

**ABSENCE DE CONTAMINATION PROFONDE D'ŒUFS A COUVER DE DINDE
APRES CONTAMINATION EXPERIMENTALE EN SURFACE PAR
*CAMPYLOBACTER JEJUNI***

**Magras Catherine¹, Laroche Michel¹, Aubineau Thomas¹,
Watier Jean-Marie², Federighi Michel¹**

(1) UMR ENVN / INRA 1014, SECALIM, Ecole Nationale Vétérinaire,
BP 40706, 44307 NANTES cedex 3

(2) GRELIER, S.A. Elevage Avicole de la Bohardièrre, BP 1, 49290 Saint Laurent de la Plaine

Absence de contamination profonde d'œufs à couver de dinde après contamination expérimentale en surface par *Campylobacter Jejuni*

L'OMS considère les campylobacters comme la principale cause bactérienne de zoonoses alimentaires liées aux viandes de volailles. Une contamination verticale depuis les reproducteurs jusqu'aux volailles de chair, via l'œuf à couver, est souvent évoquée. Or, dans la filière dinde très peu de données sont disponibles sur une éventuelle contamination des œufs à couver. Le but de notre étude était de déterminer si la contamination des œufs de dinde par les fientes de la pondeuse pouvait être à l'origine d'une colonisation *in ovo* du tube digestif du futur dindonneau. Un total de 200 œufs de dinde, pondus depuis moins d'une heure, a été utilisé. La contamination par *C. jejuni* NCTC 11168, par immersion des œufs dans une suspension bactérienne d'environ 8 log UFC/mL, a été suivie dans différentes parties de l'œuf au cours du processus industriel d'accoupage, par détection après enrichissement sur géloses Karmali et Butzler, de *Campylobacter sp.* et identification par PCR-multiplex. Les résultats ont montré que *C. jejuni* est capable de survivre à la surface de la coquille (29/50) et de traverser les membranes coquillières (8/100) dans les 2 heures qui suivent la contamination. En revanche, la bactérie ne survit dans aucune partie de l'œuf après un jour de stockage dans les conditions ambiantes et 25 jours d'incubation (0/50). *C. jejuni* n'a pas été, dans nos conditions expérimentales, capable de coloniser les organes profonds du futur dindonneau de chair. En l'absence de données comparables, ces résultats méritent d'être confirmés mais l'œuf à couver de dinde n'apparaît pas comme un vecteur majeur de transmission de *C. jejuni* au dindonneau.

Summary

Campylobacter sp. is one of the most frequent bacterial cause of human enteritis with *Campylobacter jejuni* more commonly implicated than *C. coli*. *C. jejuni* is often found in digestive tract of chickens. However, for broiler flocks, modes of transmission of *Campylobacter sp.* are still poorly understood. A vertical transmission of *C. jejuni* from breeders flocks to the broiler farms via the egg is evocated. In turkey food chain few information is available about *Campylobacter* contamination of primary production, particularly about detection and survival of *Campylobacter* in turkey eggs. The purpose of the study was to improve our knowledge of the survival of *C. jejuni* in the different parts of the turkey eggs during a commercial processing of one day old turkey poults production. A total of two hundred freshly laid turkey eggs, contaminated by immersion in a 8 log CFU/ml *C. jejuni* NCTC 11168 suspension, was analyzed. Following an enrichment step, detection and identification of *C. jejuni* were attempted using both culture on Karmali and Butzler agar and multiplex-PCR. Results have shown that *C. jejuni* is able to survive on the shell surface for two hours after contamination (29/50) and to penetrate through the eggshell (8/100). However *C. jejuni* hasn't been recovered from inside the eggs when the eggs were kept one day at 18°C then incubated for 25 days (0/50). The absence of *C. jejuni* in digestive tract of newly hatched turkeys supports the notion that *Campylobacter* contamination of turkey eggs is unlikely to result in turkeys infected with *Campylobacter*.

