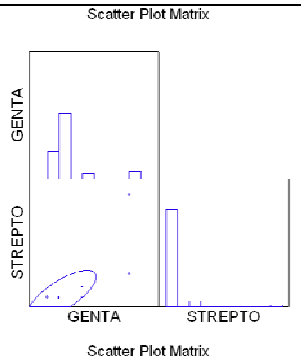
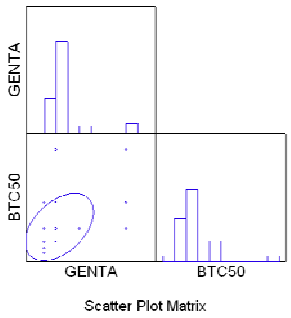
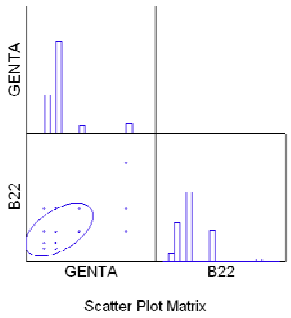
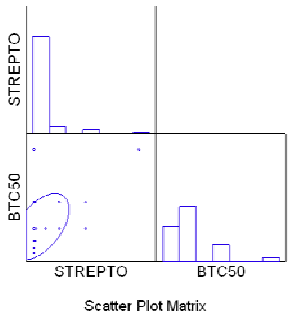
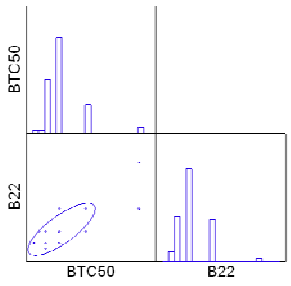
| Corrélation | r | p | graphique |
|---|---|---|---|
| gentamicine*streptomycine | 0.51041 | $<10^{-4}$ |  |
| gentamicine*chlorure de benzalkonium | 0.40872 | 0.0016 |  |
| gentamicine*chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium | 0.48741 | $10^{-4}$ |  |
| streptomycine*chlorure de benzalkonium | 0.40240 | 0.0014 |  |
| chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium* chlorure de benzalkonium | 0.68197 | $10^{-4}$ |  |

**Tableau 43. Corrélations entre les CMI observées pour les antibiotiques et les désinfectants testés dans les prélèvements de fientes et de peaux de cou pour *C. coli* (n=16)**

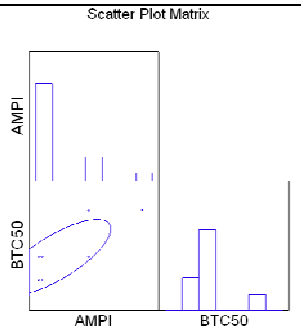
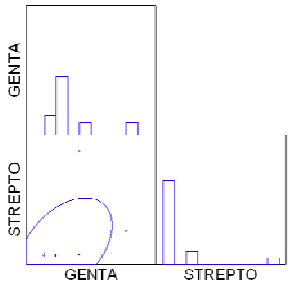
| Corrélation | r | p | graphique |
|---|---|---|---|
| ampicilline*chlorure de benzalkonium | 0.63693 | 0.0080 |   |
| gentamicine*streptomycine | 0.78733 | 0.0003 |   |

**Tableau 44. Variations minimales des pourcentages de résistances détectables en fonction du nombre de prélèvement de fientes (puissance de l'étude fixée à 80%)**

| | *C. jejuni* | | | | *C. coli* | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | p | n | Δ négatif | Δ positif | p | n | Δ négatif | Δ positif |
| ampicilline | 0.333 | 21 | -0.30 | 0.40 | 0.353 | 10 | - | >0.50 |
| tétracycline | 0.524 | 21 | -0.40 | 0.40 | 0.706 | 10 | -0.35 | - |
| érythromycine | 0.095 | 21 | - | 0.40 | 0.059 | 10 | - | >0.50 |
| gentamicine | 0.000 | 21 | - | 0.20 | 0.000 | 10 | - | 0.35 |
| enrofloxacine | 0.381 | 21 | -0.35 | 0.40 | 0.559 | 10 | -0.50 | 0.50 |
| streptomycine | 0.000 | 21 | - | 0.20 | 0.147 | 10 | - | >0.50 |
| multiresistance | 0.429 | 21 | -0.35 | 0.40 | 0.471 | 10 | <-0.50 | 0.40 |

p: résistance observée

n : nombre de prélèvements

Δ : variation

On observe une différence des pourcentages de résistance à l'ampicilline (p=0.032) et à la streptomycine (p=0.032) des *C. coli* en fonction de l'espèce de volaille abattue. Le pourcentage de résistance à l'ampicilline est plus élevé dans le type « autre » (R=57%) et le poucentage de résistance à la streptomycine est plus élevée dans le type « dinde » (R=50%)

- Influence de la saison sur les pourcentages de résistance observés (tableau 41)

On observe une différence des pourcentages de résistance pour la streptomycine en fonction de la saison.

## 3.5 Corrélations entre les différentes molécules testées.

### 3.5.1 Pour l'espèce *C. jejuni*

Une corrélation est observée (tableau 42) :

- Entre les deux molécules d'antibiotiques de la famille des aminoglycosides : gentamicine et streptomycine
- Entre les deux molécules d'ammoniums quaternaires
- Entre la gentamicine et les deux molécules d'ammoniums quaternaires
- Entre la streptomycine et le chlorure de benzalkonium

### 3.5.2 Pour l'espèce *C. coli*

Etant donné le faible nombre de prélèvements positifs pour *C. coli*, il est difficile de mettre en évidence des corrélations.

Une corrélation est observée entre (tableau 43) :

- L'ampicilline et le chlorure de benzalkonium
- La gentamicine et le chlorure de benzalkonium

## 3.6 Variations de résistance qu'il est possible de mettre en évidence avec le plan de prélèvement

En fixant la puissance des tests de comparaison utilisés à 80%, nous pouvons calculer la plus petite variation de résistance qu'il est possible de mettre en évidence en tenant compte du nombre d'isolats ou de prélèvements dont nous disposons dans notre étude. Ce calcul utilise les valeurs de résistance observée dans les prélèvements de fientes puisque l'objectif de l'étude est de déterminer l'influence de l'abattage sur la sensibilité aux antibiotiques des souches de *C. jejuni* et *C. coli*. Les variations minimales détectables sont présentées dans le tableau 44 pour *C. jejuni* et pour *C. coli*.

Pour *C. jejuni*, les variations minimales que nous pouvons mettre en évidence vont de 20 à 40 % en fonction des antibiotiques.

Pour *C. coli*, les écarts sont plus importants car les nombres de prélèvements positifs pour cette espèce sont faibles et pour certains antibiotiques, la variation minimale observable est supérieure à 50%.

**Figure 32. Analyse de la résistance dans les prélèvements contenant des isolats de l'espèce *C. jejuni***

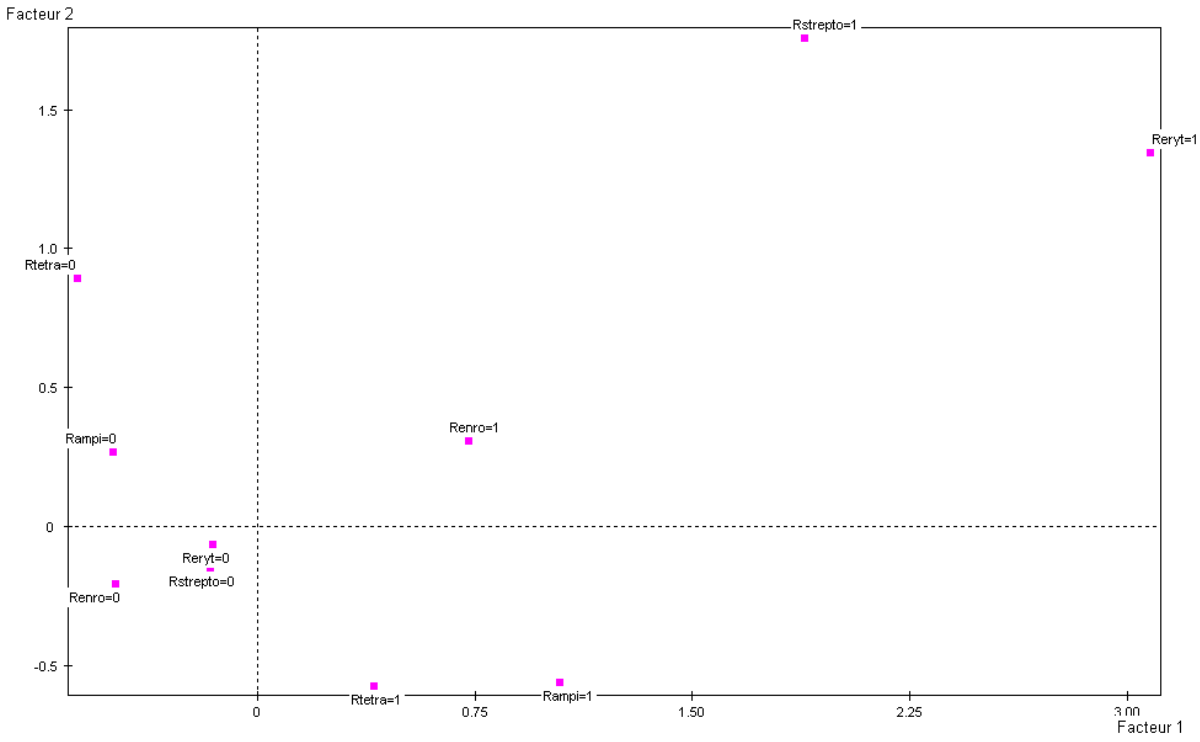


**Figure 33. Analyse des variables « abattoir », « saison » et nature du prélèvement**

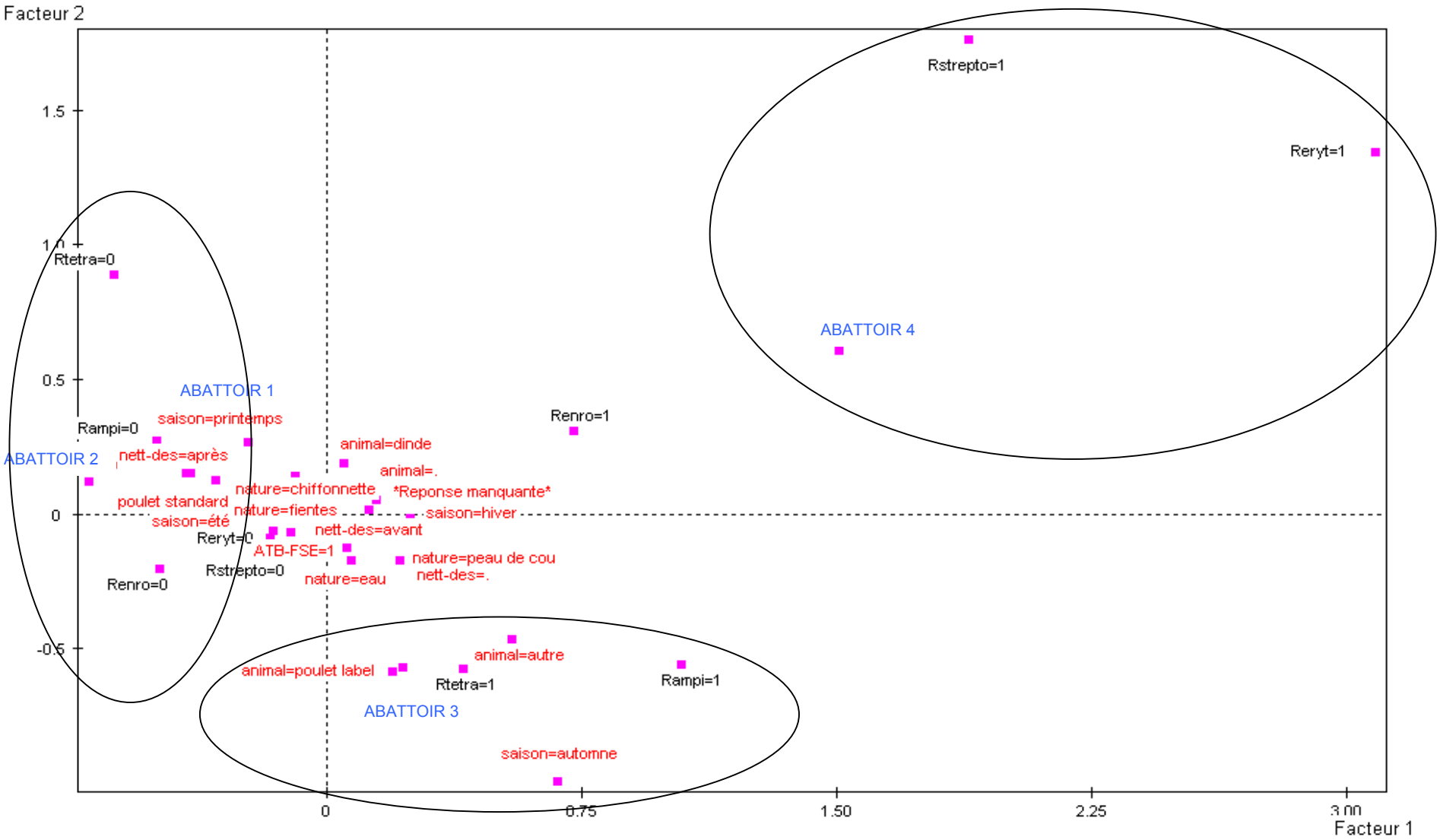
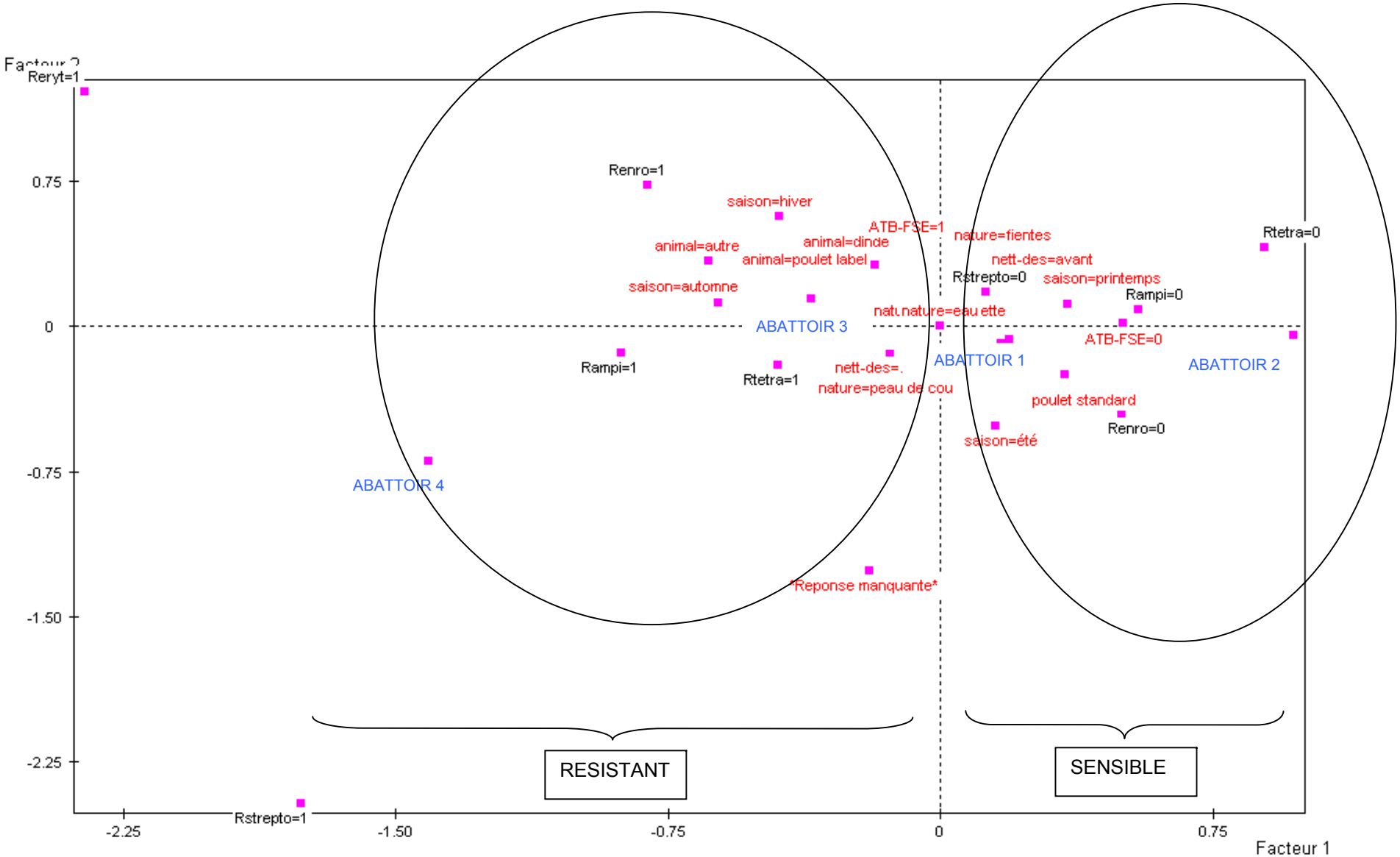


