



Etude financée par :



Des outils pour détecter *Campylobacter* en élevage

Comparaison méthode de référence et qPCR sur pédichiffonnettes

A. CHASTAGNER¹ & N. ROUSSET¹

Contact : chastagner@itavi.asso.fr

¹ ITAVI – PLOUFRAGAN

Résumé

La maîtrise des contaminations de la viande de volaille par *Campylobacter* est un enjeu majeur pour la filière avicole. Pour mieux surveiller l'évolution de l'excrétion et tester des leviers d'actions en élevage, la filière a besoin d'une méthode de détection / quantification simple et facile à mettre en œuvre. En effet, la méthode de référence pour la détection des campylobacters, basée sur la culture bactérienne, est longue, coûteuse et nécessite des échantillons frais, ce qui la rend difficile à utiliser sur le terrain dans un programme de surveillance continu. L'objectif de cette étude était de comparer la méthode de référence à une méthode de détection par PCR quantitative à partir d'un échantillonnage effectué avec des pédichiffonnettes comme cela est fait pour la détection des salmonelles. Les résultats indiquent que l'utilisation des qPCR sur pédichiffonnettes en élevage avicole, pour détecter et quantifier rapidement *Campylobacter* spp. à l'échelle de la bande est possible même si les méthodologies entre laboratoires d'analyse méritent d'être homogénéisées. En outre, un travail complémentaire sera nécessaire afin de mesurer leur capacité prédictive des contaminations à l'abattoir.

1. Contexte

Les campylobacters sont des bactéries qui sont présentes dans le tube digestif de nombreux vertébrés dont les volailles. La maîtrise de *Campylobacter* en filière avicole est un enjeu de santé publique, car cette bactérie est la première cause de toxi-infection alimentaire humaine d'origine bactérienne en Europe. En 2018, l'UE a fixé un seuil maximal de contamination des carcasses à l'abattoir à 1000 UFC/g sur la peau du cou. Le nombre d'échantillon toléré au-dessus de ce seuil pour obtenir un résultat satisfaisant sera abaissé par palier jusqu'en 2025 pour assurer une amélioration de la qualité sanitaire de la viande. Les procédures de préparation des volailles (éviscération, nettoyage et désinfection...) ont nettement été améliorées, cependant le risque de contamination subsiste lorsque le portage des volailles est trop élevé. Côté élevage, en complément des pratiques de biosécurité, la mise à jeun des volailles avant l'expédition vers l'abattoir est pratiquée pour limiter la contamination, cependant l'effet de cette pratique sur la réduction de *Campylobacter* reste controversé (EFSA, 2011). De récentes études ont montré que diminuer de 3 log le portage en *Campylobacter* des volailles partant à

l'abattage diminuerait de 58 % le risque de toxi-infections alimentaires collectives (EFSA BIOHAZ Panel *et al*, 2020).

Pour mieux surveiller l'évolution de l'excrétion au sein de chaque bande, et tester des leviers d'actions en élevage, la filière a besoin d'une méthode simple et facile à mettre en œuvre. A ce jour, la détection et le dénombrement de *Campylobacter* spp. sont réalisés par culture bactérienne selon la norme NF ISO 10272-1 et 2. Cette méthode nécessite un temps d'analyse relativement long (>5 jours) et une maîtrise des conditions de collecte parfois difficile à assurer (fientes caecales fraîches, stockage 0°C-15°C et envoi sous 24h). Des méthodes alternatives basées sur la biologie moléculaire sont développées et utilisées en recherche depuis les années 90' (Giesendorf & Quint, 1995 ; Hass *et al*, 2017 ; Papić *et al*, 2017). A présent, la recherche de *Campylobacter* par qPCR en temps réel commence à être proposée en France par les laboratoires d'analyses vétérinaire. L'adoption de cette méthode en médecine humaine a notamment permis de faciliter le dépistage de *Campylobacter* dans les prélèvements de selles (Chereau *et al*, 2020).

L'objectif de l'étude était de comparer la méthode de référence à une méthode de biologie moléculaire puis de l'appliquer aux prélèvements par pédichiffonnettes comme ceux réalisés pour les détections de *Salmonelles* en élevage.

2. Matériel et méthode

2.1. Echantillonnage

Trente lots de poulets de chair ROSS 308, âgés de 32 à 43 jours, sexés mâles pour la majorité (29/30), répartis dans 15 élevages, ont été échantillonnés. Dans chaque lot, 10 fientes caecales fraîches ont été collectées à vue sur la litière et poolées dans un pot stérile. En simultané, deux paires de pédichiffonnettes ont été réalisées sur la longueur du bâtiment. Les échantillons ont été acheminés jusqu'au laboratoire d'analyse (laboratoire #1) en moins de 4 h en conservant une température de 4°C.