INTRODUCTION

Les campylobacter thermotolérants sont la principale cause de toxi-infections alimentaires bactériennes dans les pays développés (OMS 2000). Si 4 espèces sont incriminées dans ces affections, la plus fréquente serait *C. jejuni* (entre 68 et 97 % des cas), la deuxième *C. coli* (entre 19 et 3%), *C. lari* et *C. upsaliensis* n'interviendraient que marginalement (Leclerc *et al.*, 2002, Vierikko *et al.*, 2004). L'aliment le plus incriminé est la viande de poulet, sur laquelle campylobacter est très souvent retrouvé à de fortes concentrations. La cause de la contamination des viandes est à rechercher en élevage de volailles de chair, puisque ces dernières sont fréquemment porteuses de la bactérie au niveau de leur tube digestif. Mais la part relative, des différentes sources de campylobacter identifiées, dans l'origine de la colonisation digestive des volailles n'est pas encore bien connue : l'environnement, la nourriture ou encore l'eau de boisson en élevage sont fréquemment évoqués. Une autre source potentielle de contamination des volailles de chair, bien que très discutée à ce jour, doit être aussi envisagée : la contamination de l'œuf, future volaille de chair, par ses géniteurs (Pearson *et al.* 1996, Cox *et al.*, 2002).

Si la transmission verticale de campylobacter (contamination du jaune pendant l'élaboration de l'œuf) est peu probable (Doyle 1984, Sahin 2003), en revanche, la contamination de l'œuf en surface par des fientes de la poudeuse contenant le germe (3 à 8 log UFC/g de fèces Cox *et al.* 2002, Sahin *et al.*, 2003) est envisageable (Doyle 1984). Elle a d'ailleurs été prouvée expérimentalement dans l'espèce poule, bien que dans des conditions de contamination très différentes des conditions naturelles d'une contamination de surface de la coquille par des fientes lors du passage dans le cloaque (Clark et Bueschkens 1985, 1986). La contamination de l'œuf se ferait alors essentiellement par une pénétration des campylobacters, fortement conditionnée par la température et l'âge de l'œuf (Doyle 1984, Clark et Bueschkens 1986, Allen *et al.*, 2001), car la contamination croisée des poussins dans l'incubateur à partir du matériel et des fluides (eau, air) semble improbable (Pearson *et al.*, 1996, Clark et Bueschkens 1985, 1986), notamment du fait de la faible résistance de *Campylobacter jejuni* aux conditions du milieu rencontrées dans le processus d'incubation : atmosphère aérobie, températures de 18°C à 37°C (Izat et Gardner 1988, Park 2002).

Si les données épidémiologiques sont nombreuses pour la filière poulet, il n'en est pas de même pour la filière dinde de chair. Pourtant les travaux existants montrent des prévalences de la contamination par *Campylobacter sp.* aussi bien des oiseaux en élevages commerciaux (77 à 80% à l'âge de 15 semaines, Cox *et al.*, 2000) que des carcasses (respectivement 90,3% et 41,3 % avant réfrigération ; USDA 1998, Logue *et*

al., 2003) de dinde, équivalentes à celles observées dans la filière poulet de chair. Les espèces de *Campylobacter sp.* isolées sont là encore majoritairement *C. jejuni* (Logue *et al.*, 2003, Van Looveren *et al.*, 2001) puis *C. coli* et plus rarement *C. upsaliensis* (Zhao *et al.*, 2001). Enfin les études sur une éventuelle transmission de campylobacter par l'œuf sont partielles, et ne permettent pas de montrer si campylobacter survit au processus industriel d'incubation des œufs de dinde à couver et peut de ce fait contaminer le jeune dindonneau de chair (Acuff *et al.*, 1982, Baker *et al.*, 1987).

