

## Adhérence de *Campylobacter* inoculés en surface de muscle *Rectus abdominis* de bovin.

MAGRAS C. (1, 2, 3), JAÏ M. (1, 2), LAROCHE M. (1, 2)

(1) ONIRIS, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique, site de la Chantrerie, Route de Gachet, BP 40706, 44307 Nantes cedex 3, France

(2) UMR INRA 1014 Secalim,

(3) Université Nantes Angers Le Mans

### RESUME

L'adhérence des bactéries aux surfaces est un élément clef de l'appréciation des risques tout au long de la chaîne alimentaire. *Campylobacter*, premier agent de zoonoses alimentaires, pourrait être un indicateur de la contamination « fécale » de surface des carcasses à l'abattoir. Notre objectif est de modéliser son niveau d'attachement à la surface de muscles après une contamination puis un rinçage superficiel mimant des conditions proches de celles observées dans le procédé d'abattage. Un modèle expérimental a été construit en utilisant 2 *C. coli* et 2 *C. jejuni* et des durées de contact de 10 min ou 2 h. Les résultats des 101 échantillons composant les trois compartiments du modèle (matrice, rinçat, agar) ne montrent pas un comportement d'attachement sur les deux matrices différent entre les espèces, *jejuni* et *coli*. Le rinçage réduit partiellement et de façon variable (nature de la matrice et mode de contamination) la population de *Campylobacter*. Le rinçage conduit à une dispersion des bactéries sur une surface plus large. L'effet du temps de contact et l'inactivation potentielle des bactéries restantes doivent être précisés.

## Adhesion of *Campylobacter* inoculated on bovine *Rectus abdominis* muscle surface

MAGRAS C. (1, 2, 3), JAÏ M. (1, 2), LAROCHE M. (1, 2)

(1) ONIRIS, Nantes-Atlantic National College of Veterinary Medicine, Food Science and Engineering, site de la Chantrerie, Route de Gachet, BP40706, 44307 Nantes cedex 3, France

### SUMMARY

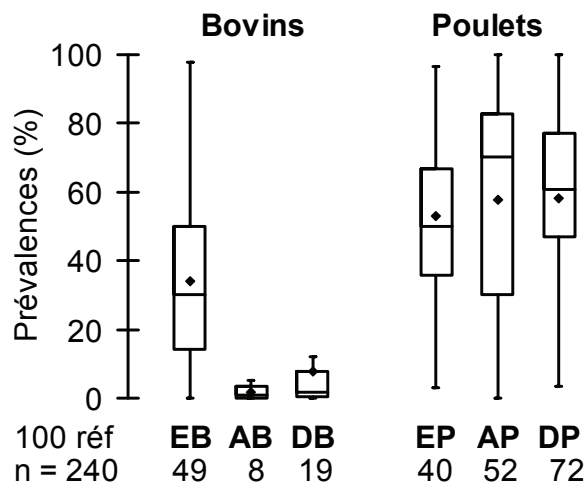
Attachment of hazardous bacteria to meat matrices and food-associated surfaces is thought to play an important role in meat product contamination. *Campylobacter* is involved in the majority of food-borne bacterial zoonoses and can be considered as an indicator of digestive content contamination of the meat surface that occurs during the slaughtering process. An experimental model was developed in order to assess the bacterial attachment and effect of simple decontamination treatment, water washing, on bacteria (attachment, spreading). The results of the 101 samples composed of three compartments (water, agar, matrice) each from two meat matrices enabled us to work out three variables calculated from bacterial counts of the different compartments. Water washing partially and variably reduces the *Campylobacter* population and leads to a dispersion of contaminants. No difference of *C. jejuni* and *C. coli* bacterial attachment was observed. The effect of contact time and treatment on bacterial viability has to be improved.