2.2. Quantification des *Campylobacter* spp.

Les pools de fientes caecales fraîches ont été dilués à 1/10 dans de l'eau peptonée, puis aliquotés en 3 tubes (un pour chaque laboratoire d'analyses). Le premier tube a été immédiatement analysé par le laboratoire #1, en effectuant un dénombrement bactérien en suivant la méthode de référence ISO 10272-2. La limite basse de détection était fixée à 10 UCF/g. La limite haute de dénombrement a été relevée par deux fois au cours de l'analyse, pour s'ajuster aux fortes concentrations de *Campylobacter* spp. présentes dans les caeca, passant de 6,2 log (4 premiers échantillons) puis 7,2 log (échantillons 5 & 6) à 8,2 log (échantillons 7 à 30). Les tubes en direction des deux autres laboratoires effectuant l'analyse de *Campylobacter* spp par PCR quantitative ont été congelés avant l'analyse. L'extraction d'ADN totaux et la PCR quantitative en temps-réel ciblant les *Campylobacter* spp. ont été réalisés par chaque laboratoire (#2 et #3) selon leurs propres protocoles.

Les pédichiffonnettes ont été congelées en attendant l'analyse par les laboratoires #2 et #3. La remise en suspension des bactéries, et l'extraction d'ADN a été réalisée selon les protocoles internes à chacun des laboratoires (pas d'accès aux détails de la méthode). La quantité de *Campylobacter* spp. a été estimée en utilisant la même qPCR que pour les aliquots de fientes fraîches.

2.3. Pratique d'élevage

Un questionnaire concernant la bande échantillonnée et son management a été rempli avec l'éleveur afin de contrôler que certaines pratiques d'élevage n'impactaient pas la méthode, tel que la différence de matière composant la litière, l'éventuelle utilisation de traitement médicamenteux...

2.4. Statistiques

Les moyennes, écart-types et coefficients de corrélation entre les méthodes qPCR et la méthode de référence ont été calculés à l'aide du logiciel Excel® (Microsoft). Les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel R (www.r-project.org). Tous les échantillons pour lesquels *Campylobacter* spp n'a pas été détecté (bactérie absente dans l'échantillon ou présente à une concentration inférieure aux limites de détection des méthodes utilisées), la valeur retenue pour les analyses et les représentations graphiques est 0.

3. Résultats et discussion

3.1. Dénombrement par la méthode de référence

Le dénombrement de *Campylobacter* spp. effectué sur les 30 pools de fientes fraîches par la méthode ISO 10272-2 a révélé que 4 lots étaient inférieurs à la limite de détection de 10 UFC/g, 3 lots dépassaient le seuil de 8,2 log UFC/g, les autres contenaient en moyenne $6,75 \pm 0,79$ log d'UFC/g de *Campylobacter* spp.

Parmi les 4 lots <10 UFC/g : deux provenaient de la même exploitation, et deux provenaient d'élevages dans lesquels un autre bâtiment échantillonné le même jour s'est révélé fortement contaminé.

Le détassage des volailles et l'âge des animaux sont décrits dans la littérature comme des facteurs augmentant l'excrétion de *Campylobacter* dans les élevages (Hue *et al*, 2010). Dans cette étude l'enlèvement des femelles avait été effectué dans 24/30 lots, et les 4 lots <10 UFC/g avaient été détassés. Parmi les lots positifs, aucune corrélation entre l'âge et la quantité de *Campylobacter* spp dénombrée n'a été observée.

3.2. Comparaison du dénombrement par la méthode de référence et de la quantification par la qPCR en temps réel sur les fientes caecales

La concordance entre les résultats obtenus par les différentes méthodes proposées par les trois laboratoires a d'abord été vérifiée sur les aliquots de fientes caecales fraîches. Les résultats de quantification de *Campylobacter* spp. par qPCR sur les aliquots de fientes diluées au 1/10 montrent une bonne corrélation avec le dénombrement par culture bactérienne (90 % et 94 % pour le laboratoire #2 et #3 respectivement)(Fig .1). Toutefois, la méthode par qPCR quantifiant à la fois l'ADN des bactéries vivantes et mortes, il n'est pas surprenant de constater des quantités bactériennes plus fortes de $1,4 \pm 1,3$ log pour le laboratoire #2 et $1,5 \pm 1,1$ log pour le laboratoire #3 par rapport à la méthode de référence qui ne dénombre que les bactéries vivantes.