**Figure 34. Analyse des prélèvements fientes et peaux de cou en fonction des variables « abattoirs » et « saisons »**



## 3.7 Analyse multidimensionnelle descriptive : analyse des correspondances multiples

L'analyse des correspondances multiples a été limitée aux prélèvements contenant des isolats de *C. jejuni.* Pour chaque prélèvement il est noté, à partir des isolats collectés dans ce prélèvement, les résistances observées pour chaque antibiotique et la valeur de la CMI la plus élevée pour chacune des deux molécules désinfectantes testées.

### 3.7.1 Analyse des prélèvements positifs pour *C. jejuni*

Sur la figure 32, on observe que les prélèvements contenant une résistance à l'érythromycine et à la streptomycine s'opposent au reste des prélèvements. Pour *C. jejuni*, ces résistances sont très rares.

### 3.7.2 Analyse des variables abattoir, saison et nature du prélèvement

Sur la figure 33, on peut observer 3 groupes. Le premier groupe comprend l'abattoir 4 et les prélèvements qui contiennent une résistance à l'érythromycine et à la streptomycine. Le deuxième groupe comprend les prélèvements réalisés dans l'abattoir 3, pendant la saison automne, sur les poulets fermiers et présentant une résistance à l'ampicilline et à la tétracycline. Le troisième groupe comprend les prélèvements réalisés dans les abattoirs 1 et 2, réalisés pendant les saisons printemps et été et sur les volaille de type standard. La description des prélèvements indique un effet abattoir, avec l'abattoir 4 plutôt du coté des résistances rares aux antibiotiques. Les deux types de prélèvements (fientes et peau de cou) sont situés au centre de la figure avec les prélèvements de fientes plutôt du coté des « sensibles » et les prélèvements de peaux de cou plutôt du coté des « résistants ».

### 3.7.3 Analyse des prélèvements animaux « fientes et peaux de cou »

Sur la figure 34, on peut distinguer deux groupes :

- L'un « sensible », contenant les prélèvements des abattoirs 1 et 2, réalisés au printemps et en été, sur des volailles de type standard.
- L'autre « résistant » contenant les prélèvements des abattoirs 3 et 4, réalisés en automne et en hiver sur des volailles de type « fermier », « dinde » ou « autre ».

L'abattoir 4 se distingue nettement et dans une moindre mesure la saison automne.

### 3.7.4 Conclusion de l'analyse en composantes multiples

En conclusion, un effet abattoir très net est identifié avec l'analyse des correspondances multiples, avec l'abattoir 4 du coté des prélèvements résistants. Dans une moindre mesure un effet saison est également observé. Quelle que soit la méthode d'étude (comparaison des pourcentages ou description par l'analyse des correspondances multiples), nous ne pouvons pas mettre en évidence de différence de niveau de résistance entre les prélèvements de fientes et les prélèvements de peaux de cou.

# 4 Discussion

L'objectif de notre étude était de mettre en évidence des différences entre les pourcentages de résistance observés pour *C. jejuni* et *C.coli* avant et après les procédés d'abattage des volailles.

## 4.1 Représentativité des prélèvements

Pour des raisons pratiques, les abattoirs visités étaient situés à proximité du laboratoire. Ils n'ont pas été tirés au sort et ne sont donc pas représentatifs des abattoirs de volailles français. Cependant, la production et l'abattage des volailles en France sont très standardisés, et pour les poulets, les abattoirs visités font partie de la catégorie d'abattoirs qui abattent 88% des volumes contrôlés. Par conséquent, la diversité des abattoirs, des saisons des prélèvements et des espèces de volailles prélevées permettent de comparer les niveaux de résistance avant et après abattage. Le nombre de lots prélevés (43) permet de détecter une variation de l'ordre de 20 à 40% pour *C. jejuni* avec une puissance de 80%.

## 4.2 Comparaison de nos résultats avec le plan de surveillance des campylobacters d'origine aviaire en France

### 4.2.1 Niveau de contamination des prélèvements

Dans notre étude, les prélèvements de fientes sont contaminés à 81.4% (35/43) et les peaux de cou à 69.9% (102/146). Ces résultats sont cohérents avec les résultats du plan de surveillance des campylobacters en filière volaille de chair en France. En 2004, 85% des prélèvements de *caeca* et 66% des prélèvements de peaux de cou après enrichissement en abattoir de volailles étaient positifs pour campylobacter (Hellard and Kempf 2005).

### 4.2.2 Proportion des espèces *C. jejuni* et *C. coli* dans les prélèvements

Dans notre étude, 75.8% (72/95) des souches de campylobacters isolées à partir des fientes appartiennent à l'espèce *C. jejuni* et 24.2% (23/95) à l'espèce *C. coli*. Dans les peaux de cou, les souches de *C. jejuni* représentent 94.8% des souches collectées (293/309). Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux du plan de surveillance des campylobacters d'origine aviaire en France. En 2004, l'espèce *C. jejuni* représentait 30% des souches collectées par isolement direct à partir des *caeca* et 59.5 % des souches collectées après enrichissement à partir des peaux de cou (Hellard and Kempf 2005).

Au cours de notre étude, tous les échantillons de fientes et de peaux de cou ont été soumis à une phase d'enrichissement en bouillon de Preston. Il a été démontré que certaines souches de *C. coli* pouvaient être inhibées par les antibiotiques présents dans le bouillon de Preston (Corry, Post et al. 1995), ce qui pourrait expliquer en partie la différence observée pour les échantillons de fientes. Pour les prélèvements de peaux de cou, pour lesquels la même technique d'enrichissement (bouillon d'enrichissement de Preston) est utilisée, on observe également proportionnellement très peu de campylobacters de l'espèce *C. coli*. Les espèces de volailles prélevées dans notre étude sont majoritairement des poulets de type standard et des poulets fermiers. Dans le plan de surveillance en

2004, les trois types de volaille prélevés sont standard, export et label. A la différence du plan de surveillance national, notre étude ne comprend pas de poulet label. Toutefois, il ne semble pas que cette différence de recrutement permette d'expliquer la très forte proportion de *C. jejuni* dans nos prélèvements par rapport au plan de surveillance en France en 2004.

### 4.2.3 Pourcentages de résistance aux antibiotiques observés

Pour *C. coli*, les pourcentages de résistance observés dans les fientes et les peaux de cou sont comparables aux résultats du plan de surveillance de 2004 en France. Pour *C. jejuni*, les pourcentages de résistances observés sont comparables aux résultats du plan de surveillance de 2004 sauf pour les fluoroquinolones. Dans notre étude, la molécule testée est l'enrofloxacine et nous observons un pourcentage de résistance de 32.1 à 38.1% en fonction de la méthode de mesure, et dans le plan de surveillance en France, la molécule étudiée est la ciprofloxacine et seuls 9% des *C. jejuni* présentent une résistance.

## 4.3 Comparaison des pourcentages de résistance aux antibiotiques observés

### 4.3.1 Mesure de la résistance aux antibiotiques

La mesure de la résistance sur l'ensemble des isolats collectés ne tient pas compte du fait que certains isolats sont probablement des doublons. Par conséquent, la mesure de la résistance sur l'ensemble des isolats entraîne une pondération de la résistance observée par les prélèvements dans lesquels un grand nombre d'isolats ont été collectés. Une méthode utilisable pour limiter ce biais est de prendre en compte le nombre d'isolats collectés par prélèvement (Davison, Low et al. 2000) ce qui correspond aux résultats de pourcentage de résistance estimé dans notre étude.

Actuellement, les recommandations des plans de surveillance en Europe indiquent qu'il est souhaitable de pouvoir mesurer la prévalence de la résistance au sein des populations animales hôtes des bactéries résistantes. La mesure de cette prévalence nécessite que seul 1 isolat de chaque espèce de campylobacter soit analysé par lot prélevé (Anonymous 2007). Cette méthode de mesure est un compromis entre ce que l'on recherche (les campylobacters résistants aux antibiotiques) et l'applicabilité des plans de prélèvements dans les états membres. Dans notre étude, nos méthodes d'isolement nous permettaient de détecter jusqu'à 4 isolats par prélèvement. Afin de pouvoir exploiter l'ensemble des informations dont nous disposons sur les isolats collectés dans nos prélèvements, nous avons choisi de noter pour chaque prélèvement les résistances aux antibiotiques observés sur les isolats. Cette méthode augmente la probabilité de détecter la résistance aux antibiotiques, le problème est de déterminer combien de souches sont à analyser pour avoir une vision la plus complète possible de la résistance aux antibiotiques dans les prélèvements. Le nombre de souches à isoler pour détecter la résistance dépend du niveau de résistance attendu. Avec 365 isolats collectés, nous pouvions détecter une souche résistante avec une probabilité p=0.95 pour un niveau de résistance de 1% (Toma, Dufour et al. 2001).

### 4.3.2 Comparaison des pourcentages de résistance aux antibiotiques observés avant et après abattage des volailles

Contrairement à l'hypothèse initiale de notre étude, nous n'avons pas mis en évidence de différence de pourcentage de résistance entre les prélèvements avant et après abattage des volailles (fientes et peaux de cou). Les procédés d'abattage et donc les stress environnementaux subit par campylobacter pendant l'abattage des volailles ne semble pas favoriser la sélection des campylobacters résistants aux antibiotiques.

