

EXPOSITION DES PROFESSIONNELS AUX *CHLAMYDIACEAE* : ENQUETE DANS DEUX ABATTOIRS DE VOLAILLES FRANÇAIS

**Hulin Virginie¹, Oger Sabrina², Vorimore Fabien¹, Aaziz Rachid¹,
de Barbeyrac Bertille³, Berruchon Jacques², Sachse Konrad⁴, Laroucau Karine¹**

¹UNIVERSITE PARIS-EST - ANSES - UNITE DES ZOONOSES BACTERIENNES –
12 rue Pierre et Marie Curie - 94701 MAISONS-ALFORT,

²CENTRE HOSPITALIER REGIONAL - Les Oudairies - 85000 LA ROCHE-SUR-YON,

³CENTRE NATIONAL DE REFERENCE (CNR) *CHLAMYDIA* – 146 rue Léo Saignat -
33076 BORDEAUX,

⁴FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT – Naumburger Str. 96a - 07743 JENA (GERMANY)

Karine.laroucau@anses.fr

RÉSUMÉ

Chlamydia (C.) psittaci et *Chlamydia (C.) gallinacea* sont deux espèces de bactéries appartenant à la famille des *Chlamydiaceae* et pouvant infecter les volailles. Si *C. psittaci* est connue pour être responsable d'une zoonose nommée psittacose chez l'Homme, le pouvoir zoonotique de *C. gallinacea*, espèce récemment décrite, n'est pas clairement établi à ce jour. Des cas de psittacose étant régulièrement signalés dans les abattoirs de volailles français, et afin d'apprécier le niveau d'exposition aux *Chlamydiaceae* des professionnels de la filière, une étude a été mise en place dans deux abattoirs : le premier spécialisé dans l'abattage de canards (Abattoir A), le second traitant toutes sortes de volailles, excepté le canard (Abattoir B). En février 2013 et durant une semaine, tous les lots de volailles abattus dans ces deux abattoirs ont été analysés par PCR. Des suivis sérologiques et des écouvillons pharyngés ont également été réalisés sur les personnels volontaires entre avril et juin 2013. Alors que l'analyse des prélèvements sur les lots de volailles a permis de mettre en évidence quasi exclusivement l'espèce *C. psittaci* dans l'abattoir A, seule l'espèce *C. gallinacea* a été détectée dans l'abattoir B. De façon intéressante, l'analyse des prélèvements humains a mis en évidence un début de foyer de psittacose dans l'abattoir A, tandis que de faibles réponses sérologiques vis-à-vis de *C. psittaci* ont été détectées chez le personnel de l'abattoir B. Des outils de diagnostic sérologique spécifiques à *C. gallinacea* sont encore manquants. Au regard de la forte prévalence des *Chlamydiaceae* mise en évidence dans les lots de volailles analysés, il est fortement recommandé au personnel ayant à manipuler les volailles (canards et autres) de porter des équipements de protection adaptés.

ABSTRACT

Exposition to *Chlamydiaceae* in slaughterhouses: investigation in two French poultry slaughterhouses

Chlamydia (C.) psittaci and *Chlamydia (C.) gallinacea* are two species that can both infect poultry birds. Whereas *C. psittaci* is known to be responsible of a zoonotic disease called psittacosis for humans, the zoonotic potential of *C. gallinacea* has not been determined yet. As psittacosis cases are regularly reported in French slaughterhouses and in order to assess the exposition of professionals to these bacteria, a survey has been conducted in two French poultry slaughterhouses: one specialized in ducks exclusively (Slaughterhouse A), the second one processing different poultry species except ducks (Slaughterhouse B). Cloacal swabs were taken on all incoming poultry flocks during a given week in February 2013 and analyzed by real-time PCR. All voluntary slaughterhouse workers have also been subjected to blood samplings and a throat swabbing. The predominance of *C. psittaci* was highlighted in duck flocks (Slaughterhouse A), while only *C. gallinacea* was detected in the other poultry bird species (Slaughterhouse B). Interestingly, analyse of the human samples showed a current event of psittacosis in slaughterhouse A, while only very low serological responses were observed in slaughterhouse B. However, no serological test is currently available for the specific identification of a *C. gallinacea* exposure. Nevertheless, due to the high prevalence of both species in poultry birds, it's recommended to wear appropriate protective equipment during activities associated with live animals.

