

# *Campylobacter coli* et *jejuni* dans la filière poulet de chair au Maroc

R. ASMAI<sup>1</sup>, K. ES-SOUCRATTI<sup>2</sup>, A. HAMMOUMI<sup>2</sup>, B. KARRAOUAN<sup>3</sup>, H. KARIB<sup>4</sup>, R. TRIQUI<sup>4</sup>, B. BOUCHARIF<sup>2</sup>

(Reçu le 23/03/2021; Accepté le 27/03/2021)

## Résumé

Le tube digestif des animaux de boucherie et de la volaille constitue un réservoir majeur des *Campylobacter* qui représentent l'une des principales causes de maladies diarrhéiques au niveau mondial. La présente étude a consisté en une analyse de 102 souches de *Campylobacter jejuni* (CJ) isolées des fientes fraîches de poulet de chair au niveau du marché du gros de Casablanca, et de 75 souches de *Campylobacter coli* (CC) isolées à partir de prélèvements cloacaux de poulet de chair des fermes avicoles dans la région de Marrakech – Safi. La prévalence notifiée de *Campylobacter* spp. des deux études réalisées au marché de gros de Casablanca et dans les élevages de poulet de chair à Marrakech -Safi est respectivement: 73% (102/140) et 71,4% (75/105). Les résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques de CJ et CC respectivement sont: 85% - 100% à l'ampicilline, 61,4% - 65% à l'acide clavulanique, 100% - 86% à la tétracycline, 77% à la ciprofloxacine, 12% - 9% à la gentamycine et 97% - 100% à l'érythromycine. L'objectif de cet article est de présenter une synthèse des connaissances sur la résistance de *Campylobacter* dans la filière poulet à travers les souches isolées provenant du marché de gros à Casablanca et des fermes de poulet de chair dans la région de Marrakech-Safi.

**Mots clés:** *Campylobacter*; résistance aux antibiotiques, poulet de chair, Maroc

## *Campylobacter coli* and *jejuni* in the chicken in Morocco

### Abstract

The digestive tract of birds and animals represents a major reservoir of *Campylobacter* species which are among the main causes of diarrheal diseases worldwide. The present study consisted in analyzing 102 strains of *Campylobacter jejuni* (CJ) isolated from fresh broiler chicken droppings in the wholesale market of Casablanca, and from 75 strains of *Campylobacter coli* (CC) isolated from broiler chicken cloacal samples in the area of Marrakech – Safi. The reported prevalences of *Campylobacter* spp. in the studies carried out at the wholesale market of Casablanca and in the broiler chicken farms of the area of Marrakech -Safi were: 73% (102/140) and 71.4% (75/105) respectively. Results of antibiotic sensitivity tests of CJ et CC were: 85% - 100% to ampicillin, 61.4% - 65% to clavulanic acid, 100%-86% to tetracycline, 77% to ciprofloxacin, 12%-9% to gentamycin and 97% - 100% to erythromycin. The aim of the present study was to present a knowledge synthesis of antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. in the broiler meat sector through the strains isolated obtained from the wholesale market of Casablanca along with the broiler farms in the area of Marrakech-Safi.

**Keywords:** *Campylobacter*; antibiotic resistance, broiler chickens, Morocco

## INTRODUCTION

Les *Campylobacter* sont considérés comme la cause principale de gastro-entérites bactériennes dans le monde (Altekruse *et al.*, 1999). La campylobactériose est une zoonose transmise à l'homme par les animaux ou les produits qui en dérivent (Altekruse *et al.*, 1999).

Des chercheurs de «l'Institut des Pathogènes Émergents» (EPI) de l'université de Floride aux États-Unis se sont intéressés aux Maladies Infectieuses d'Origine Alimentaire (MIOA). Ils ont estimé que 31 pathogènes véhiculés par les aliments sont responsables de 9,4 millions de cas d'infections humaines chaque année aux États-Unis, conduisant à 55961 hospitalisations et 1351 décès (Messaoudi *et al.*, 2013). Parmi tous ces cas, 59% sont associés à des virus, 39% à des bactéries et 2% à des parasites. Parmi les virus, les norovirus sont impliqués dans 58% des cas et pour les bactéries, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. et *Clostridium perfringens* occupent les trois premières places du classement (Messaoudi *et al.*, 2013).