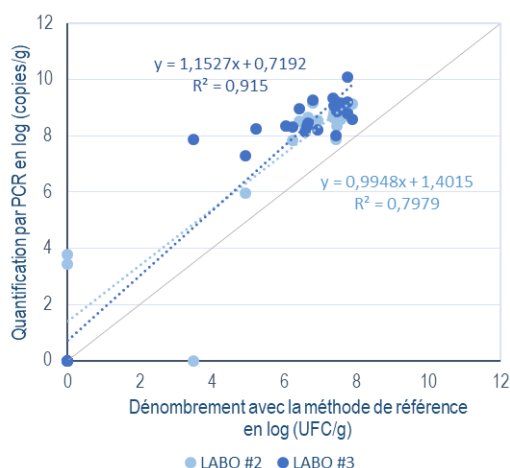


Figure 1 : Quantité de *Campylobacter* spp. estimée dans les pools de 10 fientes caecales par les laboratoires (LABO) #2 et #3 par la qPCR en temps réelle comparée au dénombrement avec la méthode de référence réalisé par le laboratoire #1.

Deux des échantillons inférieurs à la limite de détection par dénombrement en culture bactérienne et en PCR par le laboratoire #3 ont été quantifiés en qPCR par le laboratoire #2 à moins de 4 log copie/g. Il s'agit d'échantillons collectés dans deux exploitations fortement contaminées sur le deuxième bâtiment échantillonné in situ. Dans ces conditions, il est possible que la bactérie soit présente à une quantité inférieure au seuil de détection des méthodes utilisées par les laboratoires #1 et #3 pour être détectée systématiquement.

3.3. Comparaison du dénombrement par la méthode de référence sur fientes fraîche et de la quantification par qPCR à partir des pédichiffonnettes.

Les résultats de quantification de *Campylobacter* spp. par qPCR à partir des pédichiffonnettes montrent une bonne corrélation avec le dénombrement par culture bactérienne effectué sur le pool de 10 fientes caecales fraîches (71 % et 93 % pour le laboratoire #2 et #3 respectivement)(Fig. 2). La plus faible corrélation observée pour le laboratoire #2 est en partie due à un échantillon pour lequel *Campylobacter* spp n'a pas été détecté avec la méthode utilisée par le laboratoire #2 alors qu'il a été décrit très fortement contaminé d'après les laboratoires #1 et #3. Aucune explication n'a pu être apportée par le laboratoire.

Les quantités estimées sur les pédichiffonnettes par le laboratoire #2 sont plus faibles en moyenne de $-0,7 \pm 1,9$ log que celles estimées par dénombrement sur les fientes. A contrario, les quantités estimées sur les pédichiffonnettes par le laboratoire #3 sont plus fortes que le dénombrement sur fientes en moyenne de $2,4 \pm 1,1$ log. Ces différences moyennes peuvent s'expliquer par les modalités d'analyse (ex. les liquides de dilution, les méthodes de mise en suspension des bactéries, d'extraction d'ADN et de qPCR) qui sont propres à chaque

laboratoire. La variabilité peut quant à elle être expliquée par la quantité de matière fécale variable collectée par chaque paire de pédichiffonnettes.

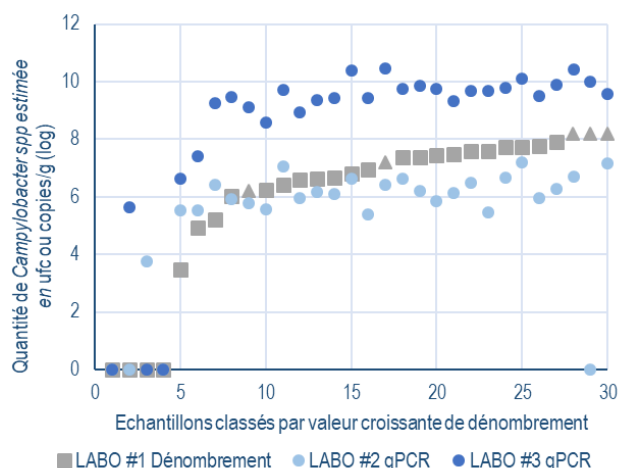


Figure 2 : Quantité de *Campylobacter* spp. estimée pour chaque lot par les trois laboratoires avec leur méthode respective : laboratoire #1 par dénombrement de culture bactérienne à partir d'un pool de fientes caecales fraîches (méthode de référence), laboratoires #2 et #3 par qPCR sur pédichiffonnettes. Pour le LABO #1, les triangles indiquent les échantillons dont la quantité de *Campylobacter* réelle dépassait la limite haute de dénombrement dans leur série (valeur limite indiquée par les triangles).

3.4. Effet de la litière sur l'échantillonnage par pédichiffonnettes

Le choix des matériaux utilisés pour la litière a un impact sur l'état général du sol (plus ou moins humide et friable) et par conséquent sur la quantité de matière fécale en contact avec les pédichiffonnettes. Afin de vérifier que cela n'impacte pas l'échantillonnage, et que l'usage des pédichiffonnettes ne représente pas un biais lié au type de litière, l'écart moyen entre la quantification sur pédichiffonnettes et le dénombrement a été comparé par type de litière par un test de Kuskall-Wallis. Ce dernier n'indique pas de différence significative entre les litières (p-value = 0,1805 pour le laboratoire #2 et p-value = 0,4468 pour le laboratoire #3).