INTRODUCTION

La chlamydiose aviaire, nommée également psittacose chez l'Homme, est une zoonose connue depuis des siècles et due à *C. psittaci*, une bactérie parasite intracellulaire obligatoire appartenant à la famille des *Chlamydiaceae*. Mondialement répandue, *C. psittaci* peut infecter plus de 450 espèces d'oiseaux parmi plus de 30 ordres différents (Kaleta et Taday, 2003). L'infection est le plus souvent asymptomatique chez les animaux. Cependant, en fonction de l'espèce aviaire, de l'âge de l'animal ou encore de la souche bactérienne impliquée, des signes cliniques variables peuvent être observés.

La transmission à l'Homme se fait par le biais d'aérosols contaminés. La psittacose entraîne alors des symptômes pseudo-grippaux peu spécifiques ainsi que des problèmes respiratoires sévères qui peuvent s'avérer fatals dans de rares cas. Le diagnostic, difficile à établir, repose classiquement sur la mise en évidence d'anticorps anti-*C. psittaci*.

Si *C. psittaci* a longtemps été considérée comme le principal agent de la chlamydiose aviaire, de récentes études ont mis en évidence d'autres espèces : *C. avium* principalement détectée chez des pigeons, *C. gallinacea* identifiée chez les volailles, notamment des poulets et des dindes (Sachse et al., 2014) et *C. ibidis* uniquement mise en évidence à ce jour chez des ibis (Vorimore et al., 2013).

Le risque d'infection à *C. psittaci* est plus élevé chez les personnes en contact régulier avec des oiseaux, notamment dans un cadre professionnel (éleveurs, vétérinaires, personnel d'abattoir...). En France, des cas en lien avec une exposition à des canards mulards, espèce utilisée pour la production du foie gras, sont régulièrement recensés (Laroucau et al., 2009a ; Belchior et al., 2011 ; Carlier et al., 2014).

Afin d'apprécier l'exposition des professionnels aux *Chlamydiaceae* en abattoir de volailles, une étude a été menée en 2013 dans deux abattoirs manipulant des espèces aviaires différentes. Cette étude a porté sur l'analyse des lots de volailles abattus, ainsi que sur le suivi du personnel volontaire.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Prélèvements animaux

En février 2013 et durant une semaine, des prélèvements ont été effectués sur tous les lots de volailles abattues dans deux abattoirs français. Le premier (Abattoir A) est spécialisé dans l'abattage de canards, tandis que le second (Abattoir B) abat toutes sortes de volailles, à l'exception du canard (poulets, dindes, coqs, pintades...). Pour chaque lot, 15 animaux sélectionnés arbitrairement ont été soumis à un écouvillonnage cloacal après la plumeaison. Les prélèvements ont été stockés à -80°C en attendant d'être analysés.

1.1.1. Détection directe par PCR en temps réel

L'extraction d'ADN a été effectuée à l'aide du Qiamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France). Les ADN ont été analysés à l'aide d'une PCR en temps réel spécifique de la famille des *Chlamydiaceae* (Ehricht et al., 2006). Les ADN positifs ont ensuite été re-testés à l'aide de PCR spécifiques des espèces *C. psittaci* (Ménard et al., 2006) et *C. gallinacea* (Zocevic et al., 2012).

Tous les échantillons dont le Cq (Quantification cycle) était supérieur à 40 ont été considérés comme négatifs. Les lots comportant au moins un animal positif par PCR ont été classés comme positifs, et ceux contenant au moins 50 % d'échantillons positifs avec une moyenne du Cq ≤ 35 ont été considérés comme moyennement à fortement positifs.

1.1.2. Caractérisation moléculaire

Le gène *ompA* des échantillons positifs vis-à-vis de *C. psittaci* ou *C. gallinacea* a été séquencé à l'aide des amorces CTU/CTL ou Chomp191/371 (Laroucau et al., 2009b ; Denamur et al., 1991).

Pour les échantillons *Chlamydiaceae* positifs mais n'appartenant ni à l'espèce *C. psittaci*, ni à l'espèce *C. gallinacea*, le gène 16S rRNA a été partiellement amplifié à l'aide des amorces 16S1/rp2 (Thomas et al., 2006 ; Pudjiatmoko et al., 1997).

1.2. Prélèvements humains

Le personnel volontaire des deux abattoirs a été médicalement examiné entre avril et juin 2013. Les participants ont répondu à un questionnaire général portant sur leurs expériences professionnelles, les postes occupés, leurs antécédents médicaux et les éventuelles expositions extra-professionnelles à *C. psittaci*.

A l'occasion de cet entretien, un écouvillon pharyngé a été effectué, ainsi qu'une prise de sang, qui a été renouvelée au bout de 30 jours (J₀ et J₃₀).