*Campylobacter* est considérée comme la bactérie zoonotique la plus abondante au sein de l'union européenne. En effet, 190 566 cas d'infections à *Campylobacter* ont été reportés en 2008 (Messaoudi *et al.*, 2013).

Même si les bactéries du genre *Campylobacter* sont retrouvées dans le mucus intestinal de la plupart des animaux de boucherie (bovins, porcins, petits ruminants) et de compagnie (chats et chiens), le réservoir aviaire reste prédominant

du fait du taux de portage élevé et de la charge bactérienne par gramme de matières fécales, pouvant atteindre 10<sup>7</sup> UFC/g (Messaoudi *et al.*, 2013).

Une recrudescence de la résistance de souches de *Campylobacter* spp. aux antibiotiques, notamment aux quinolones (acide nalidixique) et aux fluoroquinolones (enrofloxacin) a été observée (Mégraud *et al.*, 2004; Dermott *et al.*, 2009).

L'objectif de cette étude a été d'évaluer la prévalence de *Campylobacter jejuni* et *coli* issus de poulets de chair et le risque inhérent en santé publique. De même, le profil d'antibiorésistance a été aussi déterminé pour les souches de *Campylobacter* isolées.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### Marché de gros de Casablanca

Un total de 140 prélèvements de fientes fraîches de poulet de chair ont été réalisés par un technicien d'élevage qualifié. Ces prélèvements ont été placés dans des sachets stériles et transportés au laboratoire dans une glacière isotherme, puis analysés dans les deux heures qui suivent le prélèvement.

L'étude a été réalisée sur une période de huit mois (février – septembre, 2017) à raison de quatre prélèvements par mois (n=140 échantillons de fientes de poulet de chair) pendant laquelle nous avons isolé et identifié les souches de *Campylobacter* dans le laboratoire de microbiologie des aliments et de l'environnement de l'Institut Pasteur du Maroc.

<sup>1</sup> Office National de la Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires, Région Marrakech-Safi, Marrakech, Maroc

<sup>2</sup> Département de Biologie, Faculté des sciences Ain Chock, Université Hassan II, Casablanca, Maroc

<sup>3</sup> Laboratoire de microbiologie des aliments et de l'environnement, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Maroc

<sup>4</sup> Unité d'Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale, Département de Pathologie et Santé Publique Vétérinaires, IAV Hassan II, Rabat, Maroc

## Fermes d'élevage de poulet de chair de la région de Marrakech-Safi

L'étude a été réalisée sur une période s'étalant de Mai à Décembre, 2017 (8 mois) à raison de sept prélèvements par ferme d'élevage de poulet de chair dans la région de Marrakech-Safi. L'étude a concerné un nombre de 15 fermes (le nombre d'individus varie entre 5000 et 10 000 par ferme, avec un âge compris entre 2 et 4 semaines). Les prélèvements ont donc consisté en 105 écouvillons cloacaux. Nous avons isolé et identifié les souches de *Campylobacter* dans le laboratoire de microbiologie des aliments et de l'environnement de l'Institut Pasteur du Maroc.

### *Campylobacter*

L'isolement de *Campylobacter* a été effectué après enrichissement selon la norme NM ISO / TS 10272-3 (2013): Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Campylobacter* spp., Méthode semi-quantitative.

Brièvement, 2 ml de suspension d'écouvillons cloacaux et 1g de fientes de poulets de chair ont été transférés dans 9 ml de bouillon de base d'enrichissement Preston (CM 0067 Oxoid, Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, UK) contenant un facteur de croissance (SR 0232E Oxoid, Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, UK) and 7% (v/v) du sang de mouton défibriné.

L'incubation a été réalisée dans une jarre avec un générateur d'une atmosphère microaérophile (5% d'oxygène, 10% de dioxyde de carbone, 85% d'azote) de type CAMPYGen (CN0025A Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) pendant 24 heures à 42°C.

Après enrichissement, chaque échantillon a été directement ensemencé sur une gélose de base sélectif de *Campylobacter* (Oxoid Ltd., Basingstoke, Angleterre) contenant 5% du sang de mouton frais stérile défibriné et *Campylobacter* supplément III (Sigma, St. Louis, MO, USA) pour l'isolement primaire.