### 4.3.3 Influence des paramètres zootechniques sur les pourcentages de résistance observés

Nos prélèvements ont permis la mise en évidence de différences significatives entre les pourcentages de résistances observés pour les deux espèces *C. jejuni* et *C. coli* en fonction des abattoirs, de la saison pendant laquelle les prélèvements ont été réalisés et de l'espèce de volaille abattue. Ces différences sont observées pour certains ou pour tous les antibiotiques. Il a déjà été observé que le type de production (standard, export, label) avait une influence sur le niveau de résistance à la tétracycline de l'espèce *C. coli*. Dans cette étude, les *C. coli* isolés de prélèvements de volaille de type « standard » et « export » présentaient un niveau de résistance à la tétracycline plus élevé que ceux isolés dans les prélèvements de volaille de type « label et bio » (90 vs 51% respectivement) (Avrain, Humbert et al. 2003). L'analyse descriptive des prélèvements par les correspondances multiples a permis, pour l'espèce *C. jejuni* d'observer des groupes qui s'opposaient en fonction des abattoirs, des saisons et de l'espèce de volaille abattue. Notre plan de prélèvements est déséquilibré pour ces trois variables. En effet, il ressort de cette description que les prélèvements réalisés dans l'abattoir 4 et pendant l'automne seraient « plus résistants », mais il n'y a que peu de prélèvements réalisés dans l'abattoir 4 et pendant l'automne, ce qui rend ces évènements rares et peut entraîner un biais dans la description des données des prélèvements. De plus, il existe un lien entre les abattoirs, les espèces de volailles abattues et les pratiques d'élevage, en raison de l'organisation et du fonctionnement de la filière avicole en France.

Notre étude visait à déterminer si les opérations d'abattage pouvaient entraîner une sélection des souches résistantes aux antibiotiques. Les prélèvements réalisés permettent de répondre à cette question car, pour *C. jejuni,* des variations de pourcentages de 20 à 40% sont détectables. Pour *C. coli*, les différences que nous pouvions mettre en évidence sont souvent supérieures à 50%, ce qui est lié à la faible contamination des prélèvements réalisés par cette espèce. La question est de savoir quelle est la variation de résistance qu'il est intéressant de pouvoir détecter dans un but de santé publique. La réponse à cette question est laissée au gestionnaire du risque, mais il ressort de notre étude que les opérations d'abattage et les procédures de nettoyage et désinfection en abattoir de volaille ne semblent pas entraîner une augmentation de la résistance aux antibiotiques.

# CONCLUSION

L'objectif de la thèse était d'analyser l'évolution de la résistance aux antibiotiques des campylobacters au cours des opérations de nettoyage et de désinfection et au cours de l'abattage dans les abattoirs de volailles.

La première partie de l'étude a permis de démontrer que *C. jejuni* et *C. coli* sont capables de survivre aux opérations de nettoyage et de désinfection dans les abattoirs de volailles. Dans les caisses de transport, nous avons observé que les procédures de nettoyage et de désinfection n'ont pas d'effet sur le pourcentage de caisses contaminées par campylobacter. Cette observation est en accord avec les résultats de nombreuses études portant sur l'efficacité du nettoyage et de la désinfection dans les caisses de transport des volailles de l'élevage à l'abattoir (Berndtson, Danielsson-Tham et al. 1996; Slader, Domingue et al. 2002; Berrang and Northcutt 2005; Hansson, Ederoth et al. 2005). Les campylobacters sont des bactéries très sensibles au stress et plusieurs études réalisées auparavant n'avaient pas permis de les détecter sur les surfaces des abattoirs après nettoyage et désinfection (Borck, Stryhn et al. 2002; Miwa, Takegahara et al. 2003; Cools, Uyttendaele et al. 2005; Malakauskas, Jorgensen et al. 2006). Au cours des prélèvements réalisés dans notre étude, nous avons isolé campylobacter sur les surfaces des abattoirs après les opérations de nettoyage et de désinfection au cours de 5 visites dans 3 des 4 abattoirs visités. La survie de campylobacter dans les abattoirs de volailles après nettoyage et désinfection a également été rapportée dans une étude récente (Johnsen, Kruse et al. 2007).

Il a été émis l'hypothèse que les désinfectants (Russell 1999; Russell, Suller et al. 1999; Sidhu, Heir et al. 2002; Aiello and Larson 2003) et les stress subis par les bactéries au cours des procédés d'abattage (DANMAP 1999; McMahon, Xu et al. 2007) pouvaient favoriser la sélection de gènes de résistance aux antibiotiques. Nous avons donc étudié d'une part si les procédures de nettoyage et de désinfection, et d'autre part, si les procédés d'abattage (des caisses de transport aux carcasses avant l'entrée en salle de ressuage) avaient une influence sur les niveaux de résistance aux antibiotiques des campylobacters. L'analyse a été réalisée avec des tests statistiques de comparaison (test du $\chi^2$ ou test exact de Fisher) entre les pourcentages de résistance observés et des tests de corrélation (test des rangs de Spearman) entre les distributions des CMI des molécules antibiotiques et désinfectantes testées.

L'étude de l'impact des procédures de nettoyage et de désinfection sur les niveaux de résistance aux antibiotiques de campylobacter a été réalisée dans les caisses de transport des volailles et sur les surfaces de l'abattoir en contact avec les carcasses avant et après nettoyage et désinfection. Dans les caisses de transport, aucune différence, pour *C. jejuni* ou pour *C. coli*, n'a été mise en évidence. Dans l'environnement de l'abattoir, seulement 26 isolats de campylobacter ont pu être isolés après nettoyage et désinfection. Les tests de comparaison n'ont pas mis en évidence de différence entre les niveaux de résistance observés avant et après nettoyage et désinfection, sauf pour *C. jejuni* et

l'ampicilline. Pour cette molécule, une diminution statistiquement significative du niveau de résistance était observée après nettoyage et désinfection. Les différences pour les autres molécules d'antibiotiques testées n'étaient pas significatives, mais les histogrammes de distribution des CMI semblent également aller dans le sens d'une diminution de la résistance aux antibiotiques. Aucune corrélation entre les distributions de CMI des molécules antibiotiques et désinfectantes testées n'a été mise en évidence. Malgré tout, l'observation d'une corrélation entre les molécules d'ammoniums quaternaires d'une part, et les molécules d'antibiotiques de la famille des aminoglycosides, a permis de confirmer les CMI que nous avons mesurées.
L'analyse de l'influence des procédés d'abattage sur les niveaux de résistance aux antibiotiques de campylobacter a été réalisée sur 43 lots de volailles. Les tests de comparaison entre les pourcentages de résistance aux antibiotiques des campylobacters isolés dans les fientes (avant abattage) et dans les peaux de cou (après abattage) n'ont pas permis de mettre en évidence de différence statistiquement significative.

Contrairement à notre hypothèse de départ, les résultats de notre étude indiquent que les procédures de nettoyage et de désinfection, ainsi que les procédés d'abattage (avant l'entrée des carcasses en ressuage) dans les abattoirs de volailles ne semblent pas avoir d'influence sur les niveaux de résistance de *C. jejuni* et *C. coli*.

L'influence sur le niveau de résistance aux antibiotiques d'autres stress rencontrés par les campylobacters entre le ressuage et l'assiette du consommateur devrait maintenant être investiguée. Une étude récente (McMahon, Xu et al. 2007) a exploré l'hypothèse que les stress sublétaux engendrés par les procédés de conservation (haute et basse températures, stress osmotique et acide) pouvait conduire à des modifications dans la nature et le niveau de la résistance aux antibiotiques. L'étude portait sur 3 pathogènes alimentaires ( *E. coli*, *S. enteritica* serovar Typhimurium et *S. aureus*). Les résultats de cette étude montrent que certains stress (une température d'incubation de 45°C, une incubation en présence d'un fort degré de salinité (>4.5%) ou en milieu acide (pH<5) ) entraînent une augmentation du niveau de résistance aux antibiotiques (c'est à dire une augmentation de la CMI mesurée). De plus, l'augmentation de la résistance perdure malgré le retrait du stress, ce qui suggère que dans certains cas, les stress sublétaux appliqués aient entraîné une augmentation stable de la résistance aux antibiotiques. Par conséquent, il pourrait être pertinent d'étudier l'impact des différents procédés de ressuage (liés à des stress thermiques et osmotiques) et de conservation (liés à des stress thermiques et chimiques) des produits de volailles sur les niveaux de résistance aux antibiotiques de campylobacter.

Enfin, dans notre étude, nous avons associé un critère d'inhibition (mesure de la CMI) à la capacité de survie des souches de campylobacters. L'étude de la résistance aux désinfectants ne peut se limiter à des études *in vitro* en raison de l'importance des interactions à la fois des bactéries et des désinfectants avec le milieu dans lequel ils se trouvent. L'isolement des campylobacters dans l'environnement des abattoirs de volailles après nettoyage et désinfection est-il lié à une mauvaise

utilisation du désinfectant ou ces souches possèdent-elles intrinsèquement des capacités génétiques pour survivre sur les surfaces ?. L'étude de cette deuxième hypothèse pourrait s'envisager sous l'angle de la survie. La mise au point d'une technique d'évaluation de la sensibilité aux désinfectants, permettant de s'affranchir du milieu de croissance qui interagit avec la plupart des molécules désinfectantes devrait être explorée. Il a déjà été mis en évidence que, en dépit de conditions fastidieuses pour se multiplier, *C. jejuni* est capable de survivre dans des conditions qui ne lui permettent pas de croître. Dans un environnement aqueux, la survie est limitée à quelques jours à température ambiante, mais elle est notablement augmentée à 4°C (Thomas, Hill et al. 1999). L'étude de la cinétique de bactéricidie en milieu aqueux et en présence de concentrations croissantes de désinfectant pourrait être réalisée afin d'explorer des différences de survie des souches en fonction des conditions du milieu.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES


Aarestrup, F. M. (2005). Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Basic Clin Pharmacol Toxicol **96**(4): 271-81.

Aarestrup, F. M. and J. Engberg (2001). Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. Vet Res **32**(3-4): 311-21.

AFNOR (1996). Microbiologie des aliments: methode horizontale pour la recherche de *Campylobacter* thermotolérants. N. 10272. Paris: Association française de normalisation**:** 11-14.

AFNOR (1999). "Hygiène et sécurité des produits alimentaires. Glossaire hygiène" Fascicule de documentation, FD V 01-002."

Aiello, A. E. and E. Larson (2003). Antibacterial cleaning and hygiene products as an emerging risk factor for antibiotic resistance in the community. Lancet Infect Dis **3**(8): 501-6.

Alonso, A., P. Sanchez, et al. (2001). Environmental selection of antibiotic resistance genes. Environ Microbiol **3**(1): 1-9.

Altekruse, S. F., N. J. Stern, et al. (1999). *Campylobacter jejuni*-an emerging foodborne pathogen. Emerg Infect Dis **5**(1): 28-35.

Alter, T., F. Gaull, et al. (2005). Distribution of *Campylobacter jejuni* strains at different stages of a turkey slaughter line. Food Microbiology **22**: 345-351.

Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. J Antimicrob Chemother **48 Suppl 1**: 5-16.

Anonymous (2003). Trends and sources of zoonotic agents in animals, feedingstuffs, food and man in the European Union and Norway in 2003., European commission, Health and Consumer Protection Directorate D - Food safety: Production and distribution Chain**:** 191-197.

Anonymous (2004). Appréciation des risques alimentaires liés aux campylobacters. Application au couple poulet/*Campylobacter jejuni*, AFSSA.

Anonymous (2005). Guide Orsol Volailles-oeufs. Filières avicoles.

Anonymous (2006). Rapport du programme français de surveillance de l'antibiorésistance des bactéries d'origine animale, AFSSA.

Anonymous (2006). Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2005, AFSSA-Ministère de l'agriculture.

Anonymous (2006). Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine, AFSSA.

Anonymous (2007). Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur un projet de Règlement relatif à la décontamination des carcasses de volailles, AFSSA.

Anonymous (2007). Report of the Task Force of Zoonoses Data Collection including a proposal for a harmonized monitoring scheme of antimicrobial resistance in *Salmonella* in fowl (Gallus

Gallus), turkeys, and pigs and *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in broilers. The EFSA Journal(96): 1-46.

Avrain, L., L. Allain, et al. (2003). Disinfectant susceptibility testing of avian and swine *Campylobacter* isolates by a filtration method. Vet Microbiol **96**(1): 35-40.

Avrain, L., F. Humbert, et al. (2003). Antimicrobial resistance in *Campylobacter* from broilers: association with production type and antimicrobial use. Vet Microbiol **96**(3): 267-76.

Avrain, L. and I. Kempf (2000). Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques. L'exemple de *Campylobacter*. Point Vet. **31**(210): 509-513.

Axelsson-Olsson, D., J. Waldenstrom, et al. (2005). Protozoan *Acanthamoeba polyphaga* as a potential reservoir for *Campylobacter jejuni*. Appl Environ Microbiol **71**(2): 987-92.

Ayling, R. D., M. J. Woodward, et al. (1996). Restriction fragment length polymorphism of polymerase chain reaction products applied to the differentiation of poultry campylobacters for epidemiological investigations. Res Vet Sci **60**(2): 168-72.

Baquero, F., M. C. Negri, et al. (1998). Antibiotic-selective environments. Clin Infect Dis **27 Suppl 1**: S5-11.

Baserisalehi, M., N. Bahador, et al. (2004). Enhanced recovery and isolation of *Campylobacter* spp. from water using a novel device. J Appl Microbiol **96**(4): 664-70.

Berg, J., A. Tom-Petersen, et al. (2005). Copper amendment of agricultural soil selects for bacterial antibiotic resistance in the field. Lett Appl Microbiol **40**(2): 146-51.

Berndtson, E., M. L. Danielsson-Tham, et al. (1996). *Campylobacter* incidence on a chicken farm and the spread of *Campylobacter* during the slaughter process. Int J Food Microbiol **32**(1-2): 35-47.

Berrang, M. E., R. J. Buhr, et al. (2001). Broiler carcass contamination with *Campylobacter* from feces during defeathering. J Food Prot **64**(12): 2063-6.