### INTRODUCTION

L'analyse scientifique des risques sur la chaîne alimentaire de l'exposition du consommateur à des viandes contaminées par des dangers bactériens doit envisager deux aspects : le transfert des bactéries depuis leur réservoir ou des sources secondaires (matrices inertes tels que des matériels) vers la viande et la survie de ces bactéries sur cette matrice alimentaire complexe. Or il apparaît de plus en plus que ces deux phénomènes sont dépendants de la nature de la matrice et du niveau d'attachement des bactéries à la surface de la matrice (Warriner *et al.*, 2001). Le niveau d'attachement entre deux éléments en contact s'étudie en termes d'**adhésion** - c'est-à-dire l'aspect statique et irréversible décrivant l'ensemble des phénomènes physico-chimiques qui se produisent - et d'**adhérence** - c'est-à-dire l'aspect dynamique et réversible décrivant l'ensemble des forces qui s'exercent. Ainsi l'adhérence des bactéries aux matrices peut amplifier les risques de transfert et de contaminations croisées. Si les travaux concernant l'adhésion de bactéries à des surfaces inertes sont nombreux (biofilms), ils ne concernent que très rarement *Campylobacter*. Or cette bactérie a été mise en évidence sur des surfaces inertes (Cools *et al.*, 2005 ; Grosspietsch *et al.*, 2006). Il a même été observé des capacités de transfert entre des matrices carnées de volailles et des matrices inertes (Fravalo *et al.*, 2009) voire des capacités d'attachement variables entre des souches de *Campylobacter* et dépendantes de facteurs extrinsèques (temps de contact et température, Nguyen *et al.*, 2010).

Les viandes de volailles sont classiquement incriminées comme la source d'introduction dans la cuisine du consommateur de *Campylobacter*, *jejuni* et *coli*, responsables de la zoonose alimentaire la plus fréquente en Europe, mais cette bactérie est aussi un danger alimentaire avéré associé aux viandes bovines (Waret *et al.*, 2008). En effet, le réservoir « bovin » de campylobacters n'est pas des moindres comme le montre l'analyse comparée des données issues de la littérature décrivant la fréquence de contamination en élevage, à l'abattoir et au stade de la distribution, dans les filières poulet de chair et bovins de boucherie (figure 1, à partir de 100 références publiées entre 2000 et 2009 et considérant un minimum de 30 prélèvements). Néanmoins si le portage individuel animal existe avec une prévalence comparable au niveau de l'élevage, des différences marquées à et après l'abattage s'observent. La nature des opérations unitaires d'abattage et leur maîtrise conditionnent certainement ces différences. Il est en effet aujourd'hui établi que la contamination primaire des viandes par *Campylobacter* se réalise, lors d'une maîtrise insuffisante de certaines opérations d'abattage, par un transfert des bactéries depuis le réservoir digestif des animaux vers la surface des masses musculaires encore chaudes des carcasses. Des contaminations secondaires ou contaminations croisées à partir de sources secondaires telles que les surfaces inertes de matériels et de carcasses contaminés amplifient potentiellement la diffusion de la contamination bactérienne (Fosse *et al.*, 2008, Fravalo *et al.*, 2009).

**Figure 1** : Comparaison des prévalences individuelles rapportées dans la littérature pour *Campylobacter* aux stades de l'Élevage, de l'Abattage et de la Distribution chez les Bovins et les Poulets. Sont affichés 1er quartile, médiane, moyenne (♦), 3ième quartile, Linf = Q1-1.5 (Q3-Q1), Lsup = Q3+1.5 (Q3-Q1)



Légendes : E = élevage, A = abattoir, D = distribution, B = bovins, P = poulets

Si la maîtrise de la contamination primaire repose sur le respect des bonnes pratiques d'hygiène et de la gestuelle, parfois elle peut nécessiter d'être renforcée par une action corrective, rapide à mettre en œuvre sur la chaîne visant à réduire le risque de la contamination des carcasses et de la diffusion des bactéries. Le rinçage avec de l'eau claire des surfaces visuellement souillées peut être envisagé comme une de ces actions correctives. Cette action, observée dans les abattoirs, n'a pas ou peu été évaluée en termes d'efficacité pour réduire le risque de dangerosité des viandes contaminées (niveau de la réduction de la population bactérienne, inactivation ou non de la flore restante, dispersion ou non de la contamination).

L'objectif de ces travaux est de développer un modèle permettant de décrire le niveau d'attachement de *Campylobacter* à la surface musculaire, nue ou protégée par une séreuse, d'échantillons ayant subi une contamination en surface puis un rinçage superficiel à l'eau claire pouvant mimer des conditions proches de celles observées dans le procédé d'abattage.

## 1. MATERIEL ET METHODES

Les résultats ont été obtenus à partir de 7 répétitions d'une série d'analyses, chaque série comportant 20 échantillons.

### 1.1. ECHANTILLONS

Nous avons utilisé des muscles *Rectus abdominis* conservés, après un prélèvement en conditions aseptiques, à 4 °C sous vide pendant 3 à 5 jours afin d'obtenir la résolution totale de la *Rigor mortis*. Les muscles n'ont été soumis à aucun traitement de décontamination préalable susceptible d'altérer leurs caractéristiques structurales et microbiologiques.