Les milieux gélosés ont été ensuite incubés à 37°C pendant 72 heures dans des jarres contenant une atmosphère microaérophile dans les conditions déjà décrites. Les isolats caractéristiques ont été confirmés *Campylobacter* spp. par des tests biochimiques (test d'oxydase, test de catalase, test d'hydrolyse d'hippurate), motilité, examen microscopique et une coloration de Gram. Tous les isolats ont été stockés à -80°C dans un bouillon *Brucella* (*Thermo Fisher Scientific*, Milan, Italie) jusqu'à leur utilisation.

La confirmation génique du genre *Campylobacter* a été réalisée par PCR d'un fragment spécifique du gène *rRNA* 16S, à l'aide d'amorces, décrites par Linton *et al.* (1996), d'un

fragment d'ADN de 816 pb. *Campylobacter Jejuni* ATCC 33560 est utilisée comme contrôle positif et *Escherichia coli* VA517 comme témoin négatif. Toutes les réactions PCR contenaient 2,5 µl de modèle d'ADN, 0,2 µM de chaque amorce, 0,2 mM de dNTP (PROMEGA), 5X Taq DNA polymérase buffer, et 1.0 U of Taq DNA polymérase (Invitrogen), dans un volume de réaction finale de 25 µl. Le protocole PCR pour l'identification du genre était le suivant: 5 minutes à 95°C, 35 cycles composés de 1 min à 95°C, 1 min à 55°C, 1 min à 72°C, et une étape finale de prolongation de 10 minutes à 72°C. Toutes les réactions d'amplification de l'ADN ont été effectuées dans un Thermo-cycler Dyad Disciple (BIO-RAD).

### Génotypage

L'ADN a été extrait par la méthode rapide (boiling-prep) adaptée à des petits volumes: les colonies prélevées à partir d'une culture fraîche de 18 à 24 heures sur gélose nutritive TCS (Tryptone Caséine Soja) sont mises en suspension dans 500 µL d'eau biologie moléculaire, lysées par action thermique dans une eau bouillante pendant 10 minutes, suivi d'une centrifugation à 12000 rpm pendant 5 minutes, on récupère le surnageant qu'on stocke à -20 °C jusqu'à l'utilisation.

Toutes les souches de *Campylobacter* recueillies dans la présente étude, ont été testées pour la recherche du gène spécifique au sérotype *jejuni* et *coli* utilisant les amorces décrites au Tableau 1. Le protocole utilisé pour la réalisation de la PCR, utilisant les amorces spécifiques déjà décrites est le suivant: une dénaturation initiale d'une minute à 95°C suivie de 30 cycles, une dénaturation de 45 sec à 95°C, hybridation de 30 sec à 57°C, élongation de 72°C à 45 sec et extension finale à 72°C pendant 10 min. Le produit de PCR est analysé par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%. *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 et *Campylobacter coli* ATCC 33876 ont été utilisées comme contrôle positif et *Escherichia coli* VA517 comme témoin négatif (Stonnet *et al.*, 1996; Manel *et al.*, 2018).

### Résistance aux antibiotiques

Le test de sensibilisation aux antibiotiques a été réalisé par la méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton de disques d'antibiotiques (BIORAD). L'interprétation des résultats a été faite selon les règles et les recommandations du Comité d'antibiogramme de la Société française de microbiologie (Jehl *et al.*, 2020). Les antibiotiques suivants ont été testés: ampicilline (10 µg); ampicilline+acclavulanique (20 µg/10µg), tétracycline (30 µg), ciprofloxacine (5 µg); érythromycine (15 µg) et gentamycine (10 µg).

**Tableau 1: Séquence des amorces utilisées pour l'identification *Campylobacter* spp. et les tailles d'amplicons attendus**

Espèce	Séquence (5'/3')	Amplicon (pb)	Tm (°C)	Référence
<i>Campylobacter</i> spp.	GGATGACACTTTTTGGAGGC CATTAGCACGTGTGTC	816	55	Linton <i>et al.</i> , 1996
<i>Campylobacter jejuni</i>	GAATGAAATTTTAGAATGGGG GATATGTATGATTTTATCCTGC	358	57	Manel <i>et al.</i> , 2018
<i>Campylobacter coli</i>	ATATTTCCAAGCGCTACTCCCC CAGGCAGTGATAGTCATGGG	258	57	Stonnet <i>et al.</i> , 1996