Berrang, M. E. and J. K. Northcutt (2005). Use of water spray and extended drying time to lower bacterial numbers on soiled flooring from broiler transport coops. Poult Sci **84**(11): 1797-801.

Berrang, M. E., J. K. Northcutt, et al. (2003). Role of dump cage fecal contamination in the transfer of *Campylobacter* to carcasses of previously negative broilers. J App Poultry Res **12**(2): 190-195.

Bessems, E. (1998). The effect of practical conditions on the efficacy of disinfectants. Int Biodeter& Biodegrad **41**: 177-183.

Beumer, R., S. F. Bloomfield, et al. (2000). Microbial resistance and biocides., International Scientific Forum on Home Hygiene (IFH).

Blaser, M. J., P. F. Smith, et al. (1986). Inactivation of *Campylobacter jejuni* by chlorine and monochloramine. Appl Environ Microbiol **51**(2): 307-11.

Bloomfield, S. F. (2002). Significance of biocide usage and antimicrobial resistance in domiciliary environments. Symp Ser Soc Appl Microbiol(31): 144S-157S.

Bolton, F. J. and L. Robertson (1982). A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. J Clin Pathol **35**(4): 462-7.

Borck, B. and K. Pedersen (2005). Pulsed-field gel electrophoresis types of *Campylobacter* spp. in Danish turkeys before and after slaughter. Int J Food Microbiol **101**(1): 63-72.

Borck, B., H. Stryhn, et al. (2002). Thermophilic *Campylobacter* spp. in turkey samples: evaluation of two automated enzyme immunoassays and conventional microbiological techniques. J Appl Microbiol **92**(3): 574-82.

Bore, E. and S. Langsrud (2005). Characterization of micro-organisms isolated from dairy industry after cleaning and fogging disinfection with alkyl amine and peracetic acid. J Appl Microbiol **98**(1): 96-105.

Bower, C. K. and M. A. Daeschel (1999). Resistance responses of microorganisms in food environments. Int J Food Microbiol **50**(1-2): 33-44.

Braoudaki, M. and A. C. Hilton (2004). Low level of cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Escherichia coli K-12* and *E. coli O55* compared to *E. coli O157*. FEMS Microbiol Lett **235**(2): 305-9.

Brill, F., P. Goroncy-Bermes, et al. (2006). Influence of growth media on the sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* to cationic biocides. Int J Hyg Environ Health **209**(1): 89-95.

Bull, S. A., V. M. Allen, et al. (2006). Sources of *Campylobacter* spp. colonizing housed broiler flocks during rearing. Appl Environ Microbiol **72**(1): 645-52.

Buswell, C. M., Y. M. Herlihy, et al. (1998). Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and -rRNA staining. Appl Environ Microbiol **64**(2): 733-41.

Butzler, J.-P. (2004). Campylobacter, from obscurity to celebrity. Clin Microb and Infect **10**(10): 868-876.

CA-SFM (2007). Communiqué du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.

Chan, K. F., H. Le Tran, et al. (2001). Survival of clinical and poultry-derived isolates of *Campylobacter jejuni* at a low temperature (4 degrees C). Appl Environ Microbiol **67**(9): 4186-91.

Chapman, J. S. (2003). Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. Int Biodeter & Biodegrad **51**: 271-276.

Cloete, T. E. (2003). Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. Int. Biodeter. Biodegrad. **51**: 277-282.

Cockerill, F. R., 3rd (1999). Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother **43**(2): 199-212.

Cogan, T. A., S. F. Bloomfield, et al. (1999). The effectiveness of hygiene procedures for prevention of cross-contamination from chicken carcases in the domestic kitchen. Lett Appl Microbiol **29**(5): 354-8.

Connell, S. R., C. A. Trieber, et al. (2003). Mechanism of Tet(O)-mediated tetracycline resistance. Embo J **22**(4): 945-53.

Cools, I., M. Uyttendaele, et al. (2005). Persistence of *Campylobacter jejuni* on surfaces in a processing environment and on cutting boards. Lett Appl Microbiol **40**(6): 418-23.

Cooper, R., H. Segal, et al. (2002). Genetic basis of quinolone resistance and epidemiology of resistant and susceptible isolates of porcine *Campylobacter coli* strains. J Appl Microbiol **93**(2): 241-9.

Corcoran, D., T. Quinn, et al. (2005). Characterization of a cmeABC operon in a quinolone-resistant *Campylobacter coli* isolate of Irish origin. Microb Drug Resist **11**(4): 303-8.

Corry, J. E., V. M. Allen, et al. (2002). Sources of *Salmonella* on broiler carcasses during transportation and processing: modes of contamination and methods of control. J Appl Microbiol **92**(3): 424-32.

Corry, J. E. and H. I. Atabay (2001). Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. Symp Ser Soc Appl Microbiol(30): 96S-114S.

Corry, J. E., D. E. Post, et al. (1995). Culture media for the isolation of campylobacters. Int J Food Microbiol **26**(1): 43-76.

Courvalin, P. and P. Trieu-Cuot (2001). Minimizing potential resistance: the molecular view. Clin Infect Dis **33 Suppl 3**: S138-46.

Cox, N. A., N. J. Stern, et al. (2002). Identification of a new source of *Campylobacter* contamination in poultry: transmission from breeder hens to broiler chickens. Avian Dis **46**(3): 535-41.

Cremieux, A., J. Freney, et al. (1995). Mécanismes d'action sur les bactéries et les champignons. Antisepsie et désinfection. ESKA**:** 23-35.

DANMAP (1999). Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark..

DANMAP (2000). Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark.

DANMAP (2001). Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark.

DANMAP (2002). Use of antimicrobial agents and occurence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark.

DANMAP (2003). Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark.

DANMAP (2004). Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark.

DANMAP (2005). Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark.

Davison, H. C., J. C. Low, et al. (2000). What is antibiotic resistance and how can we measure it? Trends Microbiol **8**(12): 554-9.

Denis, M., J. Refregier-Petton, et al. (2001). *Campylobacter* contamination in French chicken production from farm to consumers. Use of a PCR assay for detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Camp. coli*. J Appl Microbiol **91**(2): 255-67.

Denis, M., C. Soumet, et al. (1999). Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. Lett Appl Microbiol **29**(6): 406-10.

Denyer, S. P. and G. S. A. B. Stewart (1998). Mechanisms of action of disinfectants. Int Biodeter & Biodegrad **41**: 261-268.

Dingle, K. E., F. M. Colles, et al. (2002). Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* clones: a basis for epidemiologic investigation. Emerg Infect Dis **8**(9): 949-55.

Dingle, K. E., F. M. Colles, et al. (2001). Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol **39**(1): 14-23.

Dingle, K. E. and M. C. Maiden (2005). Population genetics of *Campylobacter jejuni*. in Campylobacter -Molecular and cellular biology, Horizon Bioscience**:** 43-57.

Doyle, L. (1944). A vibrio associated with swine dysentery. Am J Vet Res **5**: 3-5.

Dromigny, E. (2007). Campylobacter, Lavoisier.

Endtz, H. P., G. J. Ruijs, et al. (1991). Quinolone resistance in campylobacter isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. J Antimicrob Chemother **27**(2): 199-208.

Engberg, J., F. M. Aarestrup, et al. (2001). Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. Emerg Infect Dis **7**(1): 24-34.

Engberg, J., J. Neimann, et al. (2004). Quinolone resistant *Campylobacter* infections in Denmark: risk factors and clinical consequences. Emerg Infect Dis **10**(6): 1056-1063.

Escherish, T. (1886). Beitrage zur Kenntniss der Darmbactrien. III. Ueber das Vorkommen von Vibrionen im Darmcanal und den Stuhlgangen der Sauglinge. Münchner Med Wochenshrift **33**: 815-817.

Euzéby, J. P. (2003). Evaluation *in vitro* de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/

Evans, S. J. and A. R. Sayers (2000). A longitudinal study of *campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain. Prev Vet Med **46**(3): 209-23.

Federighi, M. (1999). *Campylobacter* et hygiène des aliments. Polytechnica**:** 2-3.

Fitzgerald, C., A. Sails, et al. (2005). Campylobacter jejuni strain variation. in Campylobacter - Molecular and cellular biology, Horizon Bioscience**:** 59-77.

Fleurette, J., J. Freney, et al. (1997). Guide pratique de l'antisepsie et de la désinfection.

Florent, A. (1959). Les deux Vibrioses génitales de la bête bovine: la vibriose vénérienne, due à *V. fetus venerialis*, et la vibriose d'origine intestinale due à *V. fetus intestinalis*. 16th Int Vet Congr.

Fluit, A. C., M. R. Visser, et al. (2001). Molecular detection of antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev **14**(4): 836-71.

Foxman, B., L. Zhang, et al. (2005). Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. Epidemiol Perspect Innov **2**: 10.

Gallay, A., V. Prouzet-Mauléon, et al. (2007). *Campylobacter* antimicrobial drug resistance among humans, broiler chickens, and pigs, France. Emerg Infect Dis **13**(2): 259-266.

Gibreel, A. and O. Skold (1998). High-level resistance to trimethoprim in clinical isolates of *Campylobacter jejuni* by acquisition of foreign genes (dfr1 and dfr9) expressing drug-insensitive dihydrofolate reductases. Antimicrob Agents Chemother **42**(12): 3059-64.

Gibreel, A., O. Skold, et al. (2004). Characterization of plasmid-mediated aphA-3 kanamycin resistance in *Campylobacter jejuni*. Microb Drug Resist **10**(2): 98-105.

Gibreel, A. and D. E. Taylor (2006). Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J Antimicrob Chemother **58**(2): 243-55.

Gilbert, P., D. G. Allison, et al. (2002). Biofilms *in vitro* and *in vivo*: do singular mechanisms imply cross-resistance? J Appl Microbiol **92 Suppl**: 98S-110S.

Gilbert, P. and A. J. McBain (2003). Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. Clin Microbiol Rev **16**(2): 189-208.

Gonzalez, I., K. A. Grant, et al. (1997). Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *ceu*E gene encoding a putative virulence determinant. J Clin Microbiol **35**(3): 759-63.

Goossens, H., M. De Boeck, et al. (1983). A new selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from human faeces. Eur J Clin Microbiol **2**(4): 389-93.

Gupta, A., J. Nelson, et al. (2004). Antimicrobial resistance among *Campylobacter* strains, United States, 1997-2001. Emerg Infect Dis **10**(6): 1102-1109.

Hald, B., H. Skovgard, et al. (2004). Flies and *Campylobacter* infection of broiler flocks. Emerg Infect Dis **10**(8): 1490-2.

Hansson, I., M. Ederoth, et al. (2005). Transmission of *Campylobacter* spp. to chickens during transport to slaughter. J Appl Microbiol **99**(5): 1149-57.

Hariharan, H., G. A. Murphy, et al. (2004). *Campylobacter jejuni*: Public health hazards and potential control methods in poultry: a review. Vet. Med.-Czech **49**(11): 441-446.

Hazeleger, W. C., J. A. Wouters, et al. (1998). Physiological activity of *Campylobacter jejuni* far below the minimal growth temperature. Appl Environ Microbiol **64**(10): 3917-22.

Heinzel, M. (1998). Phenomena of biocide resistance in microorganisms. Int Biodeter & Biodegrad **41**: 225-234.

Heir, E., G. Sundheim, et al. (1995). Resistance to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* spp. isolated from the food industry and nucleotide sequence of the resistance plasmid pST827. J Appl Bacteriol **79**(2): 149-56.

Heir, E., G. Sundheim, et al. (1999). Identification and characterization of quaternary ammonium compound resistant staphylococci from the food industry. Int J Food Microbiol **48**(3): 211-9.

Heir, E., G. Sundheim, et al. (1999). The qacG gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. J Appl Microbiol **86**(3): 378-88.

Hellard, G. and I. Kempf (2005). Convention relative à la surveillance de la résistance aux antibiotiques des bactéries sentinelles et responsables de zoonoses (programme BS2004), AFSSA.

Helms, M., J. Simonsen, et al. (2005). Adverse health events associated with antimicrobial drug resistance in *Campylobacter* species: a registry-based cohort study. J Infect Dis **191**(7): 1050-5.

Heuer, O. E., K. Pedersen, et al. (2001). Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler flocks. Lett Appl Microbiol **33**(4): 269-74.

Hiett, K. L., N. J. Stern, et al. (2002). Molecular subtype analyses of *Campylobacter spp.* from Arkansas and California poultry operations. App Env Microb **68**(12): 6220-6236.

Holah, J. T., J. H. Taylor, et al. (2002). Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. Symp Ser Soc Appl Microbiol(31): 111S-120S.

Humphrey, T., M. Mason, et al. (1995). The isolation of *Campylobacter jejuni* from contaminated surfaces and its survival in diluents. Int J Food Microbiol **26**(3): 295-303.

Humphrey, T., S. O'Brien, et al. (2007). Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. Int J Food Microbiol **In Press, Corrected Proof**.

Humphrey, T. J. (1989). An appraisal of the efficacy of pre-enrichment for the isolation of *Campylobacter jejuni* from water and food. J Appl Bacteriol **66**(2): 119-26.

InVS (2004). Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France.

Iovine, N. M. and M. J. Blaser (2004). Antibiotics in animal feed and spread of resistant *Campylobacter* from poultry to humans. Emerg Infect Dis **10**(6): 1158-1159.

Jacobs-Reitsma, W. F., A. W. van de Giessen, et al. (1995). Epidemiology of *Campylobacter* spp. at two Dutch broiler farms. Epidemiol Infect **114**(3): 413-21.

Johannessen, G. S., G. Johnsen, et al. (2007). Enumeration of thermotolerant *Campylobacter* spp. from poultry carcasses at the end of the slaughter-line. Lett Appl Microbiol **44**(1): 92-7.