Les objectifs de notre étude étaient de savoir si une contamination en surface par *Campylobacter jejuni* de l'œuf de dinde à couver pouvait engendrer, au cours du processus industriel classique d'incubation, une contamination en profondeur de cet œuf, et de ce fait, du dindonneau de 1 jour qui en est issu.

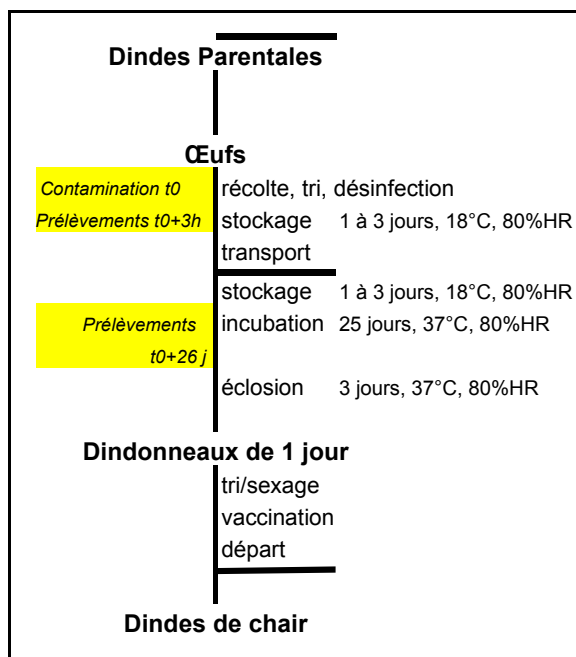
1. MATERIELS ET METHODES

Œufs et procédé de production des dindonneaux

L'étude a porté sur un total de 200 œufs, d'environ 90 g, sans fêlures ni salissures apparentes, pondus depuis moins d'une heure, issus d'un élevage de dindes reproductrices en fin de ponte (après la 15^{ème} semaine de ponte, âgées de 50-58 semaines), contaminés artificiellement par une souche de référence *C. jejuni* NCTC 11168. Le statut des dindes de l'élevage vis à vis de *Campylobacter sp.* a été déterminé par l'analyse bactériologique de 30 écouvillonnages cloacaux.

Le diagramme du procédé commercial de production des dindonneaux de 1 jour, analysé est représenté figure 1. Au total cinq séries d'analyses ont été réalisées. Une série se composait de 4 lots (**T**, **C**, **D** et **I**) de 10 œufs chacun. Le lot **T**, ou lot témoin de contamination initiale, correspondait à des œufs n'ayant subi ni la contamination artificielle, ni la désinfection ; le lot **C**, à des œufs contaminés artificiellement mais ne subissant pas ultérieurement la désinfection ; le lot **D**, à des œufs contaminés artificiellement, puis désinfectés 1 heure après leur contamination dans une armoire à fumigation à l'aide d'une solution de formaldéhyde à 15% et 10g de poudre de permanganate de potassium (durée de 20 minutes) ; le lot **I**, à des œufs contaminés artificiellement sans désinfection ultérieure, stockés dans l'élevage (18h de stockage, à 18°C +/- 3°C, 80% d'humidité relative), transportés au couvoir (durée 3h30) puis stockés au couvoir (6h, à 18°C +/- 3°C, 80% d'humidité relative) et incubés pendant 25 jours à une température moyenne de 38°C.

Figure 1 - diagramme du procédé commercial de production des dindonneaux de 1 jours - moments de la contamination et des prélèvements.



Inoculum

La contamination des œufs concernés a été effectuée en élevage juste après la récolte (t_0), par un trempage avec une agitation douce d'une minute environ dans une culture bactérienne en phase stationnaire en bouillon BHI. Les œufs ont été ensuite sortis et déposés dans les casiers d'incubation. L'excédent de l'inoculum formant une goutte sur l'extrémité la plus basse de l'œuf a été délicatement absorbé à l'aide d'une chiffonnette stérile. La concentration de la culture bactérienne a été estimée à *priori* à l'aide d'une échelle de Mac Farland, puis à *posteriori* déterminée par dénombrement. Elle variait de 7 à 8,7 log UFC/mL.