## RÉSULTATS

### Prévalence de *Campylobacter*

Sur les 140 échantillons de fientes fraîches de poulet de chair prélevés au marché de gros de Casablanca et analysés, 102 souches de *Campylobacter* ont été isolées, soit un pourcentage d'isolement de 73% (102/140). L'amplification génique réalisée, utilisant les amorces spécifiques déjà décrites, ont permis d'identifier 41 souches appartenant à l'espèce *Campylobacter jejuni* soit un pourcentage de 40,2% (41/102). Les résultats pour les échantillons prélevés durant la saison chaude font état d'environ 40% de cas positifs à *Campylobacter* en comparaison aux échantillons analysés durant la période hivernale (8% de cas positifs) (Figure 1).

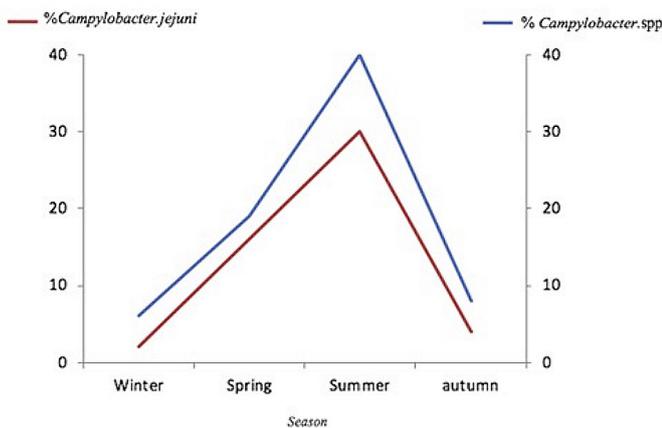


Figure 1: Prévalence de *Campylobacter spp.* et *jejuni* isolés des fientes de poulet de chair au niveau du marché de gros de Casablanca en fonction des saisons

Pour la partie de l'étude réalisée dans les fermes d'élevage de poulet de chair de la région de Marrakech-Safi, sur 105 écouvillons cloacaux prélevés, 75 souches de *Campylobacter* ont été isolées, soit un pourcentage d'isolement de 71,4% (75/105). L'amplification génique réalisée utilisant les amorces spécifiques déjà décrites ont permis d'identifier 42 souches appartenant à l'espèce *Campylobacter coli* soit un pourcentage de 56 % (Figure 2).

Les résultats des échantillons prélevés durant la saison chaude (Mai – Aout) montrent un taux de cas positifs de *Campylobacter* plus élevé par rapport aux échantillons prélevés et analysés durant la période hivernale (Figure 2).

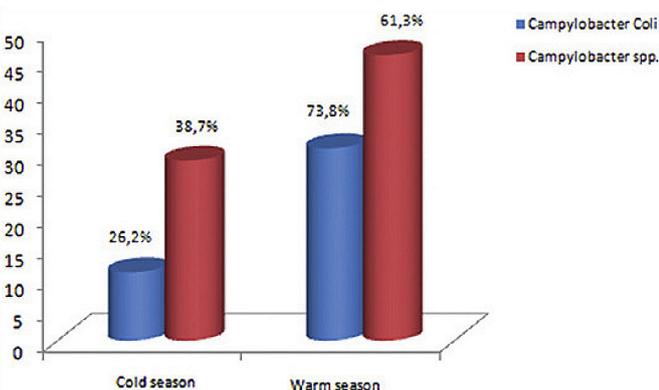


Figure 2: Prévalence de *Campylobacter spp.* et *Campylobacter coli* isolés des prélèvements d'écouvillons cloacaux de poulet de chair dans la région de Marrakech-Safi en fonction des saisons

### Résistance aux antibiotiques

La détermination du phénotype de résistance a été obtenue par la méthode de diffusion *vis-à-vis* de 6 antibiotiques testés, selon les recommandations du CA-SFM (Jehl *et al.*, 2020).

