

DETECTION ET CARACTERISATION DE SOUCHES DE *CLOSTRIDIODES* *DIFFICILE* DANS DES ELEVAGES DE POULETS EN FRANCE

Le Maréchal Caroline¹, Guyard Muriel¹, Martin Laure¹, Gateau Cécile², Rouxel Sandra¹, Couturier Jeanne², Poezevara Typhaine¹, Syed-Zaidi Rabab², Marault Muriel³, Youssef Anlyata², Kooh Pauline⁴, Chemaly Marianne¹, Barbut Frédéric², Firmesse Olivier³

¹ ANSES, LABORATOIRE DE PLOUFRAGAN-PLOUZANE-NIORT, UNITE HQPAP- BP53 - 22440 PLOUFRAGAN

² CENTRE NATIONAL DE REFERENCE CLOSTRIDIUM DIFFICILE, HOPITAL SAINT-ANTOINE, ASSISTANCE PUBLIQUE- HOPITAUX DE PARIS - 34 rue Crozatier - 75012 PARIS

³ ANSES, LABORATOIRE DE SECURITE DES ALIMENTS, UNITE SBCL - 14 Rue Pierre et Marie Curie - 94700 MAISONS-ALFORT

⁴ ANSES, DIRECTION DE L'EVALUATION DES RISQUES - UERALIM - 14 Rue Pierre et Marie Curie - 94700 MAISONS-ALFORT

Caroline.lemarechal@anses.fr

RÉSUMÉ

Clostridioides difficile est la première cause mondiale de diarrhées infectieuses nosocomiales chez les adultes. Une augmentation des infections à *C. difficile* d'origine communautaire est également notée ces dernières années dont les sources potentielles sont l'environnement, les animaux, les aliments et les contacts humains. Une étude récente menée en Allemagne en 2021 a permis d'isoler des souches de *C. difficile* à partir de viandes de poulets et de dindes avec peau. La caractérisation de ces souches a montré la présence d'isolats présentant des ribotypes similaires à ceux retrouvés dans les infections humaines. Aucune donnée n'est actuellement disponible en France au sujet de la prévalence ou des caractéristiques des souches de *C. difficile* dans la filière avicole.

L'objectif de notre étude était d'évaluer la prévalence de *C. difficile* au stade de l'élevage dans la filière avicole et de caractériser les souches isolées. Un total de 190 échantillons de contenus caecaux de poulets de chair en provenance de 21 élevages a été analysé sur milieu sélectif. Une sélection de 20 souches a ensuite été caractérisée par PCR-Ribotypage (méthode de référence de typage de *C. difficile*), par PCR ciblant les facteurs de virulence (*tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *cdtA*, *cdtB*) et la sensibilité aux antibiotiques a été évaluée. *C. difficile* a été détecté dans 50 contenus caecaux (26,3%) provenant de 18 élevages. Toutes les souches caractérisées présentent les gènes codant pour les toxines A et B; seules deux souches présentent les gènes codant pour la toxine binaire. Les PCR-Ribotypes sont très variés (13 profils identifiés), dont certains sont communs à ceux impliqués dans les infections humaines en France tels que les PCR-Ribotypes 001, 005, 015 ou 020. Toutes les souches sont sensibles à la vancomycine, au métronidazole, à l'érythromycine et à la moxifloxacine, 5 % à la clindamycine, 90 % à la tétracycline. Cette étude permet de disposer d'un premier aperçu des caractéristiques d'isolats de *C. difficile* provenant de caeca de poulets de chair en France.

ABSTRACT

Detection and characterization of *Clostridioides difficile* strains in French broiler farms

Clostridioides difficile is the major cause of nosocomial diarrhea in adults worldwide. A raise in the number of *C. difficile* infections in the community has also been reported, the potential suspected sources being environment, animals, food and human contacts. A recent study conducted in Germany and published in 2021 has allowed the isolation of *C. difficile* from chicken and turkey meat with skin. Characterization of the isolates using PCR-ribotyping showed similarities between poultry and human strains. There has been no available data about the prevalence or characterization of *C. difficile* in poultry in France up to now.

The objective of our study was to evaluate the occurrence of *C. difficile* in poultry farms and their characterization. A total of 190 samples of caecal contents from 21 farms was analysed on selective medium. Twenty strains were further selected and characterized using PCR-Ribotyping (gold standard for *C. difficile* typing), multiplex PCR for the detection of virulence factors (*tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *cdtA*, *cdtB*) and antibiotic sensitivity was evaluated. *C. difficile* was detected in 50 caecal contents (26.3%) coming from 18 farms. Genes encoding for Toxin A and B were detected in all isolates, and only two isolates had the genes encoding for binary toxin. PCR-Ribotypes were highly variable (13 profiles), some of which were similar to the ones involved in human infections such as 001, 005, 015 ou 020. All isolates were sensitive to vancomycin, moxifloxacin, metronidazole, erythromycin, 5% to clindamycin and 90% to tetracycline. This study provides a first picture of characteristics *C. difficile* isolated from broiler caecal contents in France.