Johnsen, G., H. Kruse, et al. (2007). Genotyping of thermotolerant *Campylobacter* from poultry slaughterhouse by amplified fragment length polymorphism. Journal of Applied Microbiology **103**(2): 271-279.

Jones, F., M. Orcutt, et al. (1931). Vibrio (*Vibrio jejuni n. sp.*),associated with intestinal disorders of cows and calves. J Exp Med **53**: 853-864.

Joshua, G. W., C. Guthrie-Irons, et al. (2006). Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. Microbiol **152**(Pt 2): 387-96.

Karmali, M. A., A. E. Simor, et al. (1986). Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. J Clin Microbiol **23**(3): 456-9.

King, E. O. (1957). Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related Vibrio isolated from cases of human vibriosis. J infect Dis **101**: 119-128.

Knudsen, K. N., D. D. Bang, et al. (2005). Genotyping of *Campylobacter jejuni* strains from Danish broiler chickens by restriction fragment length polymorphism of the LPS gene cluster. J Appl Microbiol **99**(2): 392-9.

Kummerer, K. (2004). Resistance in the environment. J Antimicrob Chemother **54**(2): 311-20.

Kusumaningrum, H. D., G. Riboldi, et al. (2003). Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. Int J Food Microbiol **85**(3): 227-36.

Langsrud, S., M. Singh Sidhu, et al. (2003). Bacterial disinfectant resistance-a challenge for the food industry. Int Biodeter & Biodegrad **51**: 283-290.

Langsrud, S. and G. Sundheim (1998). Factors influencing a suspension test method for antimicrobial activity of disinfectants. J Appl Microbiol **85**(6): 1006-12.

Langsrud, S., G. Sundheim, et al. (2004). Cross-resistance to antibiotics of *Escherichia coli* adapted to benzalkonium chloride or exposed to stress-inducers. J Appl Microbiol **96**(1): 201-8.

Lawson, A. J., D. Linton, et al. (1997). Polymerase chain reaction detection and speciation of Campylobacter upsaliensis and C. helveticus in human faeces and comparison with culture techniques J Appl Microbiol **83**(3): 375-80.

Lear, J. C., J. Y. Maillard, et al. (2006). Chloroxylenol- and triclosan-tolerant bacteria from industrial sources-susceptibility to antibiotics and other biocides. Int Biodete & Biodegrad **57**(1): 51-56.

Ledder, R. G., P. Gilbert, et al. (2006). Effects of chronic triclosan exposure upon the antimicrobial susceptibility of 40 ex-situ environmental and human isolates. J Appl Microbiol **100**(5): 1132-40.

Lee, M. D., S. Sanchez, et al. (2002). Class 1 integron-associated tobramycin-gentamicin resistance in *Campylobacter jejuni* isolated from the broiler chicken house environment. Antimicrob Agents Chemother **46**(11): 3660-4.

Lehuraux, V. (1997). Nettoyage et désinfection en abattoir de volailles. Ecole nationale vétérianire de Lyon. Lyon, Université Claude Bernard-Lyon I**:** 85.

Levy, A. (1946). A gastro-enteritis outbreak probably due to a bovine strain of Vibrio. J Infect Dis **18**: 243-258.

Levy, S. B. (2002). Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. J. Antimicrob. Chemother. **49**: 25-30.

Levy, S. B., G. B. FitzGerald, et al. (1976). Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man. Nature **260**(5546): 40-2.

Lewis, K. (2005). Persister cells and the riddle of biofilm survival. Biochemistry (Mosc) **70**(2): 267-74.

Lin, J., L. O. Michel, et al. (2002). CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. Antimicrob Agents Chemother **46**(7): 2124-31.

Lin, J., M. Yan, et al. (2007). Effect of macrolide usage on emergence of erythromycin-resistant campylobacter isolates in chickens. Antimicrob Agents Chemother **51**(5): 1678-1686.

Lindblad, M., I. Hansson, et al. (2006). Postchill campylobacter prevalence on broiler carcasses in relation to slaughter group colonization level and chilling system. J Food Prot **69**(3): 495-9.

Linton, D., A. J. Lawson, et al. (1997). PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli direct from diarrheic samples. J Clin Microbiol **35**(10): 2568-72.

Lior, H. (1984). New, extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *"Campylobacter laridis"*. J Clin Microbiol **20**(4): 636-40.

Lior, H., D. L. Woodward, et al. (1982). Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. J Clin Microbiol **15**(5): 761-768.

Lukinmaa, S., U. M. Nakari, et al. (2004). Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens. Apmis **112**(11-12): 908-29.

Lüneberg, E., E. Glenn-Calvo, et al. (1998). The central, surface-exposed region of the flagellar hook protein Flge of *Campylobacter jejuni* shows hypervariability among strains. J Bacteriol **180**(14): 3711-3714.

Madden, R. H., L. Moran, et al. (2000). Optimising recovery of *Campylobacter* spp. from the lower porcine gastrointestinal tract. J Microbiol Methods **42**(2): 115-9.

Maillard, J. Y. (2002). Bacterial target sites for biocide action. J Appl Microbiol **92 Suppl**: 16S-27S.

Malakauskas, M., K. Jorgensen, et al. (2006). Isolation of *Campylobacter* spp. from a pig slaughterhouse and analysis of cross-contamination. Int J Food Microbiol **108**(3): 295-300.

Mamelli, L., V. Prouzet-Mauleon, et al. (2005). Molecular basis of macrolide resistance in *Campylobacter*: Role of efflux pumps and target mutations. J Antimicrob Chemother **56**(3): 491-7.

McDermott, P. F., S. M. Bodeis, et al. (2002). Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* evolves rapidly in chickens treated with fluoroquinolones. J Infect Dis **185**(6): 837-40.

McDonnell, G. and A. D. Russell (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clin Microbiol Rev **12**(1): 147-79.

McDowell, D. A. (2004). Food processing stresses in the spread of antibiotic resistance. Safety assurance during food processing : food safety assurance and veterinary public health, vol. 2. F. J. M. S. a. J. D. Collins, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.**:** 243-264.

McEwen, S. A. and P. J. Fedorka-Cray (2002). Antimicrobial use and resistance in animals. Clin Infect Dis **34 Suppl 3**: S93-S106.

McFadyean, J. and S. Stockman (1913). Report of the Departemental Committee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to inquire into epizootic abortion. part III. Abortion in sheep., London:HMSO.

McMahon, M. A. S., J. Xu, et al. (2007). Environmental stress and antibiotic resistance in food-related pathogens. Appl Environ Microbiol **73**(1): 211-217.

Megraud, F. (2000). *Campylobacter*. Précis de bactériologie clinique. ESKA, Alexandre Lacassagne.

Meinersmann, R. J., L. O. Helsel, et al. (1997). Discrimination of *Campylobacter jejuni* isolates by fla gene sequencing. J Clin Microbiol **35**(11): 2810-4.

Meinersmann, R. J., C. M. Patton, et al. (2002). Genetic diversity and relationships of *Campylobacter* species and subspecies. Int J Syst Evol Microbiol **52**(5): 1789-1797.

Miwa, N., Y. Takegahara, et al. (2003). *Campylobacter jejuni* contamination on broiler carcasses of *C. jejuni-negative* flocks during processing in a Japanese slaughterhouse. Int J Food Microbiol **84**(1): 105-9.

Moller Nielsen, E., J. Engberg, et al. (2000). Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry, and cattle. J Clin Microbiol **38**(10): 3800-3810.

Moore, J. E., M. D. Barton, et al. (2006). The epidemiology of antibiotic resistance in Campylobacter. Microbes Infect **8**(7): 1955-66.

Moore, J. E., D. Corcoran, et al. (2005). *Campylobacter*. Vet Res **36**(3): 351-82.

Murphy, C., C. Carroll, et al. (2006). Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. J Appl Microbiol **100**(4): 623-32.

NCCLS (2002). Approved standard M31-A2-NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Wayne, Pa. **22**.

NCCLS (2003). Approved sstandard M7-A6-NCCLS. Method for detection: antimicrobial susceptibility tests for bacteria that growth aerobically. Wayne, Pa. **23**.

Newell, D. G. and C. Fearnley (2003). Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. Appl Environ Microbiol **69**(8): 4343-51.

Newell, D. G., J. E. Shreeve, et al. (2001). "Changes in the carriage of *Campylobacter* strains by poultry carcasses during processing in abattoirs." Appl Environ Microbiol **67**(6): 2636-40.

Ng, L. K., R. Sherburne, et al. (1985). Morphological forms and viability of Campylobacter species studied by electron microscopy. J Bacteriol **164**(1): 338-43.

Obiri-Danso, K., N. Paul, et al. (2001). The effects of UVB and temperature on the survival of natural populations and pure cultures of *Campylobacter jejuni*, *Camp. coli*, *Camp. lari* and urease-positive thermophilic campylobacters (UPTC) in surface waters. J Appl Microbiol **90**(2): 256-67.

O'Halloran, F., B. Lucey, et al. (2004). Molecular characterization of class 1 integrons from Irish thermophilic *Campylobacter spp*. J Antimicrob Chemother **53**(6): 952-7.

On, S. L. W. (2005). Taxonomy, phylogeny and methods for the identificatin of *Campylobacter* species. Campylobacter. J. M. Ketley and M. E. Konkel. Norfolk NR 18 OJA, Horizon Bioscience**:** 13-42.

Park, S. F. (2002). The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. Int J Food Microbiol **74**(3): 177-88.

Park, S. F. (2005). *Campylobacter jejuni* stress responses during survival in the food chain and colonization. in Campylobacter -Molecular and cellular biology, Horizon Bioscience**:** 311-330.

Parkhill, J., B. W. Wren, et al. (2000). The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. Nature **403**(6770): 665-8.

Patterson, M. F. (1995). Sensitivity of *Campylobacter* spp. to irradiation in poultry meat. Lett Appl Microbiol **20**(6): 338-40.

Payot, S., J. M. Bolla, et al. (2006). Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter spp*. Microbes Infect **8**(7): 1967-71.

Payot, S., A. Cloeckaert, et al. (2002). Selection and characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of *Campylobacter jejuni* using enrofloxacin. Microb Drug Resist **8**(4): 335-43.

Pearson, A. D., M. Greenwood, et al. (1993). Colonization of broiler chickens by waterborne *Campylobacter jejuni*. Appl Environ Microbiol **59**(4): 987-96.

Penner, J. L., J. N. Hennessy, et al. (1983). Serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on the basis of thermostable antigens. Eur J Clin Microbiol **2**(4): 378-383.

Phillips, I., M. Casewell, et al. (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. J Antimicrob Chemother **53**(1): 28-52.

Pumbwe, L. and L. J. Piddock (2002). Identification and molecular characterisation of CmeB, a *Campylobacter jejuni* multidrug efflux pump. FEMS Microbiol Lett **206**(2): 185-9.

Ragimbeau, C., G. Salvat, et al. (1998). Development of a multiplex PCR gene fingerprinting method using *gyr*A and *pfl*A polymorphisms to identify genotypic relatedness within *Campylobacter jejuni* species. J Appl Microbiol **85**(5): 829-38.

Rasschaert, G., K. Houf, et al. (2007). External contamination of Campylobacter-free flocks after transport in cleaned and disinfected containers. J Food Prot **70**(1): 40-6.

Rasschaert, G., K. Houf, et al. (2006). *Campylobacter* contamination during poultry slaughter in Belgium. J Food Prot **69**(1): 27-33.

Refregier-Petton, J., N. Rose, et al. (2001). Risk factors for *Campylobacter* spp. contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. Prev Vet Med **50**(1-2): 89-100.

Rivoal, K., M. Denis, et al. (1999). Molecular characterization of the diversity of *Campylobacter* spp. isolates collected from a poultry slaughterhouse: analysis of cross-contamination. Lett Appl Microbiol **29**(6): 370-4.

Rivoal, K., C. Ragimbeau, et al. (2005). Genomic diversity of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolates recovered from free-range broiler farms and comparison with isolates of various origins. Appl Environ Microbiol **71**(10): 6216-27.

Rollins, D. M. and R. R. Colwell (1986). Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. Appl Environ Microbiol **52**(3): 531-8.

Russell, A. D. (1999). Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. J Hosp Infect **43 Suppl**: S57-68.

Russell, A. D. (2000). Do biocides select for antibiotic resistance? J Pharm Pharmacol **52**(2): 227-33.

Russell, A. D. (2002). Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation. J Antimicrob Chemother **49**(4): 597-9.

Russell, A. D. (2003). Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. Lancet Infect Dis **3**(12): 794-803.

Russell, A. D., M. T. Suller, et al. (1999). Do antiseptics and disinfectants select for antibiotic resistance? J Med Microbiol **48**(7): 613-5.

Russell, A. D., U. Tattawasart, et al. (1998). Possible link between bacterial resistance and use of antibiotics and biocides. Antimicrob Agents Chemother **42**(8): 2151.

Sanchez, M. X., W. M. Fluckey, et al. (2002). Microbial profile and antibiotic susceptibility of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. in broilers processed in air-chilled and immersion-chilled environments. J Food Prot **65**(6): 948-56.

Sanders, P. (1999). Traitements thérapeutiques et antibiorésistance. Point Vet. **30**(198): 203-210.

Schlundt, J., H. Toyofuku, et al. (2004). Emerging food-borne zoonoses. Rev Sci Tech **23**(2): 513-33.

Schneitz, C. (2005). Competitive exclusion in poultry-30 years of research. Food Control **16**: 657-667.