La multi-résistance (MDR) a été définie comme la non-sensibilité acquise à au moins un agent dans trois ou plusieurs catégories d'antimicrobiens (Magiorakos *et al.*, 2012). Pour les souches de *Campylobacter jejuni* isolées des fientes fraîches de la volaille au marché du gros de la volaille à Casablanca, les résultats ont montré que 98% des souches étaient résistantes à au moins un antibiotique testé, alors que 51,3 % de l'ensemble des souches testées présentaient une multi-résistance  $\geq 3$  antibiotiques (Tableau 2).

Pour les souches de *Campylobacter coli* isolées des 15 fermes d'élevage de poulets de chairs dans la région de Marrakech -Safi, les résultats de l'antibiogramme ont montré que 100% des souches sont résistantes à au moins un antibiotique testé, alors que 95% des souches testées présentent une multi-résistance  $\geq 3$  antibiotiques (Tableau 2).

Tableau 2: Résistance aux antibiotiques des souches de *Campylobacter jejuni* et *coli*

Antibiotiques	Pourcentage de résistance	
	<i>Campylobacter Jejuni</i> (n=41)	<i>Campylobacter Coli</i> (n=42)
Ampicilline	85%	100%
Amoxicilline + ac.Clavulanique	61,4%	65%
Tétracycline	100%	86%
Gentamycine	12%	9%
Erythromycine	97%	100%
Ciprofloxacine	77%	77%

## DISCUSSION

### *Campylobacter*

Les rares études d'évaluation quantitative des risques disponibles sur le couple *Campylobacter*/poulet menées dans différents pays, mettent souvent l'accent sur l'efficacité des moyens physiques et chimiques d'élimination de cet agent zoonotique après le maillon élevage (Rosenquist *et al.*, 2006).

L'étude menée au niveau du marché de gros de volaille de Casablanca sur les *Campylobacter* isolés des fientes fraîches de la volaille a montré une prévalence de 73%. Nos résultats sont proches de ceux enregistrés en France en 2008 avec un taux de 76,1%, au Royaume-Uni avec 75,3% et en Italie avec 63,3% respectivement (EFSA, 2010).

Les résultats des PCR utilisant les amorces spécifiques montrent un taux de 41,6% de *Campylobacter jejuni* portant la même taille de bande (358 pb) par rapport à la souche de référence *Campylobacter jejuni* ATCC 4378. Cette prévalence (73%) reste modérée par rapport aux résultats obtenus dans différentes études similaires dans plusieurs pays. En effet, des études publiées sur la recherche de *Campylobacter* d'origine aviaire au Brésil ont révélé une prévalence de 100%, au Costa Rica de 80%, et au Sri Lanka de 63,8%. (Giacomelli *et al.*, 2014, Kalupahana *et al.*, 2018).

L'étude menée dans la région de Marrakech-Safi a mis en évidence la prévalence de *Campylobacter* spp., plus spécifiquement *Campylobacter coli*, dans les élevages de poulet de chair. Parmi les 105 échantillons (provenant de poulets de chair âgés de 2 à 4 semaines) analysés, 71,4% (75/105) étaient positifs pour *Campylobacter* spp.

Toutes les souches de *Campylobacter* spp. confirmées par des tests de microbiologie et de biochimie ont été criblées par PCR conventionnelle, en utilisant les amorces spécifiques de *Campylobacter coli*. Les résultats ont montré que 56% (42/75) de ces souches portaient la même taille de bande (258 pb) par rapport à la souche de référence *Campylobacter Coli* ATCC 4378.

### Résistance aux antibiotiques

La détermination du profil d'antibiorésistance des *Campylobacter* à 6 antibiotiques différents réalisé sur des colonies de *Campylobacter* cultivées sur le milieu Columbia avec du sang (milieu sans additifs ni antibiotiques), a montré que les bactéries (*Campylobacter jejuni* et *coli*) étaient particulièrement résistantes aux fluoroquinolones avec 77% de souches résistantes en particulier à la ciprofloxacine, l'antibiotique de choix pour le traitement des gastroentérites chez les adultes. Selon un rapport de l'OMS (WHO, 2001), l'apparition des résistances à ces antibiotiques chez les souches animales et humaines de *Campylobacter* daterait du traitement curatif des animaux de production en 1987 par l'enrofloxacin.