INTRODUCTION

Clostridioides difficile, anciennement classifié comme *Clostridium difficile* (Lawson 2016) est une bactérie à coloration de Gram positif, anaérobie, sporulée, considérée comme un pathogène émergent responsable de diarrhées et colites chez l'Homme et les animaux. Les infections à *C. difficile* constituent la cause majeure de diarrhées nosocomiales chez l'adulte et *C. difficile* est de plus en plus associé à des infections communautaires (Barbut et al. 2019). Les animaux et les aliments sont considérés comme des réservoirs potentiels de souches de *C. difficile* (Knight et al. 2019). Des études récentes ont permis de détecter et isoler des souches de *C. difficile* dans des abats de volaille (17% dont 28% des gésiers analysés et 6% des foies analysés) (Candel-Perez et al. 2021) et dans de la viande de volaille (16,8% de viande de poulet avec peau) (Heise et al. 2021). La caractérisation des souches isolées de ces études a permis de mettre en évidence des profils similaires entre les souches isolées de produits de volaille et les souches impliquées dans les infections humaines. Les volailles apparaissent comme un hôte naturel de *C. difficile*, via un portage asymptomatique (Rodriguez Diaz et al. 2018).

Aucune étude n'a été menée en France jusqu'à présent pour évaluer la présence de *C. difficile* ou caractériser les souches de *C. difficile* dans la filière avicole. L'objectif de cette étude était de collecter des premières données afin d'estimer la prévalence de *C. difficile* au stade de l'élevage dans la filière avicole en France et de caractériser une sélection de souches isolées.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Echantillons de contenus caecaux

Des contenus caecaux (entre 7 et 10 contenus caecaux par élevage) en provenance de 21 élevages de poulets de chair ont été inclus dans cette étude (Total de 190 échantillons). Les lots des poulets (un lot par élevage) comprenaient entre 8658 et 33 660 animaux (moyenne d'un lot de 22 780 animaux).

Les échantillons ont été prélevés en France, en juin et juillet 2019 sur des animaux âgés de 29 à 33 jours. Ils ont été stockés au congélateur jusqu'à la mise en analyse.

1.2 Protocole de détection de *C. difficile* dans les contenus caecaux

Un gramme de chaque contenu a été dilué au dixième dans 9 ml de Brain Heart Infusion (BHI; BioMérieux, Craponne, France) supplémenté en taurocholate (1%, Sigma Aldrich, Lyon, France), cefoxitine (8 mg/l) et cyclosérine (250 mg/l) (Oxoid, Dardilly, France). Les tubes ont ensuite été incubés à

37°C dans une enceinte anaérobie (A35; Don Whitley commercialisé par BioMérieux, Bruz, France) alimenté par un gaz anaérobie (10% H₂, 10% CO₂, 80% N₂). Après 7 jours d'incubation, un isolement a été réalisé à partir de 10 µl de bouillon sur milieu ChromID *C. difficile* agar (BioMérieux, Craponne, France). Les boîtes ont été incubées à 37°C dans l'enceinte anaérobie pendant 48h puis les colonies présentant les caractères spécifiques de *C. difficile* ont été réisolées sur milieu non sélectif avant d'être mises en collection à -80°C (3 isolats par échantillon).

1.3 Caractérisation des isolats

L'extraction d'ADN, la détection par PCR des gènes codant pour les toxines A, B, toxine binaire (gènes *cdtA* et *cdtB*), les gènes *lok* (présent uniquement chez les souches non toxiques), *tpi* (gène caractéristique de *C. difficile* confirmant l'identification) et *tcdC* (régulateur des gènes codant pour les toxines A et B, identification des délétions), l'identification du PCR-Ribotype (méthode de référence internationale pour le typage de *C. difficile*) et l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques ont été réalisées tel que décrit précédemment (Le Maréchal et al. 2020).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Détection de *C. difficile* dans les contenus caecaux des poulets de chair

C. difficile a été détecté sur ChromID *C. difficile* agar dans 50 échantillons sur les 190 analysés soit 26,3%. Dans les études similaires menées précédemment dans d'autres pays, les résultats montraient une détection de 62,3% dans des fèces de poules pondeuses (Zidaric et al. 2008); de 0% (Zhang et al. 2020), 29% (Simango et al. 2008) et 5% (Indra et al. 2009), dans des fèces de poulets de chair, de 5,8% dans des fèces de volaille (Koene et al. 2012) et de 11,53% dans des contenus intestinaux de volaille (Abdel-Glil et al.; 2018). Aucun protocole standardisé n'existe au niveau international pour la détection de *C. difficile*, les méthodes de détection appliquées varient donc d'une étude à une autre ce qui pourrait expliquer les différences de prévalence observées entre les études.