Schouls, L. M., S. Reulen, et al. (2003). Comparative genotyping of *Campylobacter jejuni* by amplified fragment length polymorphism, multilocus sequence typing, and short repeat sequencing: strain diversity, host range, and recombination. J Clin Microbiol **41**(1): 15-26.

Schwarz, S. and E. Chaslus-Dancla (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. Vet Res **32**(3-4): 201-25.

Schwarz, S., C. Kehrenberg, et al. (2001). Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. Int J Antimicrob Agents **17**(6): 431-7.

Sebald, M. and M. Veron (1963). Teneur en base de l'ADN et classification des vibrions. Ann. Inst. Pasteur(105): 897-910.

Shreeve, J. E., M. Toszeghy, et al. (2002). The carry-over of *Campylobacter* isolates between sequential poultry flocks. Avian Dis **46**(2): 378-85.

Sidhu, M. S., E. Heir, et al. (2002). Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with beta-lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. Antimicrob Agents Chemother **46**(9): 2797-803.

Sidhu, M. S., H. Sorum, et al. (2002). Resistance to quaternary ammonium compounds in food-related bacteria. Microb Drug Resist **8**(4): 393-9.

Skirrow, M. B. (1977). Campylobacter enteritis: a "new" disease. Br Med J **2**(6078): 9-11.

Skirrow, M. B. (2006). John McFadyean and the centenary of the first isolation of *Campylobacter* species. Clin Infect Dis **43**(9): 1213-7.

Skirrow, M. B. and J. Benjamin (1980). Differentiation of enteropathogenic Campylobacter. J Clin Pathol **33**(11): 1122.

Slader, J., G. Domingue, et al. (2002). Impact of transport crate reuse and of catching and processing on *Campylobacter* and *Salmonella* contamination of broiler chickens. Appl Environ Microbiol **68**(2): 713-9.

Smith, T. and M. Taylor (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**: 299-312.

Snelling, W. J., M. Matsuda, et al. (2005). Under the microscope: *Campylobacter jejuni*. Lett Appl Microbiol **41**(4): 297-302.

Snelling, W. J., J. P. McKenna, et al. (2005). Survival of *Campylobacter jejuni* in waterborne protozoa. Appl Environ Microbiol **71**(9): 5560-71.

Snelling, W. J., J. E. Moore, et al. (2006). Bacterial-protozoa interactions; an update on the role these phenomena play towards human illness. Microbes Infect **8**(2): 578-87.

Soumet, C., C. Ragimbeau, et al. (2005). Screening of benzalkonium chloride resistance in *Listeria monocytogenes* strains isolated during cold smoked fish production. Lett Appl Microbiol **41**(3): 291-296.

Steele, M., B. McNab, et al. (1998). Epidemiological typing of Campylobacter isolates from meat processing plants by pulsed-field gel electrophoresis, fatty acid profile typing, serotyping, and biotyping. Appl Environ Microbiol **64**(7): 2346-9.

Stegenga, T. and J. Terpstra (1949). Over *Vibrio fetus* infecties bij het rund en enzootishe steriliteit. Tijdschr Diergeneesk **74**: 293-296.

Stern, N. J. and M. C. Robach (2003). Enumeration of *Campylobacter* spp. in broiler feces and in corresponding processed carcasses. J Food Prot **66**(9): 1557-63.

Sudheim, G., S. Langsrud, et al. (1998). Bacterial resistance to disinfectants containing quaternary ammonium compounds. Int Biodeter & Biodegrad **41**: 235-239.

Sundsfjord, A., G. S. Simonsen, et al. (2004). Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. Apmis **112**(11-12): 815-37.

Swartz, M. N. (2002). Human diseases caused by foodborne pathogens of animal origin. Clin Infect Dis **34 Suppl 3**: S111-22.

Tagu, D. (1999). Principes des techniques de biologie moléculaire. Paris, INRA.

Takahashi, R., F. Shahada, et al. (2006). Analysis of *Campylobacter* spp. contamination in broilers from the farm to the final meat cuts by using restriction fragment length polymorphism of the polymerase chain reaction products. Int J Food Microbiol **110**(3): 240-5.

Tattawasart, U., J. Y. Maillard, et al. (1999). Development of resistance to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride in *Pseudomonas stutzeri* and changes in antibiotic susceptibility. J Hosp Infect **42**(3): 219-29.

Taylor, D. E. and P. Courvalin (1988). Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter* species. Antimicrob Agents Chemother **32**(8): 1107-12.

Taylor, D. E., R. S. Garner, et al. (1983). Characterization of tetracycline resistance plasmids from *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Antimicrob Agents Chemother **24**(6): 930-5.

Taylor, D. E. and D. M. Tracz (2005). Mecanisms of antimicrobial resistance in *Campylobacter*. in Campylobacter -Molecular and cellular biology, Horizon Bioscience**:** 193-204.

Ternhag, A., T. Asikainen, et al. (2007). A meta-analysis on the effects of antibiotic treatment on duration of symptoms caused by infection with Campylobacter species. Clin Infect Dis **44**(5): 696-700.

Thomas, C., D. J. Hill, et al. (1999). Evaluation of the effect of temperature and nutrients on the survival of *Campylobacter* spp. in water microcosms. J Appl Microbiol **86**(6): 1024-32.

Toma, B., B. Dufour, et al. (2001). Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures.

Trachoo, N. and J. F. Frank (2002). Effectiveness of chemical sanitizers against *Campylobacter jejuni*-containing biofilms. J Food Prot **65**(7): 1117-21.

Trachoo, N., J. F. Frank, et al. (2002). Survival of *Campylobacter jejuni* in biofilms isolated from chicken houses. J Food Prot **65**(7): 1110-6.

Uyttendaele, M., P. De Troy, et al. (1999). Incidence of *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli,* and *Listeria monocytogenes* in poultry carcasses and different types of poultry products for sale on the Belgian retail market. J Food Prot **62**(7): 735-40.

van den Bogaard, A. E. and E. E. Stobberingh (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. Int J Antimicrob Agents **14**(4): 327-35.

van Klingeren, B., S. F. Bloomfield, et al. (1998). Assessment of the efficacy of disinfectants on surfaces. Int Biodeter & Biodegrad **41**: 289-296.

Vinzent, R., J. Dumas, et al. (1947). Septicémie grave au cours de la grossesse due à un Vibrion. Avortement consécutif. Bull Acad Nat Med Paris **131**: 90-92.

Wagenaar, J. A., D. J. Mevius, et al. (2006). Campylobacter in primary animal production and control strategies to reduce the burden of human campylobacteriosis. Rev Sci Tech **25**(2): 581-94.

Wang, W. L., B. W. Powers, et al. (1983). Effects of disinfectants on *Campylobacter jejuni*. Appl Environ Microbiol **45**(4): 1202-5.

Wassenaar, T. M., B. Geilhausen, et al. (1998). Evidence of genomic instability in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry. Appl Environ Microbiol **64**(5): 1816-21.

Wassenaar, T. M. and D. G. Newell (2000). Genotyping of *Campylobacter* spp. Appl Environ Microbiol **66**(1): 1-9.

Wauters, G., T. De Baere, et al. (2003). Description of *Comamonas aquatica* comb. nov. and *Comamonas kerstersii* sp. nov. for two subgroups of *Comamonas terrigena* and emended description of *Comamonas terrigena*. Int J Syst Evol Microbiol **53**(Pt 3): 859-62.

Weber, P., P. Laudrat, et al. (2003). Bactéries entéropathogènes isolées des coproculture en médecine de ville: enquête EPICOP 1999-2000. Bull Epidemiol Hebd(8): 45-46.

Wheat, P. F. (2001). History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. J Antimicrob Chemother **48 Suppl 1**: 1-4.

Wieland, B., M. Sandberg, et al. (2006). Genetic variability of *Campylobacter jejuni* isolated from fresh and frozen broiler carcasses. J Appl Microbiol **101**: 1027-1032.

Zhang, Q., O. Sahin, et al. (2006). Fitness of antimicrobial-resistant campylobacter and salmonella. Microbes Infect **8**(7): 1972-8.

Zhao, T. and M. P. Doyle (2006). Reduction of *Campylobacter jejuni* on chicken wings by chemical treatments. J Food Prot **69**(4): 762-7.

Zimmer, M., H. Barnhart, et al. (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**(1): 101-7.

# ANNEXES

# ANNEXE 1 :QUESTIONNAIRE DESINFECTANT

**Type de volaille abattue** poulet de chair label ☐
poulet de chair standard ☐
dinde ☐

**Tonnage de l'abattoir** :

**Personnel** : nettoyage et désinfection des mains
produit utilisé :
concentration :
temps de contact :
rinçage : oui ☐ non ☐

- **Caisses de transport des animaux :**

Nettoyage oui ☐ non ☐
réalisé par le personnel de l'abattoir ☐
une équipe indépendante (entreprise spécialisée) ☐
produit utilisé :
concentration :
temps de contact : rinçage : oui ☐ non ☐

Désinfection oui ☐ non ☐
réalisée par le personnel de l'abattoir ☐
une équipe indépendante (entreprise spécialisée) ☐
produit utilisé :
concentration :
temps de contact :
rinçage : oui ☐ non ☐

**Locaux :**

Pour chacun des postes suivants, indiquez si vous réalisez (mettre une croix) :

| | Prénettoyage | Nettoyage | Désinfection |
|---|---|---|---|
| Accrochage | ☐ | ☐ | ☐ |
| Saignée | ☐ | ☐ | ☐ |
| Bac d'échaudage | ☐ | ☐ | ☐ |
| Plumeuse | ☐ | ☐ | ☐ |
| Eviscération | ☐ | ☐ | ☐ |
| Chaîne de découpe | ☐ | ☐ | ☐ |

Prénettoyage réalisé par le personnel de l'abattoir ☐
une équipe indépendante (entreprise spécialisée) ☐
méthode utilisée : jet d'eau ☐
pompe haute pression ☐
raclage ☐
autre (préciser) :

Nettoyage réalisé par le personnel de l'abattoir ☐
une équipe indépendante (entreprise spécialisée) ☐
produit utilisé :
mode d'application avec un appareil à mousse ☐
par pulvérisation ☐
autre (préciser) :
concentration :
temps de contact :
rinçage : oui ☐ non ☐

Désinfection réalisée par le personnel de l'abattoir ☐
une équipe indépendante (entreprise spécialisée) ☐
produit utilisé :
application avec un appareil à mousse ☐
par pulvérisation ☐
autre (préciser) :
concentration :
temps de contact :
rinçage : oui ☐ non ☐

Désinfection de l'air ambiant (ventilateur…) oui ☐ non ☐
produit utilisé :
concentration :

- **Matériel**

  - **Petit matériel (couteaux, fusils, gants)**

Nettoyage
produit utilisé : ……..
concentration : ……..
temps de contact : ……..
rinçage : oui ☐ non ☐
fréquence du nettoyage : 1 fois par jour ☐
entre chaque lot ☐
autre (préciser) : ……..

Désinfection
produit utilisé : ……..
concentration : ……..
temps de contact : ……..
rinçage : oui ☐ non ☐
fréquence de la désinfection: 1 fois par jour ☐
entre chaque lot ☐
autre (préciser) :

  - **Chariots, bacs, cagettes :**

Nettoyage
produit utilisé :
concentration :
temps de contact :
rinçage : oui ☐ non ☐
fréquence du nettoyage : 1 fois par jour ☐
entre chaque lot ☐
autre (préciser) :

Désinfection
produit utilisé :
concentration :
temps de contact :
rinçage : oui ☐ non ☐
fréquence de la désinfection: 1 fois par jour ☐
entre chaque lot ☐
autre (préciser) :

## ANNEXE 2. COMPOSISTION DU NEUTRALISANT POLYVALENT DE DESINFECTION DES CHIFFONNETTES ET DESINFECTANTS NEUTRALISES

| Composition | Quantité en gramme par litre de neutralisant préparé | Désinfectants neutralisés |
|---|---|---|
| Lécithine de soja | 3 | Ammonium quaternaire, éthanol, phénols |
| Tween 80 | 30 | Ammonium quaternaires, éthanol, aldéhydes, phénols |
| L-histidine | 1 | Aldéhydes, phénols |
| Thiosulfate de sodium | 7.8 | Halogènes, phénols |
| Phosphate disodique | 100.8 | Rôle de tampon |
| Eau distillée qsp | 857.4 | |

# ANNEXE 3 : COMPOSITION DES DIFFERENTS MILIEUX DE CULTURE UTILISES PENDANT L'ETUDE

**Composition de la gélose de Mueller-Hinton (Difco, Becton Dickinson, le Pont de Claix, France)**

Agar de Mueller Hinton (Difco, Becton Dickinson, le Pont de Claix, France)

| Composition | Quantité (en gramme par litre) |
|---|---|
| Infusat de 300 g de viande de boeuf | 2.0 |
| Hydrolysat acide de caséine | 17.5 |
| Amidon | 1.5 |
| Agar | 17.0 |

**Composition du bouillon Brucella (Difco)**

| Composition | Quantité (en gramme par litre) |
|---|---|
| Digestion pancréatique de caséine | 10.0 |
| Digestion peptique de tissu animal | 10.0 |
| Dextrose | 1.0 |
| Extrait de levure | 2.0 |
| Chlorure de sodium | 5.0 |
| Bisulfite de sodium | 0.1 |