Depuis, la fréquence des souches résistantes aux quinolones serait en constante augmentation. Des résultats similaires avec un taux très élevé (90%) de résistance de *Campylobacter*; isolés de la volaille, aux fluoroquinolones, ont été signalés en Algérie (Laidouci et al., 2013). Dans cette étude, une forte proportion de *Campylobacter coli* (100%) a résisté aux effets de l'érythromycine, résultats similaires à ceux décrits par Laidouci et al., (2013). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Office International des épizooties (OIE) ont élaboré en 2015, un plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens. À cet effet, il serait souhaitable d'instaurer une surveillance et un dépistage systématiques au Maroc de ce germe, en particulier en vue de déterminer sa prévalence et les variations de résistance aux différents antibiotiques.

### CONCLUSION

Le poulet de chair a été identifié comme principal véhicule des *Campylobacter* thermophiles dans la chaîne alimentaire. Dans cette étude, il a été constaté qu'une très forte proportion de souches de *Campylobacter* spp. de 73 et 71,4% respectivement, ont été isolées au marché de gros et au niveau de différentes fermes à Marrakech-Safi. Les résultats de la résistance aux antibiotiques ont montré une très forte proportion (plus de 77%) de résistante aux fluoroquinolones, en particulier à la ciprofloxacine, à la tétracycline (plus de 86%) et à l'érythromycine (plus de 97%). La connaissance de la prévalence de *Campylobacter* spp. au niveau des élevages de poulet de chair est nécessaire en vue d'évaluer les niveaux de contamination qui seraient attendus au niveau des carcasses, des découpes, et de manière ultime au niveau des plats prêts à consommer.

### RÉFÉRENCES

- Altekruse F., Stern J., Fields P., Swerdlow D. (1999). *Campylobacter jejuni* – an emerging food borne pathogen. *Emerg. Infect. Dis.*, 5:28-35.
- EFSA (2010). The community summary report on trends and sources of zoonoses. Zoonotic agents and foodborne outbreaks in the European Union. *EFSA J.*, 8:1496-906.
- Giacomelli M., Salata C., Martini M., Montesissa C., Piccirillo A. (2014). Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from poultry in Italy. *Microb. Drug Resist.*, 20:181-188.
- Jehl F. (2020). Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie Recommandations 2020 V.1.1 Avril.
- Kalupahana R.S., Mughini-Gras L, Kottawatta S.A., Somarathne S., Gamage C., Wagenaar J.A. (2018). Weather correlates of *Campylobacter* prevalence in broilers at slaughter under tropical conditions in Sri Lanka. *Epidemiol. Infect.*, 146:972-979.
- Laidouci H.A., Mouffok F., Hellal A. (2013). Recherche de *Campylobacter* dans la volaille en Algérie: Etude du profil d'antibiorésistance. *Revue Méd. Vét.*, 164: 307-311.
- Linton D., Owen R. J., Stanley J. (1996). Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. *Research in Microbiology*, 147:707-718.
- Magiorakos A. P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M. E., Giske C. G., Harbarth S., Hindler J. F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D. L., Rice L. B., Stelling J., Struelens M. J., Vatopoulos A., Weber J. T., Monnet D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.*, 18: 268-281.
- Manel G., Béjaoui A., Ben Hamda C., Jouini A., Ghedira K., Zrelli C., Amrouni S., Aouadhi C., Bessoussa G., Ghram A., Maaroufi A. (2018). Prevalence and antibiotic resistance patterns of *Campylobacter* spp. isolated from broiler chickens in the north of Tunisia. *Biomed. Res. Int.*, 7943786.
- Mégraud F., Prouzet-Mauléon V. (2004). Evolution de la résistance des *Campylobacter* aux antibiotiques en France 1986-2002. *Rapport B.E.H.*: 32-33.
- Messaoudi S., Manai M., Federighi M., Dousset X. (2013). *Campylobacter* dans la filière poulet: étude bibliographique des stratégies de maîtrise au stade de l'élevage. *Revue Méd. Vét.*, 164:90-99.
- Rosenquist H., Sommer M., Nielsen N.L., Christensen B.B. (2006). The effect of slaughter operations, on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. *Int. J. Food Microbiol.*, 108: 226-232.
- Stonnet V., Sicinschi L., Mégraud F. (1995). Rapid detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from clinical specimens using the polymerase chain reaction. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 14: 355-359.
- WHO (2001). Global strategy for containment of antimicrobial resistance. World Health organization, 2001, 99 pages.