La veille de la mise en œuvre du protocole expérimental, une série d'échantillons est préparée de la façon suivante. L'échantillon est un carré de 5 cm de côté, avec (Séreuse=face péritonéale du muscle) ou sans séreuse (Viande=face musculaire), d'une épaisseur d'environ 1cm, découpé stérilement à l'aide d'un gabarit dans le muscle. L'échantillon est ensuite déposé dans une boîte de Pétri vide, la face péritonéale ou musculaire placée au dessus.

Une solution d'agar 2% est coulée autour, sans recouvrir l'échantillon, afin d'obtenir une surface affleurante et continue (figure 2). Après gélification, la boîte de Pétri est entreposée à + 4 °C jusqu'à la mise en œuvre du protocole expérimental.

**Figure 2** : Illustration du positionnement de la matrice (ici viande) et de l'agar.



### 1.2. CAMPYLOBACTER

Au total quatre souches de *Campylobacter*, 1 de référence et 1 sauvage pour chacune des 2 espèces *coli* et *jejuni* ont été testées. Nous utilisons des géloses sélectives Karmali pour toutes les étapes, en atmosphère microaérophile à 42 °C. Pour chaque souche, des cryotubes, stockés à - 70 °C, sont utilisés pour une pré-culture, suivie d'une culture de 24 h sur gélose à partir de laquelle est réalisée une dispersion bactérienne (DO ≈ 0,09) dans de l'eau physiologique servant à l'inoculation des échantillons. Les résultats des dénombrements des 23 dispersions bactériennes utilisées varient entre 6,30 et 8,35 log ufc/mL, avec une moyenne de 7,36 log ufc/mL. Il faut noter qu'à une DO de 0,09, il est observé un effet « espèce » significatif (P = 0,035) de la concentration des dispersions bactériennes, avec des valeurs supérieures pour *C. jejuni* (7,60 log ufc/mL) versus *C. coli* (7,10 log ufc/mL). Aucun effet souche n'est en revanche observé.

### 1.3. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Avant la mise en œuvre d'une série d'analyses, les échantillons sont au préalable « tempérés » à 25 °C pendant 2 h avant leur utilisation. Chaque série d'analyses comprend des échantillons inoculés, respectivement avec les 4 souches, et des échantillons témoins non inoculés et contrôlés en *Campylobacter* (seuil de détection de 10 bactérie/témoin) pour chacune des 2 matrices (Séreuse et Viande). Les souches de *Campylobacter* isolées sur les échantillons témoins ont été identifiées au niveau de l'espèce par PCR multiplex (Denis *et al.*, 1999).

Seuls deux échantillons témoins sur les 15 (8 V et 7 S) ont été déclarés positifs : un échantillon Séreuse avec 6 colonies (5 *C. coli* et 1 *C. jejuni*) et un échantillon Viande avec 4 colonies (2 *C. coli* et 2 *C. jejuni*). Ces niveaux de contamination « initiale » sont totalement négligeables (60 ou 40 colonies respectivement) par rapport aux quantités de *Campylobacter* inoculées.

Au total, 62 V et 63 S ont été inoculés. L'inoculum, 0,1 mL de la dispersion bactérienne, était déposé à la surface soit en gouttes, soit avec un étalement à l'oese. Les échantillons inoculés étaient ensuite stockés 10 minutes ou 2 heures à 25 °C avant le rinçage. Le rinçage de la surface de l'échantillon est réalisé avec 10 mL d'eau physiologique stérile, versés à l'aide d'une pipette automatique depuis une

hauteur de 5 cm, la direction du jet étant centré sur l'échantillon. Après 10 s de contact, les différents compartiments (le liquide du rinçat, l'agar et l'échantillon = matrice) ont été isolés. Chacun d'eux a été ensuite transféré dans un sac stomacheur contenant 10 mL d'eau physiologique pour un dénombrement des campylobacters.

Tous les dénombrements ont été réalisés après 48h de culture à 42°C sur gélose Karmali.

#### 1.4 TRAITEMENTS DES DONNEES

La figure 3 résume les données mesurées et les données calculées. Les résultats des dénombrements (valeurs de Q, E, A et M) ont été regroupés dans le tableur Excel, leur traitement a été réalisé à l'aide du logiciel XLStat (Adinsoft, Paris). Trois fractions de la population bactérienne ont été calculées afin d'évaluer les différents états (libre ou « adhérente » ou non récupérée, figure 3) de la population de *Campylobacter* : Fraction Rinçat (FR), Fraction Matrice (FM), fraction Non Récupérée (NR). Ce calcul a été possible pour 54 Séreuses et 47 Viandes.