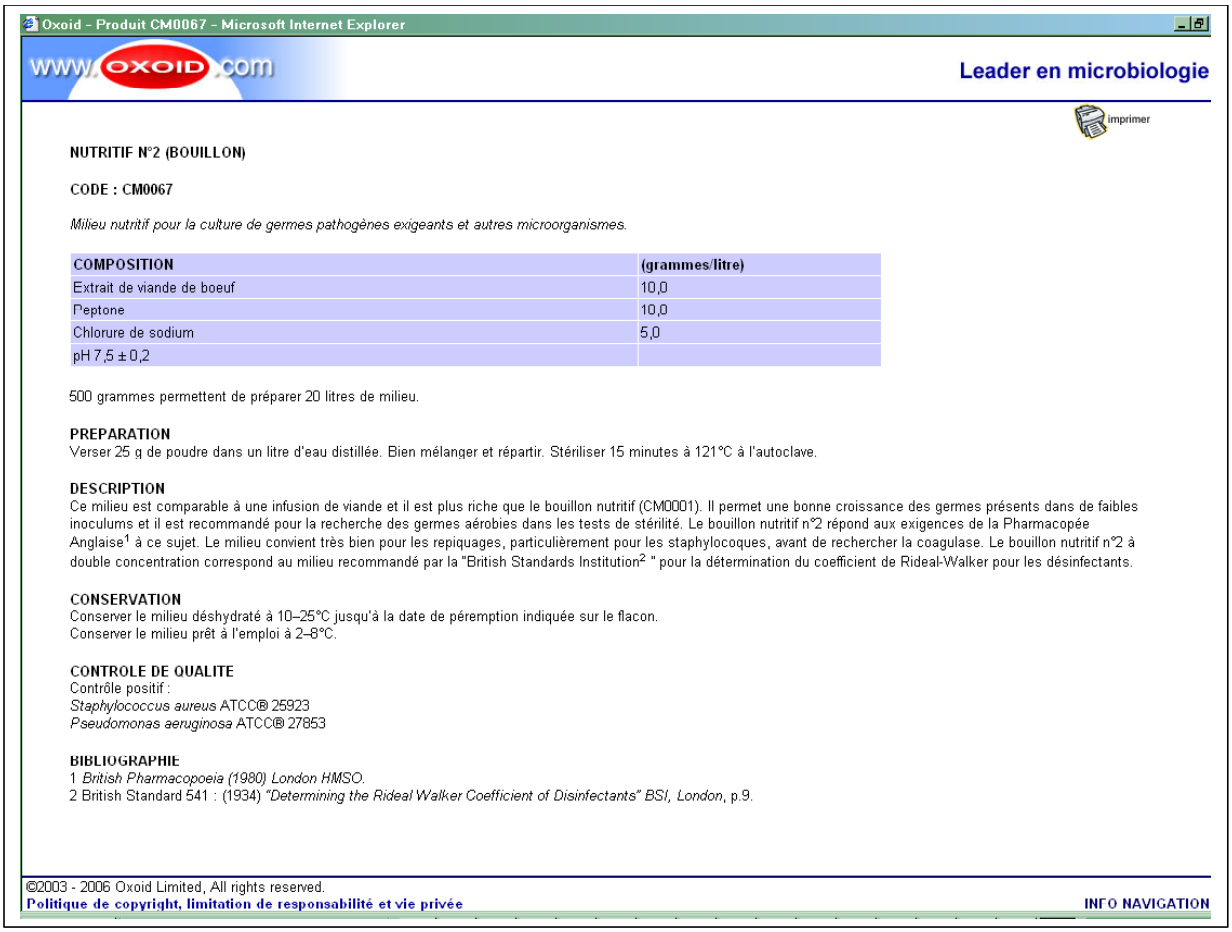
pH définitif : 7.0±0.2

**Composition du milieu de Preston (Oxoid)**

Le bouillon de Preston est composé d'un milieu nutritif n°2 (bouillon)et d'un supplément sélectif pour campylobacter (Preston)

- Bouillon nutritif n°2

http://www.oxoid.com/fr/index.asp?mpage=iproductdetail&pre=CM0067&l=FR&x=#



Oxoid - Produit CM0067 - Microsoft Internet Explorer

www.oxoid.com — Leader en microbiologie

imprimer

**NUTRITIF N°2 (BOUILLON)**

**CODE : CM0067**

*Milieu nutritif pour la culture de germes pathogènes exigeants et autres microorganismes.*

| COMPOSITION | (grammes/litre) |
|---|---|
| Extrait de viande de boeuf | 10,0 |
| Peptone | 10,0 |
| Chlorure de sodium | 5,0 |
| pH 7,5 ± 0,2 | |

500 grammes permettent de préparer 20 litres de milieu.

**PREPARATION**
Verser 25 g de poudre dans un litre d'eau distillée. Bien mélanger et répartir. Stériliser 15 minutes à 121°C à l'autoclave.

**DESCRIPTION**
Ce milieu est comparable à une infusion de viande et il est plus riche que le bouillon nutritif (CM0001). Il permet une bonne croissance des germes présents dans de faibles inoculums et il est recommandé pour la recherche des germes aérobies dans les tests de stérilité. Le bouillon nutritif n°2 répond aux exigences de la Pharmacopée Anglaise[1] à ce sujet. Le milieu convient très bien pour les repiquages, particulièrement pour les staphylocoques, avant de rechercher la coagulase. Le bouillon nutritif n°2 à double concentration correspond au milieu recommandé par la "British Standards Institution[2] " pour la détermination du coefficient de Rideal-Walker pour les désinfectants.

**CONSERVATION**
Conserver le milieu déshydraté à 10–25°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon.
Conserver le milieu prêt à l'emploi à 2–8°C.

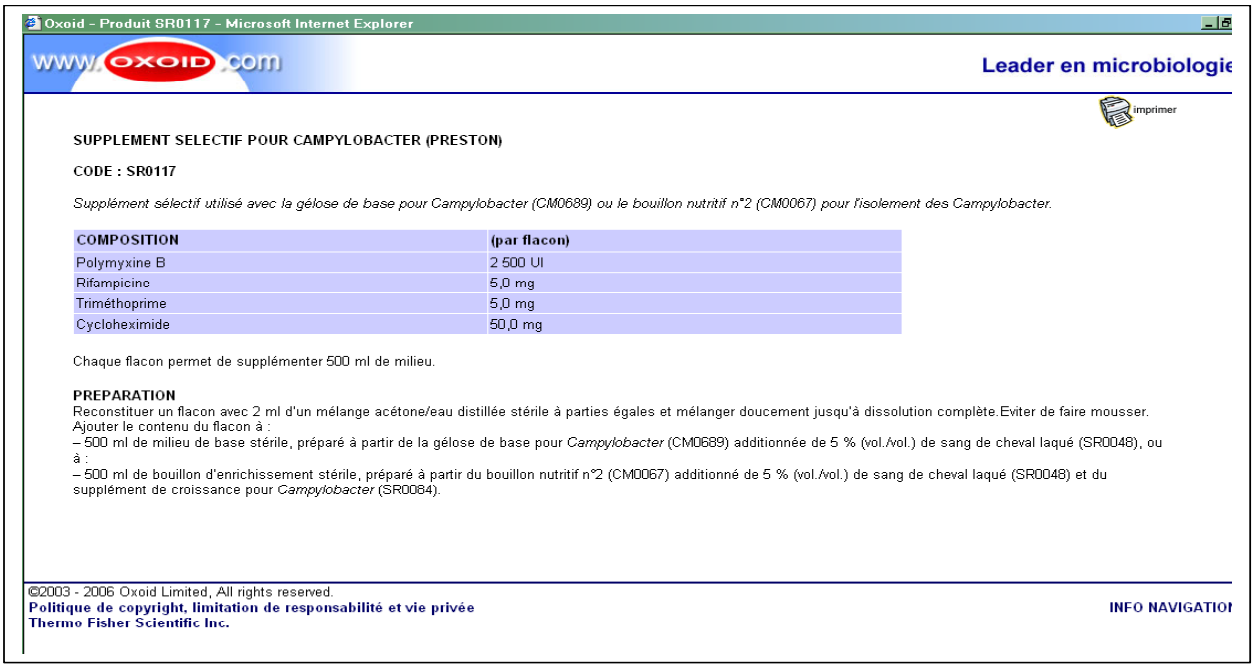
**CONTROLE DE QUALITE**
Contrôle positif :
*Staphylococcus aureus* ATCC® 25923
*Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853

**BIBLIOGRAPHIE**
1 *British Pharmacopoeia (1980) London HMSO.*
2 British Standard 541 : (1934) *"Determining the Rideal Walker Coefficient of Disinfectants" BSI, London*, p.9.

©2003 - 2006 Oxoid Limited, All rights reserved.
Politique de copyright, limitation de responsabilité et vie privée
INFO NAVIGATION

- Supplément sélectif pour campylobacter

http://www.oxoid.com/fr/index.asp?mpage=iproductdetail&pre=SR0117&l=FR&x=#



Oxoid - Produit SR0117 - Microsoft Internet Explorer

www.oxoid.com — Leader en microbiologie

imprimer

**SUPPLEMENT SELECTIF POUR CAMPYLOBACTER (PRESTON)**

**CODE : SR0117**

*Supplément sélectif utilisé avec la gélose de base pour Campylobacter (CM0689) ou le bouillon nutritif n°2 (CM0067) pour l'isolement des Campylobacter.*

| COMPOSITION | (par flacon) |
|---|---|
| Polymyxine B | 2 500 UI |
| Rifampicine | 5,0 mg |
| Triméthoprime | 5,0 mg |
| Cycloheximide | 50,0 mg |

Chaque flacon permet de supplémenter 500 ml de milieu.

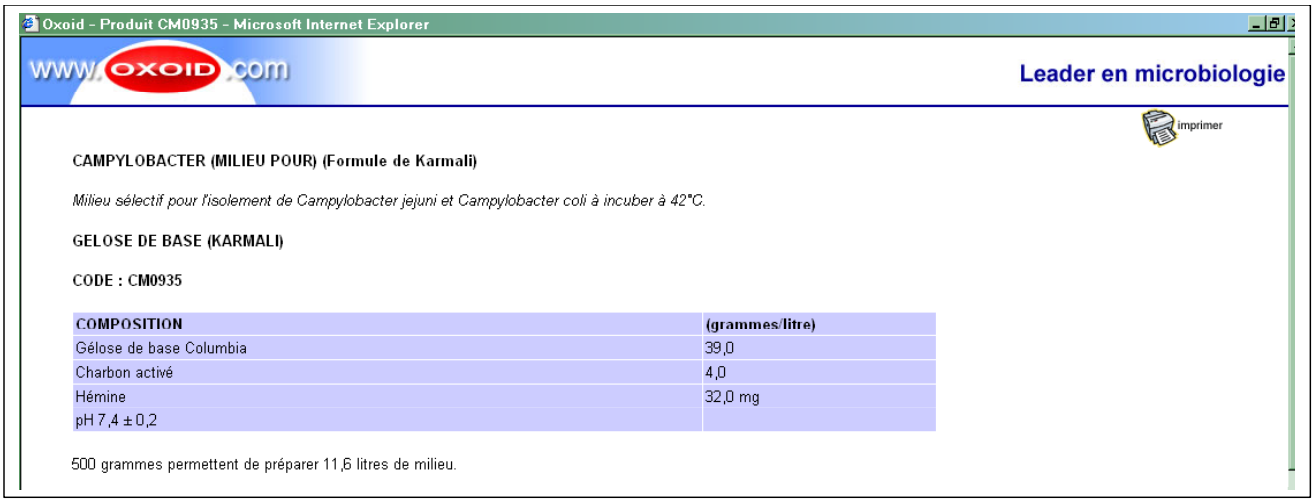
**PREPARATION**
Reconstituer un flacon avec 2 ml d'un mélange acétone/eau distillée stérile à parties égales et mélanger doucement jusqu'à dissolution complète.Eviter de faire mousser.
Ajouter le contenu du flacon à :
– 500 ml de milieu de base stérile, préparé à partir de la gélose de base pour *Campylobacter* (CM0689) additionnée de 5 % (vol./vol.) de sang de cheval laqué (SR0048), ou à :
– 500 ml de bouillon d'enrichissement stérile, préparé à partir du bouillon nutritif n°2 (CM0067) additionné de 5 % (vol./vol.) de sang de cheval laqué (SR0048) et du supplément de croissance pour *Campylobacter* (SR0084).

©2003 - 2006 Oxoid Limited, All rights reserved.
Politique de copyright, limitation de responsabilité et vie privée
Thermo Fisher Scientific Inc.
INFO NAVIGATION

**Composition du milieu de Karmali (Oxoid)**

http://www.oxoid.com/fr/index.asp?mpage=iproductdetail&pre=CM0935&l=FR&x=#

- Préparation de la gélose



Oxoid - Produit CM0935 - Microsoft Internet Explorer

www.oxoid.com Leader en microbiologie

imprimer

**CAMPYLOBACTER (MILIEU POUR) (Formule de Karmali)**

*Milieu sélectif pour l'isolement de Campylobacter jejuni et Campylobacter coli à incuber à 42°C.*

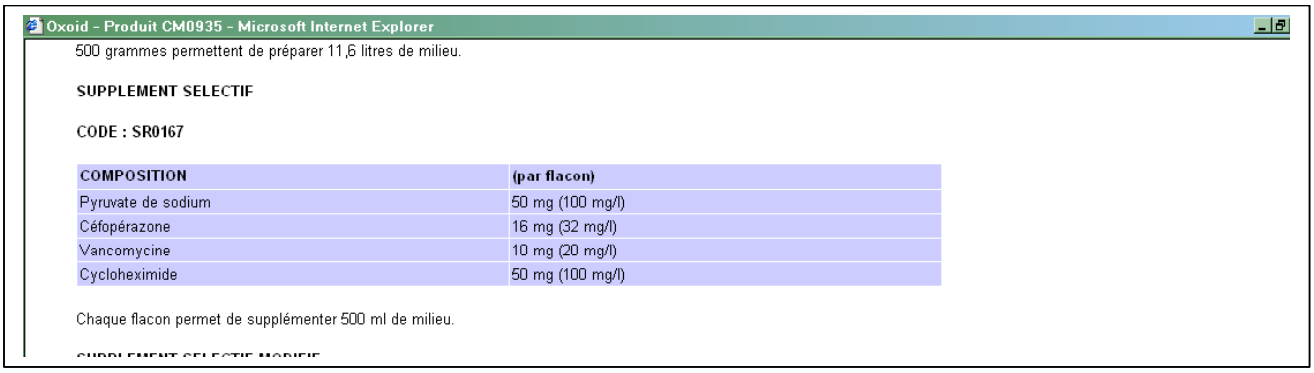
**GELOSE DE BASE (KARMALI)**

**CODE : CM0935**

| COMPOSITION | (grammes/litre) |
|---|---|
| Gélose de base Columbia | 39,0 |
| Charbon activé | 4,0 |
| Hémine | 32,0 mg |
| pH 7,4 ± 0,2 | |

500 grammes permettent de préparer 11,6 litres de milieu.