Prélèvements et analyses bactériologiques

Pour chaque série, le moment des prélèvements a été : $t_0 + 3h$ pour les œufs des lots **T**, **C** et **D** ; $t_0 + 26$ jours pour les œufs du lot **I**. Pour tous les lots (au total 50 œufs/lot), la surface de la coquille de chaque œuf analysé est massée dans 50 mL de bouillon Preston. Le vitellus pour le lot **T**, le vitellus et l'albumen pour les lots **C** et **D**, la coquille avec les membranes coquillières, les organes profonds du dindonneau (intestins ouverts, foie) pour le lot **I** étaient dilacérés à l'aide d'un appareil de type Stomacher en bouillon Preston. La détection des *Campylobacter sp.* a été réalisée, pour chaque prélèvement après un enrichissement de 24h de la suspension mère, suivi d'un ensemencement de 2 géloses sélectives, Karmali et Butzler, incubées à 42°C pendant 5 jours en atmosphère microaérophile (5% O₂, 10% CO₂, 85%

N₂). Les colonies suspectes ont été contrôlées après coloration de Gram et examen de la mobilité (état frais). Par prélèvement positif, un isolat a été réalisé et conservé à - 80°C. L'identification des isolats au rang des espèces *C. jejuni* et/ou *C. coli* a été effectuée par PCR-Multiplex (Van de Giessen *et al.* 1998). Les écouvillonnages cloacaux ont été analysés par pool de 5.

Un prélèvement a été déclaré positif lorsque, sur au moins une boîte, la présence de *Campylobacter sp.* a été constatée par la coloration de Gram et/ou par l'observation de l'état frais.

2. RESULTATS

Portage des dindes vis à vis de *Campylobacter sp.*

Sur les 6 pools de 5 écouvillonnages cloacaux analysés, 3 ont été détectés et déclarés positifs. L'espèce isolée dans les 3 cas était *Campylobacter jejuni*.

Les résultats des prélèvements sur les 200 œufs analysés sont synthétisés dans le tableau 1. Toutes les souches isolées ont été identifiées appartenant à l'espèce *Campylobacter jejuni*.

Tableau 1 - Nombres de prélèvements déclarés positifs (sur total analysé) en fonction de la nature des prélèvements et des lots.

	SC	V	V+A
T	0 / 50	0 / 50	/
C	29 / 50	/	5 / 50
D	0 / 50	/	3 / 50

	SC	C+MC	OP
I	0 / 50	0 / 50	0 / 50

Légendes : / = non analysé, SC : surface coquille, V : vitellus, V+A : Vitellus +Albumen, C+MC : coquille + membranes coquillières, OP : organes profonds ; lots : T=témoin de contamination initiale, C=contaminés sans désinfection, D=contaminés avec désinfection, I=contaminés, non désinfectés, incubés

Présence de *Campylobacter jejuni* en surface de la coquille mais pas dans les membranes coquillières

Bien que le lot de dindes ait été déclaré positif, aucun des œufs du lot **T** n'a été déclaré positif en surface de la coquille (0/50). A $t_0 + 3h$, 58% des œufs du lot **C** (29/50) ont été déclarés positifs mais aucun œuf du lot **D** (0/50). A $t_0 + 26$ jours, aucun œuf du lot **I** n'a été déclaré positif en surface de la coquille (0/50) mais également dans les prélèvements coquille et membranes coquillières (0/50). Les 29 isolats obtenus à partir des œufs du lot **C** ont été identifiés *C. jejuni*.

Absence de *Campylobacter sp.* initialement dans le vitellus

Aucun des 50 prélèvements vitellus des œufs du lot T n'a été déclaré positif.