Sur les 21 élevages investigués dans cette étude, *C. difficile* a été détecté dans 18 élevages dans 10 à 78% des échantillons (Figure 1). A notre connaissance, cette étude est la première menée au stade de l'élevage portant sur la comparaison du niveau de détection de *C. difficile* au sein de chaque élevage. Les études précédentes disponibles dans la littérature portaient sur : l'analyse d'échantillons prélevés dans un nombre réduit d'élevages (Zidaric et al. 2008) ou sans indication précise concernant l'élevage d'origine (Zhang et al. 2020), sur l'analyse d'échantillons prélevés au stade de l'abattoir (Abdel-

Glil et al ; 2018, Indra et al. 2009), au stade de la distribution (Simango et al. 2008) ou reçus pour analyse dans le cadre de diagnostic vétérinaire (Koene et al. 2012).

2.2 Caractérisation des isolats de *C. difficile*

2.2.1 Confirmation de *C. difficile* et détection des gènes codant pour les toxines par PCR

Une sélection de 20 isolats a été caractérisée, issus de 12 élevages. Les isolats ont été sélectionnés de façon à évaluer la diversité intra et inter élevages. La détection du gène *tpi* a confirmé l'identification de *C. difficile*. L'ensemble des souches caractérisées possède les gènes codant pour les toxines A et B, les deux facteurs de virulence majeurs de *C. difficile*. Les gènes codant pour la toxine binaire ont été détectés dans 2 souches (10%), ce qui semble en accord avec les études précédentes dans lesquelles les souches d'origine avicole présentaient les gènes codant pour les toxines A et B mais pas le gène codant pour la toxine binaire (Indra et al. 2009, Koene et al. 2012). Le rôle exact de ce facteur de virulence n'a pas été clairement identifié mais les souches produisant cette toxine présentent une virulence accrue (Cowardin et al. 2016). Une délétion au niveau du gène *tcdC* a été détectée dans 3 souches. Ce gène est un répresseur des gènes codant pour les toxines A et B, une délétion entraîne donc un dysfonctionnement au niveau de la régulation de ces gènes et une surproduction des toxines (Persson et al. 2011).

2.2.2 PCR-Ribotypes

La méthode internationale de référence pour le typage de *C. difficile* est la méthode de PCR-Ribotypage. Un total de 13 PCR-Ribotypes différents a été identifié parmi les 20 souches testées en provenance de 12 élevages différents (Tableau 1). Pour 8 élevages (B, E, F, I, J, K, N, O), deux isolats ont été caractérisés et pour 5 de ces élevages (B, F, I, N, O), deux PCR-Ribotypes distincts ont été identifiés.

Cette forte diversité des PCR-Ribotypes retrouvée en volaille entre les élevages ou au sein d'un élevage est rapportée dans la littérature (Rodriguez Diaz et al. 2018). Ainsi, 12 PCR-Ribotypes différents ont par exemple été identifiés via l'analyse de 44 souches isolées d'un seul élevage de poules pondeuses (Zidaric et al. 2008).

Certains des PCR-Ribotypes identifiés dans notre étude sont régulièrement associés à des infections humaines (en particulier les PCR-Ribotypes 001, 003, 005, 015, 020, 087, 131).

Malgré la très forte variabilité des PCR-Ribotypes détectés dans cette étude et entre les études disponibles dans la littérature, le PCR-Ribotype 001

semble être retrouvé fréquemment au niveau des volailles (Heise et al. 2021, Berger et al. 2011, Abdel-Gil et al. 2018, Indra et al. 2009). Il a été retrouvé dans 2 élevages différents dans notre étude.

Ce PCR-Ribotype impliqué dans les infections humaines soulève la question d'un éventuel rôle de réservoir joué par les volailles. Une comparaison génomique d'isolats d'origine aviaire et d'isolats cliniques humains permettrait d'explorer cette hypothèse.