1.2.1. Détection directe par PCR en temps réel

Les écouvillons pharyngés ont été soumis à une extraction d'ADN à l'aide du système MagNA Pure (Roche Diagnostics, Meylan, France). Les ADN ont été analysés à l'aide de PCR en temps réel spécifiques ciblant les *Chlamydiaceae* ou *C. psittaci*, comme décrit précédemment.

1.2.2. Sérologie

Un test d'immunofluorescence commercialisé a été utilisé (Chlamydia MIF, Focus, Eurobio, France) pour la détection d'anticorps spécifiques. Cet essai mesure des réponses aux sous-classes IgM et IgG vis-à-vis de trois espèces de *Chlamydia* : *C. psittaci*, *C. trachomatis* et *C. pneumoniae*. Le résultat pour les IgG équivaut à la réciproque de la plus haute dilution du sérum donnant une fluorescence. Concernant les IgM, uniquement la dilution au 1/16^{ème} a été testée, donnant un résultat positif ou négatif. On considère

qu'une multiplication par quatre du taux d'IgG est la preuve d'une infection active.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Prélèvements animaux

Dans l'abattoir A, 23 des 38 lots de canards analysés se sont révélés positifs vis-à-vis des *Chlamydiaceae* (**Tableau 1**). Tous les lots positifs présentaient un Cq moyen faible, à l'exception de deux lots issus d'une même exploitation. Tandis que l'espèce *C. psittaci* a été identifiée dans l'ensemble des lots faiblement positifs pour lesquels une identification de l'espèce était possible, pour les deux lots frères les analyses moléculaires ont montré l'existence d'une souche n'appartenant ni à l'espèce *C. psittaci*, ni à l'espèce *C. gallinacea*. L'analyse de la séquence partielle du gène 16S rRNA a montré qu'il s'agissait d'une souche proche d'une *Chlamydiaceae* atypique (95 % d'homologie) détectée chez un oiseau marin (Christerson et al., 2010). Les prélèvements effectués dans ce même élevage par la suite n'ont malheureusement pas permis de détecter à nouveau cette souche particulière. Une contamination de ces canards via la faune sauvage pourrait être une explication à la présence ponctuelle de cette souche atypique.

Chez les canards, le portage asymptomatique de *C. psittaci* est très prévalent et, dans les élevages, différents schémas d'excrétion ont été mis en évidence à ce jour (Vorimore et al., 2014). D'une façon générale, les canards excrètent principalement alors qu'ils sont sur les parcours, l'excrétion tendant à diminuer dans le temps pour atteindre des niveaux résiduels en fin de chaîne. Les résultats obtenus dans le cadre du suivi mis en place dans l'abattoir A montrent qu'il est possible que des lots fortement excréteurs puissent être manipulés occasionnellement par le personnel.

Des *Chlamydiaceae* ont été détectées dans 21 des 33 lots de volailles analysés dans l'abattoir B, impliquant majoritairement des poulets et des pintades (**Tableau 1**). Tous les lots positifs présentaient un Cq moyen faible, à l'exception de trois lots pour lesquels une charge bactérienne plus importante a été mise en évidence. Seule l'espèce *C. gallinacea* était présente dans ces lots. Le typage des souches, basé sur le séquençage partiel du gène *ompA* a pu être réalisé dans deux des trois lots positifs. Au sein d'un même lot, des séquences identiques ont été obtenues mais les séquences étaient différentes d'un lot à l'autre, illustrant et confirmant la diversité des souches au sein de cette espèce. Il est intéressant de noter que l'espèce *C. psittaci* n'a été mise en évidence dans aucun des lots de poulets et de dindes analysés. Les travaux conduits jusqu'à présent dans les lots de volailles tendent à montrer que *C. psittaci* est très prévalente chez les canards tandis que *C. gallinacea* est l'espèce pré-dominante chez les poulets et les

pintades. Ces données diffèrent des travaux récemment publiés par une équipe belge qui avait montré que plus de 50 % des lots de poulets et de dindes analysés dans un abattoir étaient positifs vis-à-vis de *C. psittaci* (Dickx et al., 2010). Les résultats varient d'une étude à une autre et d'un pays à l'autre. Sur notre territoire, la mise en évidence de l'espèce *C. psittaci* chez des volailles autres que des canards est extrêmement rare. En mai 2013, suite à des cas groupés de psittacose, les investigations menées avaient permis d'incriminer des poulets. Le génotypage de la souche de *C. psittaci* impliquée, ainsi que l'analyse des lots de volailles présents sur l'exploitation et leur rotation, avait permis de suggérer que cette contamination accidentelle s'expliquait par le partage des parcours entre des poulets et des canards, chez lesquels ce même génotype avait été majoritairement mis en évidence (Laroucau et al., 2014).