- Ajout du supplément sélectif



Oxoid - Produit CM0935 - Microsoft Internet Explorer

500 grammes permettent de préparer 11,6 litres de milieu.

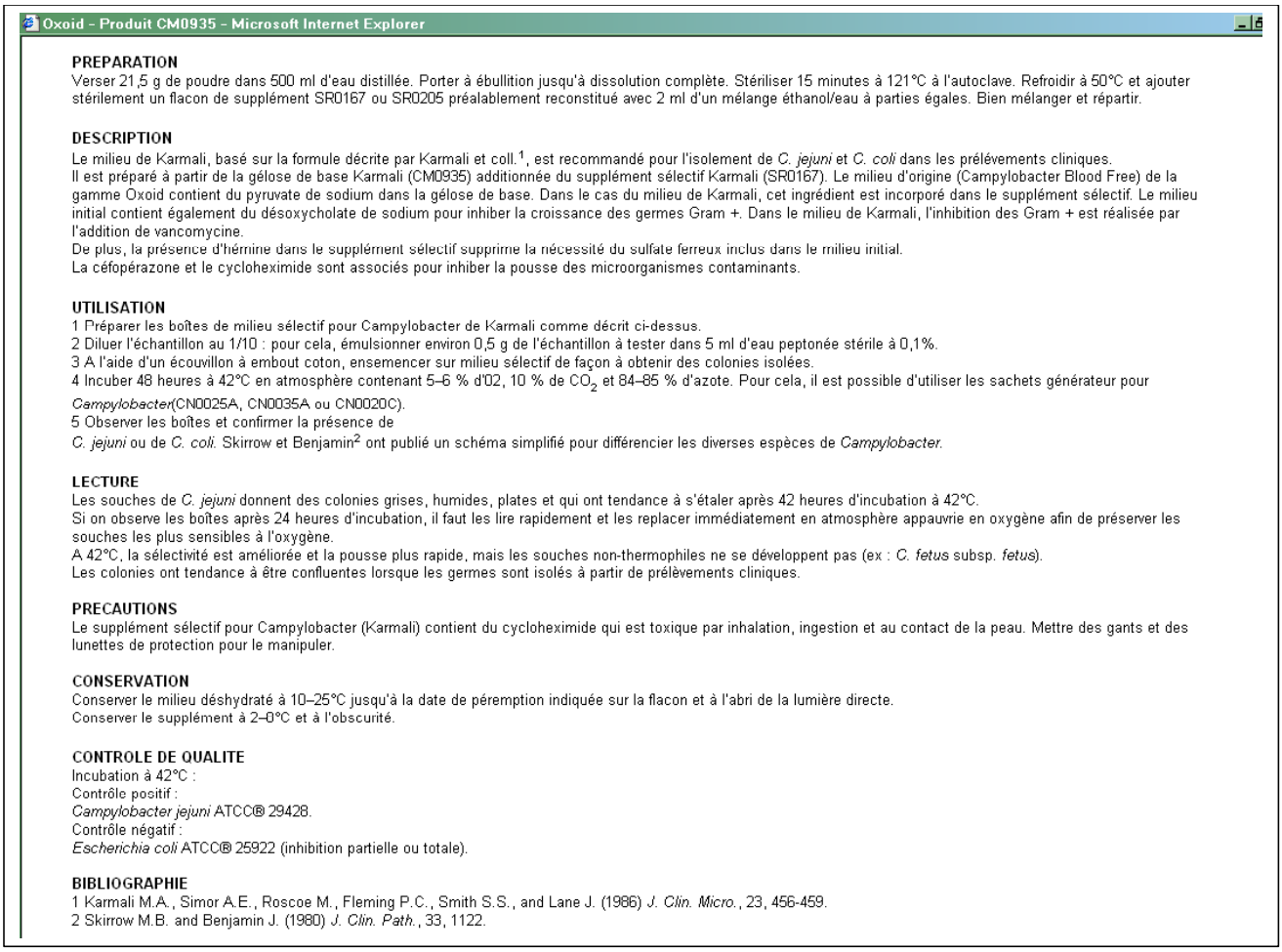
**SUPPLEMENT SELECTIF**

**CODE : SR0167**

| COMPOSITION | (par flacon) |
|---|---|
| Pyruvate de sodium | 50 mg (100 mg/l) |
| Céfopérazone | 16 mg (32 mg/l) |
| Vancomycine | 10 mg (20 mg/l) |
| Cycloheximide | 50 mg (100 mg/l) |

Chaque flacon permet de supplémenter 500 ml de milieu.

- Préparation du milieu de Karmali



Oxoid - Produit CM0935 - Microsoft Internet Explorer

**PREPARATION**
Verser 21,5 g de poudre dans 500 ml d'eau distillée. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser 15 minutes à 121°C à l'autoclave. Refroidir à 50°C et ajouter stérilement un flacon de supplément SR0167 ou SR0205 préalablement reconstitué avec 2 ml d'un mélange éthanol/eau à parties égales. Bien mélanger et répartir.

**DESCRIPTION**
Le milieu de Karmali, basé sur la formule décrite par Karmali et coll.[1], est recommandé pour l'isolement de *C. jejuni* et *C. coli* dans les prélèvements cliniques.
Il est préparé à partir de la gélose de base Karmali (CM0935) additionnée du supplément sélectif Karmali (SR0167). Le milieu d'origine (Campylobacter Blood Free) de la gamme Oxoid contient du pyruvate de sodium dans la gélose de base. Dans le cas du milieu de Karmali, cet ingrédient est incorporé dans le supplément sélectif. Le milieu initial contient également du désoxycholate de sodium pour inhiber la croissance des germes Gram +. Dans le milieu de Karmali, l'inhibition des Gram + est réalisée par l'addition de vancomycine.
De plus, la présence d'hémine dans le supplément sélectif supprime la nécessité du sulfate ferreux inclus dans le milieu initial.
La céfopérazone et le cycloheximide sont associés pour inhiber la pousse des microorganismes contaminants.

**UTILISATION**
1 Préparer les boîtes de milieu sélectif pour Campylobacter de Karmali comme décrit ci-dessus.
2 Diluer l'échantillon au 1/10 : pour cela, émulsionner environ 0,5 g de l'échantillon à tester dans 5 ml d'eau peptonée stérile à 0,1%.
3 A l'aide d'un écouvillon à embout coton, ensemencer sur milieu sélectif de façon à obtenir des colonies isolées.
4 Incuber 48 heures à 42°C en atmosphère contenant 5–6 % d'02, 10 % de $CO_2$ et 84–85 % d'azote. Pour cela, il est possible d'utiliser les sachets générateur pour *Campylobacter*(CN0025A, CN0035A ou CN0020C).
5 Observer les boîtes et confirmer la présence de *C. jejuni* ou de *C. coli*. Skirrow et Benjamin[2] ont publié un schéma simplifié pour différencier les diverses espèces de *Campylobacter*.

**LECTURE**
Les souches de *C. jejuni* donnent des colonies grises, humides, plates et qui ont tendance à s'étaler après 42 heures d'incubation à 42°C.
Si on observe les boîtes après 24 heures d'incubation, il faut les lire rapidement et les replacer immédiatement en atmosphère appauvrie en oxygène afin de préserver les souches les plus sensibles à l'oxygène.
A 42°C, la sélectivité est améliorée et la pousse plus rapide, mais les souches non-thermophiles ne se développent pas (ex : *C. fetus* subsp. *fetus*).
Les colonies ont tendance à être confluentes lorsque les germes sont isolés à partir de prélèvements cliniques.

**PRECAUTIONS**
Le supplément sélectif pour Campylobacter (Karmali) contient du cycloheximide qui est toxique par inhalation, ingestion et au contact de la peau. Mettre des gants et des lunettes de protection pour le manipuler.

**CONSERVATION**
Conserver le milieu déshydraté à 10–25°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur la flacon et à l'abri de la lumière directe.
Conserver le supplément à 2–0°C et à l'obscurité.

**CONTROLE DE QUALITE**
Incubation à 42°C :
Contrôle positif :
*Campylobacter jejuni* ATCC® 29428.
Contrôle négatif :
*Escherichia coli* ATCC® 25922 (inhibition partielle ou totale).

**BIBLIOGRAPHIE**
1 Karmali M.A., Simor A.E., Roscoe M., Fleming P.C., Smith S.S., and Lane J. (1986) *J. Clin. Micro.*, 23, 456-459.
2 Skirrow M.B. and Benjamin J. (1980) *J. Clin. Path.*, 33, 1122.

**Composition du milieu de Virion (AFSSA_Ploufragan)**

- Base : Agar de Mueller-Hinton
- Sang de mouton (AES laboratoire, Combourg, France) : 50 ml/l de milieu
- Antibiotiques et autres inhibiteurs :

| Composition | Quantité (par litre de milieu) | Préparation de la solution |
|---|---|---|
| Céfopérazone | 15 ml | 15 mg/l dans de l'eau distillée stérile ou ultra-pure stérile |
| Rifampicine | 10 mg | 10 mg/ml dans du méthanol |
| Colistine | 10 000 UI | 10 000 UI/ml dans de l'eau ditillée ou ultra-pure stérile |
| Amphotéricine B | 2 mg | 2 mg/ml dans du méthanol |

- Préparation

Mélanger les différentes solutions d'antibiotiques en quantités égales et stériliser par filtration sur membrane de 0.22 µm. Ajouter 4 ml du mélange antibiotique pour 1 litre de milieu.

- Stockage et conservation : 3 jours à +3°C ± 2°C

**Bouillon glycérolé peptoné**

- Composition

| Composition | Quantité pour 75 ml de bouillon |
|---|---|
| Peptone (Oxoid réf. L37) | 1 g |
| NaCl | 0.5 g |
| Glycerol (Labosi ) | 31.5 g |
| Eau distillée ou ultra-pure | 75 ml |

- Stockage et conservation : 3 mois à +3°C ± 2°C

# ANNEXE 4 : COMPOSITION DU NEUTRALISANT DESINFECTANT

| AFSSA-FOUGERES<br>LERMVD | MODE OPERATOIRE | N° : 2N |
|---|---|---|
| Unité PHAM | **NEUTRALISANT POLYVALENT 2x AFNOR / CEN** | Version : 2<br>Etiquette : N.P.2x<br>Page 1 sur 1 |
| Date d'application : 07/10/2002 | | |

**1 – PREPARATION PREALABLE** Non

**2 – PRODUITS DE BASE**

Lécithine *(Prolabo 24966180 - en chambre froide)*
Thiosulfate de sodium $Na_2S_2O_3\,5H_2O$ 248,18 g / mol *(Merck 6516 - SM ITCMD)*
Histidine $C_6H_9N_3O_2$ *(Prolabo 24581134 – SM ITCMD)*
Tween 80 1l = 1,08 kg *(Prolabo 28830291 – Merck 8.22187 – SM ITCMD)*
Phosphate disodique $Na_2HPO_4$ 141,95 g / mol *(Prolabo 28.026.292 – SM ITCMD)*
Eau distillée

**3 – MODE OPERATOIRE**

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Lécithine | **0,6 g** | **3 g** | **6 g** | **12 g** | **18 g** |
| Thiosulfate de sodium | **1 g** | **5 g** | **10 g** | **20 g** | **30 g** |
| Histidine | **0,2 g** | **1 g** | **2 g** | **4 g** | **6 g** |
| Tween 80 | **1,5 g** | **7,5 g** | **15 g** | **30 g** | **45 g** |
| Phosphate disodique | **6,8 g** | **34 g** | **68 g** | **136 g** | **204 g** |
| Eau distillée | **100 ml** | **500 ml** | **1000 ml** | **2000 ml** | **3000 ml** |

ajuster à PH 7

**Stérilisation :** Autoclave 115°C pendant 20 minutes.

***Ne pas mettre en chambre froide, placer les flacons à l'abri de la lumière.***

**Remarque :**

Au moment de l'emploi, il pourra être dilué en eau distillée stérile afin d'obtenir la concentration 1 X.

**4 – TEMOINS DE CONTAMINATION**

**5 – CONDITIONNEMENT, CODIFICATION ET STOCKAGE DU PRODUIT FINI**

Obscurité salle LM7

**6 – PRECAUTIONS DE SECURITE EN CAS D'URGENCE**

**7 – PEREMPTION ET ELIMINATION DES PRODUITS**

Validité de 2 ans.
cf. procédure d'élimination des produits

**8 – ANNEXES** néant