2.2.3 Sensibilité aux antibiotiques

Toutes les souches isolées au cours de notre étude sont sensibles à la vancomycine, au métronidazole, à l'érythromycine et à la moxifloxacine et 5% des souches à la clindamycine ainsi que 90% des souches à la tétracycline. Les souches résistantes à la tétracycline sont les souches de PCR-Ribotype 131 (retrouvé dans l'élevage N) qui possèdent le gène codant pour la toxine binaire et présentent une délétion au niveau du gène *tcdC*. La résistance à la clindamycine est courante chez *C. difficile* (Rodriguez Diaz et al. 2018).

CONCLUSION

Cette étude est la première menée en France sur la détection et la caractérisation de *C. difficile* dans la filière avicole au stade de l'élevage. Les résultats montrent que sur 21 élevages de poulets de chair investigués, 18 présentaient au moins un résultat positif. Une forte diversité des souches isolées a été observée. Certains PCR-Ribotypes détectés correspondent à des PCR-Ribotypes impliqués dans les infections humaines, soulevant la question du rôle éventuel joué par la volaille en tant que réservoirs de souches de *C. difficile* transmissibles à l'homme.

Ce projet se poursuit via une nouvelle étude (CLOSTABAT, financement ANR) qui démarre en 2022 et vise notamment à évaluer la contamination dans les différentes filières viandes par *C. difficile* au stade de l'abattoir, puis à caractériser les souches isolées dans l'optique d'évaluer leur éventuel potentiel zoonotique via une approche d'attribution des sources. La détection et la caractérisation de souches de *C. difficile* dans les viandes de volailles sont programmées en 2022 dans le cadre d'un plan de surveillance et plan de contrôle (PSPC) de la DGAL.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier l'ensemble des éleveurs et des organisations de production pour leur participation à l'étude. Cette étude a été financée par l'Anses (AMI transversalité 2018, projet DIFALIBO) et le conseil départemental des Côtes d'Armor.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Glil, M.Y., Thomas, P., Schmoock, G., Abou-El-Azm, K., Wieler, L.H., Neubauer, H., and Seyboldt, C. (2018). *Anaerobe* 51, 21-25.
- Barbut, F., Day, N., Bouee, S., Youssef, A., Grandvoinnet, L., Lalande, V., Couturier, J., and Eckert, C. (2019). *Clin Microbiol Infect* 25, 588-594.
- Candel-Pérez, C., Santaella-Pascual, J., Ros-Berrueto, G., and Martínez-Graciá, C. (2021). *J Food Prot* 84, 310-314.
- Cowardin, C.A., Buonomo, E.L., Saleh, M.M., Wilson, M.G., Burgess, S.L., Kuehne, S.A., Schwan, C., Eichhoff, A.M., Koch-Nolte, F., Lyras, D., Aktories, K., Minton, N.P., and Petri, W.A. (2016). *Nature Microbiology* 1, 16108.
- Heise, J., Witt, P., Maneck, C., Wichmann-Schauer, H., and Maurischat, S. (2021). *Int J Food Microbiol* 339, 109032.
- Indra, A., Lassnig, H., Baliko, N., Much, P., Fiedler, A., Huhulescu, S., and Allerberger, F. (2009). *Wien Klin Wochenschr* 121, 91-95.
- Knight, D.R., Kullin, B., Androga, G.O., Barbut, F., Eckert, C., Johnson, S., Spigaglia, P., Tateda, K., Tsai, P.J., and Riley, T.V. (2019). *MBio* 10.
- Koene, M.G., Mevius, D., Wagenaar, J.A., Harmanus, C., Hensgens, M.P., Meetsma, A.M., Putirulan, F.F., Van Bergen, M.A., and Kuijper, E.J. (2012). *Clin Microbiol Infect* 18, 778-784.
- Lawson, P. A., D. M. Citron, K. L. Tyrrell, and S. M. Finegold. (2016). *Anaerobe* 40:95-9.
- Le Maréchal, Caroline, Cécile Gateau, Typhaine Poezevara, Jeanne Couturier, Sandra Rouxel, Rabab Zyed-Saidi, Emmanuelle Houard, Anne-Marie Pourcher, Martine Denis, and Frédéric Barbut. (2020). *Anaerobe*:102180-102180.
- Persson, S., Jensen, J.N., and Olsen, K.E. (2011). *J Clin Microbiol* 49, 4299-4300.
- Rodriguez Diaz, C., Seyboldt, C., and Rupnik, M. (2018). *Adv Exp Med Biol* 1050, 227-243.
- Simango, C., and S. Mwakurudza. (2008). *Int J Food Microbiol* 124, 268-270.
- Simango, C., and S. Mwakurudza. (2008). *Int J Food Microbiol* 124 (3):268-70.
- Zhang, W.Z., Li, W.G., Liu, Y.Q., Gu, W.P., Zhang, Q., Li, H., Liu, Z.J., Zhang, X., Wu, Y., and Lu, J.X. (2020). *BMC Microbiol* 20, 70.
- Zidaric, V., Zemljic, M., Janezic, S., Kocuvan, A., and Rupnik, M. (2008). *Anaerobe* 14, 325-327.