2.2. Prélèvements humains

Dans l'abattoir A, 28 personnes ont participé à l'étude. Des résultats positifs ont été obtenus par PCR pour deux écouvillons pharyngés dont l'un provenant d'un homme de 34 ans, récemment embauché, qui présentait des symptômes grippaux au moment de l'examen et qui a dû être hospitalisé par la suite.

Alors que les résultats d'immunofluorescence étaient négatifs pour l'ensemble des volontaires à J₀, 10 personnes ont présenté une augmentation du taux d'IgM et/ou d'IgG à J₃₀. Ces séroconversions mettent en évidence une exposition à *C. psittaci*, illustrant la possibilité du passage occasionnel de lots plus excréteurs sur la chaîne d'abattage.

Dans l'abattoir B, 32 volontaires ont participé à l'étude, mais seules de faibles réponses sérologiques vis-à-vis de *C. psittaci* ont été détectées. Ces résultats sont en accord avec l'analyse des lots de volailles sur une semaine qui a montré la seule circulation de *C. gallinacea* dans ces lots. Cependant, il n'existe pas, à ce jour, de test sérologique permettant d'apprécier une exposition à cette nouvelle espèce de *Chlamydiaceae*.

CONCLUSION

Cette étude montre que les expositions aux *Chlamydiaceae* sont différentes en fonction des espèces aviaires considérées. En effet, *C. psittaci* est majoritairement détectée chez les canards, tandis que *C. gallinacea* est plus prévalente chez les poulets et les pintades. Le suivi sur une semaine a mis en évidence un nombre limité de lots de volailles très excréteurs, cependant des *Chlamydiaceae* ont été détectées dans la majorité des lots analysés. Tandis que le pouvoir zoonotique de *C. gallinacea* n'est pas clairement établi à ce jour, il est recommandé aux professionnels, par mesure de précaution, de porter des équipements de protection adéquats lors de la manipulation des volailles.

REMERCIEMENTS

Cette étude a reçu le soutien financier de l'Afsset (Airchlam EST-11-110), et nous remercions vivement

les deux abattoirs participants ainsi que le personnel volontaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Belchior E., Barataud D., Ollivier R., Capek I., Laroucau K., de Barbeyrac B., Hubert B., 2011. *Epidemiol. Infect.*, (139), 1637-1641.
2. Carlier L., Kempf M., Aaziz R., Jolivet-Gougeon A., Laroucau K., 2014. *JMM case reports*, (2014).
3. Christerson L., Blomqvist M., Grannas K., Thollessen M., Laroucau K., Waldenström J., Eliasson I., Olsen B., Herrmann B., 2010. *Environ. Microbiol. Rep.*, (2), 605-610.
4. Denamur E., Sayada C., Souriau A., Orfila J., Rodolakis A., Elion J., 1991. *J. Gen. Microbiol.*, (137), 2525-2530.
5. Dickx V., Geens T., Deschuyffeleer T., Tyberghien L., Harkinezhad T., Beeckman D. S. A., Braeckman L., Vanrompay D., 2010. *J. Clin. Microbiol.*, (48), 3244-3250.
6. Ehricht R., Slickers P., Goellner S., Hotzel H., Sachse K., 2006. *Mol. Cell. Probe.*, (20), 60-63.
7. Kaleta E.F., Taday E.M., 2003. *Avian Pathol.*, (32), 435-461.
8. Laroucau K., Vorimore F., Aaziz R., Berndt A., Schubert E., Sachse K., 2009a. *Infect. Genet. Evol.*, (9), 1240-1247.
9. Laroucau K., de Barbeyrac B., Vorimore F., Clerc M., Bertin C., Harkinezhad T., Verminnen K., Obeniche F., Capek I., Bébéar C., Durand B., Zanella G., Vanrompay D., Garin-Bastuji B., Sachse K., 2009b. *Vet. Microbiol.*, (135), 82-89.
10. Laroucau K., Aaziz R., Meurice L., Servas V., Chossat I., Royer H., de Barbeyrac B., Vaillant V., Moyen J.-L., Meziani F., Sachse K., Rolland P., 2014. *Euro. Surveill.*, in press.
11. Ménard A., Clerc M., Subtil A., Mégraud F., Bébéar C., de Barbeyrac B., 2006. *J. Med. Microbiol.*, (55), 471-473.
12. Pudjiatmoko, Fukushi H., Ochiai Y., Yamaguchi T., Hirai K., 1997. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, (47), 425-431.
13. Sachse K., Laroucau K., Riege K., Wehner S., Dilcher M., Huot-Creasy H., Weidmann M., Myers G., Vorimore F., Vicari N., Magnino S., Liebler-Tenorio E., Ruettger A., Bavoil P.M., Hufert F.T., Rosseló-Móra R., Marz M., 2014. *Syst. Appl. Microbiol.*, (37), 79-88.
14. Thomas V., Casson N., Greub G., 2006. *Environ. Microbiol.*, (8), 2125-2135.
15. Vorimore F., Hsia R., Huot-Creasy H., Bastian S., Deruyter L., Passet A., Sachse K., Bavoil P., Myers G., Laroucau K., 2013. *Plos ONE*, (8), e74823.
16. Vorimore F., Thebault A., Poisson S., Cléva D., Robineau J., de Barbeyrac B., Durand B., Laroucau K., 2014. *Path. Dis.*, in press.
17. Zocovic A., Vorimore F., Marhold C., Horvatek D., Wang D., Slavec B., Prentza Z., Stavrianis G., Prukner-Radovic E., Douc A., siarkou V. I., Laroucau K., 2012. *Environ. Microbiol.*, (14), 2212-2222.