Pénétration de *Campylobacter jejuni* dans l'œuf

Respectivement 10% (5/50) et 6% (3/50) des prélèvements, vitellus plus albumen, des œufs des lots C et D ont été déclarés positifs. Les isolats ont été identifiés *C. jejuni*.

Pas de contamination par *Campylobacter sp.* des organes profonds du dindonneau à 25 jours d'incubation

Aucun des prélèvements d'organes profonds des œufs du lot I (0/50) n'a été déclaré positif. Cependant 3 d'entre eux ont montré la présence de cocobacilles mobiles, à coloration de Gram négative.

Aucune influence de la contamination en surface de la coquille par *Campylobacter jejuni* sur la fertilité des œufs du lot I n'a été constatée.

3. DISCUSSION

La présence d'échantillons cloacaux positifs en campylobacters montre que le lot des dindes pondeuses des œufs de l'étude était contaminé par *C. jejuni*, néanmoins une contamination initiale par les matières fécales de la pondeuse, de la surface de la coquille des œufs à couver n'a pas été observée. Ceci peut être expliqué par la grande propreté des œufs à couver. En effet, même dans d'autres études où la prévalence estimée des pondeuses porteuses de campylobacter était plus élevée, l'absence de campylobacters à la surface des coquilles des œufs à couver étaient de la même façon observée (Acuff *et al.* 1982, Doyle 1984, Baker *et al.* 1987). Par ailleurs bien que l'effectif de l'étude soit limité (50 œufs) nous confirmons l'absence de formes viables cultivables de campylobacters dans le vitellus des œufs fraîchement pondus (Acuff *et al.* 1982, Doyle 1984, Sahin *et al.* 2003). La transmission verticale de *Campylobacter sp.* de la dinde à l'œuf à couver semble donc très peu probable. C'est pourquoi seule une contamination expérimentale des œufs permettait d'envisager le comportement et la survie éventuelle de *C. jejuni* sur et dans l'œuf à couver de dinde au cours du procédé commercial de production des

REMERCIEMENTS

F. Jugiau et F. Rama pour leur assistance technique ; aux personnels de l'élevage et du couvoir pour la mise en œuvre et le respect des contraintes hygiéniques associées à cette étude.

dindonneaux de 1 jours. Nos résultats montrent la capacité de *C. jejuni* à traverser la cuticule et à pénétrer dans le contenu de l'œuf de dinde. Néanmoins à l'instar de l'œuf de poule, il s'avère que la pénétration des bactéries dans l'œuf est limitée (8/100) et certainement conditionnée par le phénomène de succion (Doyle 1984, Clark et Bueschkens 1985, Sahin *et al.* 2003). Dans notre étude il peut être considéré que la pénétration s'est faite naturellement, sans l'action, par des conditions expérimentales, d'un choc thermique lors de l'inoculation. Une telle contamination nous semblant plus proche de celle qui pourrait se produire dans le cloaque au contact des matières fécales chaudes, il est alors important de constater d'une part la rapidité de la pénétration des campylobacters (avant la désinfection), et d'autre part, la confirmation de l'inefficacité de la désinfection appliquée dans le processus commercial, sur les campylobacters présents dans l'œuf, mais aussi de façon plus générale sur d'autres bactéries (Himathongkham *et al.*, 1999). Cependant, les résultats négatifs sur les œufs du lot Incubé montrent que *C. jejuni* ne survit pas dans l'œuf en incubation, et aucune contamination des organes digestifs (intestins, foie) du dindonneau n'a été observée. Les conditions de température couplées aux conditions de milieu (pH, facteurs anti-microbiens), rencontrées dans l'œuf de dinde incubé sont donc comme celles de l'œuf de poule non favorables (Acuff *et al.* 1982, Sahin *et al.* 2003, Clark et Bueschkens 1986) à une multiplication de *C. jejuni*, voire à sa survie et/ou au maintien de son aptitude à cultiver sur milieu gélosé.