Figure 1. Résultats de détection de *C. difficile* dans les contenus caecaux de poulets de chair en provenance de 21 élevages

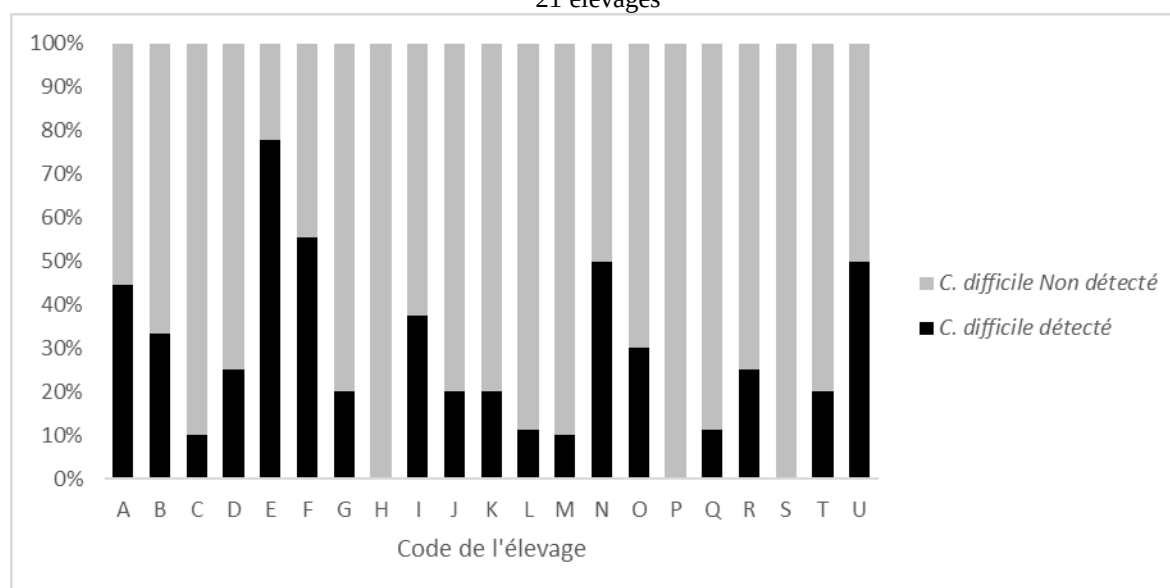


Tableau 1. Résultats de caractérisation d'une sélection de 20 isolats de *C. difficile*
(+ : gène détecté ; - : gène non détecté ; T : gène tronqué ; 0 : pas de délétion dans le gène ; -18 : délétion à la position -18 dans le gène *tcdC*)

N° isolat	Code élevage	<i>tox A</i> ¹	<i>tox B</i> ²	<i>lok</i> ³	<i>tpi</i> ⁴	Tox Binaire ⁵	<i>tcdC</i> ⁶	PCR Ribotype ⁷
343	B	+	+	-	+	T	0	005
346	B	+	+	-	+	T	0	AI-21/0
340	C	+	+	-	+	T	0	005
387	D	+	+	-	+	-	0	481
370	E	+	+	-	+	T	0	087
367	E	+	+	-	+	T	0	087
355	F	+	+	-	+	T	0	446
352	F	+	+	-	+	T	0	452
395	I	+	+	-	+	T	0	001
401	I	+	+	-	+	T	0	FR261*
325	J	+	+	-	+	T	0	087
322	J	+	+	-	+	T	0	087
301	K	+	+	-	+	T	0	020
304	K	+	+	-	+	T	0	020
392	L	+	+	-	+	T	-18	001
337	M	+	+	-	+	T	0	015
310	N	+	+	-	+	+	-18	131
307	N	+	+	-	+	T	0	422
328	O	+	+	-	+	T	0	003
331	O	+	+	-	+	+	-18	131

1 : détection du gène codant pour la toxine A ; 2 : détection du gène codant pour la toxine B ; 3 : détection du gène codant pour *lok* présent chez les souches non toxinogènes ; 4 : détection du gène codant pour la triose phosphate isomérase ; 5 : détection des gènes codant pour la toxine binaire ; 6 : détection du gène codant pour le gène *tcdC*, régulateur des gènes *tcdA* et *tcdB* ; 7 : PCR-Ribotype identifié ; * : nomenclature interne du CNR