4. Conclusion

Cette étude montre qu'il est possible d'utiliser des méthodes par qPCR pour la détection rapide (<48h) de *Campylobacter* spp en élevage avicole. Attention, si la mesure sur fientes caecales fraîches semble donner des résultats homogènes entre laboratoires, avec une marge d'erreur acceptable (autour de 1 log), l'échantillonnage par pédichiffonnette se traduit par une quantification plus variable d'un labo à l'autre indiquant des biais possibles ayant pour origine la préparation du prélèvement, la méthode de mise en suspension des bactéries, d'extraction ou d'analyse. Un travail d'amélioration de la fiabilité des quantifications pourrait être envisagé avec les laboratoires. La relation entre les quantités détectées par

PCR en élevage et celles relevées sur peau de cou à l'abattoir reste à être investiguée.

Les méthodes d'évaluation rapide de *Campylobacter* spp en élevage constituent un nouvel outil de mesure plus accessible pour la filière, et offre l'opportunité de réaliser des études allant des leviers de maîtrise en élevage à la mise en œuvre de plans de surveillance et de prévention. Un nouvel outil qui, à terme, contribuera à répondre aux exigences européennes visant à réduire les contaminations à *Campylobacter* spp à l'abattoir afin de toujours mieux lutter contre les toxi-infection alimentaire d'origine animale.

Remerciements

Ce projet a été conduit en 2022 grâce au financement du CIPC et de la FIA. Nous remercions chaleureusement les organismes de productions (Le Gouessant, Sanders et Huttepain Bretagne) et les éleveurs qui ont participé à l'étude.

Références bibliographiques

- EFSA. 2011. Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. EFSA
- EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), Koutsoumanis K, Allende A, Alvarez-Ordóñez A, Bolton D, Bover-Cid S, Davies R, De Cesare A, Herman L, Hilbert F, Lindqvist R, Nauta M, Peixe L, Ru G, Simmons M, Skandamis P, Suffredini E, Alter T, Crotta M, Ellis-Iversen J, Hempen M, Messens W and Chemaly M, 2020. Update and review of control options for *Campylobacter* in broilers at primary production. EFSA Journal 2020;18(4):6090, 89 pp.
- Giesendorf et Quint. 1995. Detection and identification of *Campylobacter* spp. using the polymerase chain reaction. Cell. Mol. Biol. 41 (5) :625-38
- Haas K., Overesch G., Kuhnert, P. 2017. A quantitative real-time PCR approach for assessing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* colonization in broiler herds. J. Food Prot. 80(4):604-608
- Papić B., Pate M., Henigman U., Zajc U., Gruntar I., Biasizzo M., Ocepek M., Kušar D. 2017. New approaches on quantification of *Campylobacter jejuni* in poultry samples: the use of digital PCR and real-time PCR against the ISO standard plate count method. Front Microbiol 8:331. doi: 10.3389/fmicb.2017.00331
- Chereau F., Bessède E., De Valk H., Lehours P. 2020. Bilan de la surveillance des infections à *Campylobacter* en France en 2019. Bull. Nat. Santé Publique France. 7 p.
- Hue O., Le Bouquin S., Laisney M.-J., Allain V., Lalande F., Pepetin I., Rouxel S., Quesne S., Gloaguen P.-Y., Picherot M., Santolini J., Salvat G., Bougeard S., Chemaly M. 2010. Prevalence of and risk factors for *Campylobacter* spp. contamination of broiler chicken carcasses at the slaughterhouse. Food Microbiology. 27(8):992-999

Abstract: Tools to detect *Campylobacter* in poultry: Comparison of reference method and qPCR on drag swabs

Controlling contamination of poultry meat by *Campylobacter* is a major challenge for the poultry industry. To better monitor the evolution of excretion, and test action levers in livestock farms, the sector needs a detection / quantification method that is simple and easy to implement. Indeed, the reference method for the detection of *Campylobacter* spp., based on bacterial culture, is long, expensive and requires fresh samples, which makes it difficult to use in the field in a continuous monitoring program. The objective of this study was to compare the reference method to a quantitative PCR detection method based on sampling carried out with drag swabs as is done for the detection of *Salmonella*. The results indicate that the use of qPCR on drag swabs in poultry farms, to quickly detect and quantify *Campylobacter* spp at the flock scale is possible even if the methodologies between analysis laboratories deserve to be standardized. Moreover, additional work will be necessary to measure their ability to predict contamination at the slaughterhouse.