Il convient de rappeler que l'incertitude des dénombrements bactériens est de 0,5 log ufc (AFSSA, 2008) aussi dans le cas de produits ou de rapports de 2 résultats les incertitudes relatives à chaque terme s'additionnent... Les résultats obtenus sont de ce fait particulièrement dispersés et doivent être analysés en conséquence.

**Figure 3** : Opérations du protocole expérimental, valeurs dénombrées, valeurs des 3 fractions calculées et correspondance avec l'état de la population bactérienne évaluée (libre, adhérente, non récupérée).

Protocole opératoire	Valeurs dénombrées	Fractions calculées	Etat de la population évaluée
Inoculation	Q		Libre
rinçage	E A	$FR = (E+A)/Q$	Adhérente faiblement
Stomachage	M	$FM = M/Q$	Réversible
	avec $\Sigma = E + A + M$	$NR = 1 - \Sigma/Q$	Non Récupérée

Légendes : Q = quantité de bactéries inoculées, E = valeur du dénombrement dans l'eau récupérée du rinçage, A = valeur du dénombrement sur l'agar, M = valeur du dénombrement sur la matrice, FR = Fraction Rinçat, FM = Fraction Matrice, NR = fraction Non Récupérée.

## 2. RESULTATS

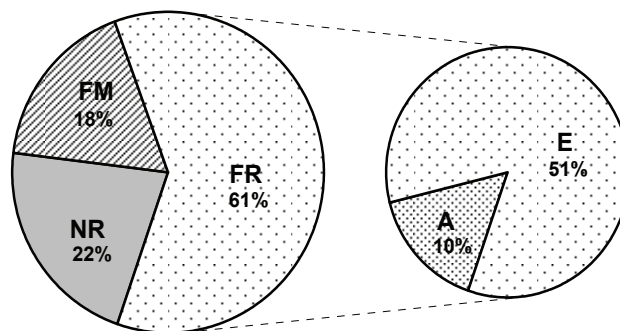
Globalement, figure 4, la fraction NR (non récupérée) représente 22 % de la quantité inoculée, la fraction FM (adhérée à la matrice puis libérée par le stomachage) 18 % et la fraction FR (entraînée par le rinçage) 61 % avec 10 % sur l'agar et 51 % dans l'eau physiologique "de rinçage".

Il est à noter que la quantité de *Campylobacter* dénombrée sur l'agar n'est pas liée aux facteurs expérimentaux. La contamination de l'agar intervient donc bien du fait du rinçage.

L'analyse de variance ne fait pas apparaître d'effet souche ( $p = 0,36$  pour FR,  $p = 0,56$  pour FM et  $p = 0,33$  pour NR) et il n'apparaît pas non plus d'effet de l'espèce bactérienne.

L'influence des conditions d'inoculation (mode et durée de contact) est détaillée dans le tableau I. Il apparaît essentiellement un effet du mode de mise en contact des bactéries avec la surface (étalement ou gouttes) sur les états adhérents (faiblement et réversible) et non récupérés, avec lors de l'étalement une adhérence plus forte et moins réversible des bactéries. Pour le temps de contact les variations observées apparaissent peu significatives et sont difficilement interprétables.

**Figure 4** : Valeurs moyennes des 3 fractions calculées pour les 101 échantillons considérés et décomposition de la Fraction Rinçat entre l'Eau physiologique et l'Agar.



Légendes : FR = Fraction Rinçat, FM = Fraction Matrice, NR = fraction Non Récupérée, E = eau récupérée du rinçage, A = agar.

**Tableau I** : Valeurs moyennes et probabilité de l'effet (p) pour chacune des 3 fractions calculées à partir des résultats des dénombrements, en fonction du mode de contamination et de la durée de contact.

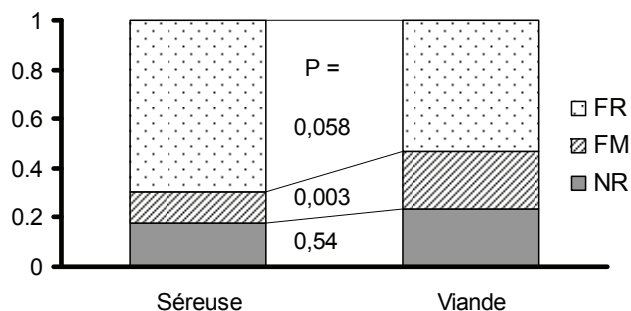
Modalité	NR	FM	FR
Etalement	0,351	0,253	0,397
Gouttes	0,060	0,109	0,831
<i>P(mode)</i>	0,003	< 0,0001	< 0,0001
Court (10 min)	0,275	0,124	0,601
Long (2 h)	0,136	0,237	0,627
<i>P(temps)</i>	0,15	0,001	0,75

Légendes : FR = Fraction Rinçat, FM = Fraction Matrice, NR = fraction Non Récupérée.