Tableau 1. Résultats de détection des *Chlamydiaceae* par PCR sur l'ensemble des lots abattus durant une semaine dans les abattoirs A et B

Abattoir	Espèce	Nombre de lots analysés	Lots négatifs par PCR	Lots positifs par PCR	Dont lots moyennement à fortement positifs par PCR
A	Canard gras	23	8	15 (65%)	2 (9%)
	Canard maigre	15	7	8 (53%)	-
B	Poulet	20	7	13 (65%)	2 (10%)
	Chapon	-	-	-	-
	Pintade	8	3	5 (63%)	-
	Dinde	1	1	-	-
	Coq	1	1	-	-
	Poule	2	-	2 (100%)	-
	Poulet + Pintade	1	-	1 (100%)	1 (100%)

Tableau 2. Résultats sérologiques et de détection des *Chlamydiaceae* par PCR sur le personnel volontaire des abattoirs A et B

Abattoir	Sexe	Âge (années)	Ancienneté	Zone de travail	Signes cliniques		Résultats PCR		Immunofluorescence			
					J ₀	J ₃₀	<i>Chlamydiaceae</i>	<i>C. psittaci</i>	J ₀		J ₃₀	
									IgM	IgG	IgM	IgG
A	M	46	1998	Transport	Toux	-	Neg	Neg	Neg	< 16	Neg	32
	M	34	Nouveau (20 jours)	Abattage	Symptômes grippaux	ND ¹	Pos (Cq=32)	Pos (Cq=33)	Neg	< 16	ND	ND
	M	43	2010	Abattage	Toux	-	Neg	Neg	Neg	< 16	Neg	128
	M	29	2003	Maintenance	-	-	Neg	Neg	Neg	< 16	Pos	256
	M	49	2000	Abattage	Fièvre, toux	-	Neg	Neg	Neg	< 16	Neg	256
	M	25	2011	Maintenance	-	-	Neg	Neg	Neg	< 16	Pos	< 16
	M	51	1980	Abattage	-	-	Neg	Neg	Neg	< 16	Neg	256
	M	35	Nouveau (3 semaines)	Transport	-	-	Neg	Neg	Neg	< 16	Pos	< 16
	M	44	1991	Abattage	Symptômes grippaux	-	Neg	Neg	Neg	< 16	Neg	256
	M	30	10 ans (autre compagnie)	Transport	-	-	Pos (Cq=39)	Neg	Neg	< 16	Pos	< 16
B	M	30	2005	Abattage	-	-	Neg	Neg	Neg	< 16	Neg	128
	M	47	1982	Abattage	-	-	Neg	Neg	Neg	< 16	Neg	16
	F	58	2004	Abattage	-	-	Neg	Neg	Neg	< 16	Neg	16
	M	52	2000	Abattage	-	-	Neg	Neg	Neg	< 16	Neg	16
	F	36	Nouveau (3 mois)	Abattage	Fièvre	-	Neg	Neg	Neg	16	Neg	32
	M	35	Nouveau (2 mois)	Abattage	-	Mal de gorge	Neg	Neg	Neg	< 16	Neg	32

¹ ND : non réalisé