CONCLUSION

La contamination expérimentale en surface de la coquille d'œufs de dinde à couver par *C. jejuni* a permis le suivi de cette contamination au cours d'un procédé commercial de production des dindonneaux de 1 jour. Une contamination au moment de la ponte ou peu après, autorise la pénétration dans le contenu de l'œuf de *C. jejuni* dans l'heure qui suit. Mais les conditions ultérieures de stockage et d'incubation des œufs à couver empêchent la survie du germe sur et dans la coquille jusqu'à l'éclosion, ainsi que la colonisation des organes digestifs (intestins, foie) du futur dindonneau. Comme pour l'espèce *Gallus*, l'éventuelle transmission verticale de *C. jejuni* de la dinde vers le vitellus de l'œuf n'a pas été montrée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acuff G. R., Vanderzant C., Gardner F.A., Golan F.A., 1982. J. Food Prot. 45: 1279-1281.
- Allen K.J., Griffiths M.W., 2001. J. Food Prot. 64: 2058-2062.
- Baker R.C., Paredes M.D.C., Qureshi, R.A. 1987. Poult. Sci. 66: 1766-1770.
- Berrang M.E., Smith D.P., Windham W.R., Feldner P.W., 2004. J. Food Prot. 67: 235-238.
- Clark A.G., Bueschkens D.H., 1985. Appl. Environ. Microbiol.. 49: 1467-1471.
- Clark A.G. Bueschkens D.H., 1986. J. Food Prot. 49: 135-141.
- Cox N.A., Stern N.J., Craven S.E., Berrang M.E., Musgrove M.T., 2000. J.Appl.Poult.Res. 9: 542-545.
- Cox N.A., Stern N.J., Hiatt K.L., Berrang M.E., 2002. Avian Dis 46: 535-41.
- Doyle M.P., 1984. Appl.Env.Microb. 47: 533-536.
- Leclerc V., Dufour B., Lombard B., Gauchard F, Garin-Bastuji B., Salvat G., Brisabois A., Poumeyrol M., De Buyser M-L., Gnanou-Besse N., Lahellec C., 2002. Livestock Prod. Sci., 76: 195-202.
- Izat A.L., Gardner F.A.. 1988. Poult.Sci.. 67: 1431-1435.
- Himathongkham S.H., Riemann H., Ernst R., 1999. Int. J. Food Microbiol. 49(3): 161-167.
- OMS, 2000. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/fr/>
- Logue C. M., Sherwood J. S., Elijah L.M. Olah P.A., Dockter M.R., 2003. J Appl Microbiol 95: 234-241.
- Park S.F. 2002. Int. J. Food Microb. 74: 177-188.
- Pearson A., Greenwood M.H., Feltham R.K., Healing T.D., Donaldson J., Jones D.M., Colwell R.R., 1996. Appl. Environ. Microbiol. 62: 4614-4620.
- Sahin, O., Kobalka P., Zhang Q., 2003. J Appl Microbiol 95: 1070-1079.
- USDA. 1998. <http://www.fsis.usda.gov/OPHS/baseline/contents.htm>
- Van de Giessen A.W., Tilburg J.J., Ritmeester W.S., van der Plas J., 1998. Epidemiol Infect 121: 57-66.
- Van Looveren, M., Daube G., De Zutter L., Dumont J-M., Lammens C., Wijdooghe M., Vandamme P., Jouret M., Cornelis M., Goossens H., 2001. J. Antimicrob. Chemother. 48: 235-240.
- Vierikko A., Hanninen M.L., Siitonen A., Ruutu P., Rautelin H., 2004. Emerg. Infect. Dis., 10, 127-130.
- Zhao C., Ge B., De Villena J., Sudler R., Yeh E. Zhao S., White D.G., Wagner D., Meng J., 2001. Appl. Environ. Microbiol. 67: 5431-5436.