**Figure 5** : Répartition des fractions en fonction de la nature de la matrice.

La répartition des différentes fractions en fonction de la matrice est représentée figure 5. Nous devons signaler qu'il n'y a pas d'interaction significative entre les 3 facteurs.

Globalement les résultats montrent que dans la phase d'adhérence, le rinçage à l'eau claire de la surface contaminée réduit la population de *Campylobacter* mais partiellement (FR ≈ 61%) et de façon variable, notamment plus élevée pour la matrice Sérouse ( $p = 0,058$ ) et pour les contaminations par gouttes ( $p < 0,0001$ ).



Légendes : FR = Fraction Rinçat, FM = Fraction Matrice, NR = fraction Non Récupérée, p = probabilité de différence entre les fractions.

## 3. DISCUSSION

L'association des espèces *C. coli* et *C. jejuni* sur la viande bovine (déjà rapportée par Pezzoti *et al.*, 2003), que nous avons observée pour les témoins confirme la nécessité d'envisager au minimum les 2 espèces principalement impliquées dans les campylobactérioses humaines.

Néanmoins dans ces expériences, il n'apparaît pas de différence d'adhérence entre les 4 souches testées, bien qu'elles aient des capacités différentes sur surface inerte (Sulaeman *et al.*, 2009).

Si certaines bactéries doivent être viables pour adhérer à la surface de matrice notamment les Salmonelles sur des tissus végétaux (Saggers *et al.*, 2008), le niveau d'attachement de *C. jejuni* semblerait moins lié à son état physiologique. Ainsi sur surfaces inertes (acier inoxydable), selon Duffy et Dykes (2009), les capacités de *C. jejuni* à adhérer ne sont pas modifiées lorsque les bactéries deviennent non cultivables. Nguyen et ses collaborateurs (2010) en étudiant l'attachement de la bactérie après 30 min, à des températures de 4, 25, 37 et 55 °C observent eux que l'attachement augmente avec la température mais aussi à 4 °C pendant 2 à 3 h avant de se stabiliser. Ces différents résultats suggèrent que, au moins dans un premier temps, l'attachement des campylobacters aux surfaces est « passif » et résulterait d'interactions physico-chimiques faibles à proximité immédiate de la surface (Bos *et al.*, 1999). Ces interactions entre la température, le temps de contact et la matrice pourraient dans nos expériences expliquer l'effet peu significatif du temps de contact, la matrice étudiée ici étant une matrice alimentaire plus complexe qu'une surface inerte. Néanmoins il apparaît que les 2 modes d'inoculation utilisés, en gouttes ou étalement à l'oese, pour simuler des souillures focales et limitées ou importantes, diffèrent significativement sur ces matrices complexes. Ces observations suggèrent un possible encombrement stérique limitant ces interactions physico-chimiques faibles et permettant ainsi le non-attachement d'une fraction de la population bactérienne.

Ces travaux confirment les variations d'attachement (et de récupération) observées en fonction de la nature de la matrice (Solow *et al.*, 2003 ; Fosse *et al.*, 2006). Ils montrent également les limites de l'utilisation d'un rinçage de surface à l'eau claire sans forte pression pour réduire le risque sanitaire lié aux contaminations d'origine digestive. En effet ce rinçage qui peut être apparenté aux méthodes mécaniques de réduction de la flore microbienne de surface des carcasses a certes un effet « décapant » mais celui-ci reste faible. La réduction observée est ici d'un demi-log *versus* une réduction de 2 log de la flore totale lors d'un rinçage avec une pression de 17 à 27 bars de carcasses de bovins (Castillo *et al.*, 1998) ou de 0,84 à 1,08 log ufc/cm<sup>2</sup> de *Campylobacter* sur peau de poulet lors d'immersion en eau chaude (Whyte *et al.*, 2003). Ces limites doivent être prises en compte tout particulièrement pour un danger présent en grand nombre dans le réservoir digestif, survivant en conditions de réfrigération des viandes (Laroche *et al.*, 2004) et dont la dose infectante pour l'homme est faible.

Enfin, la fraction non récupérée (22 % en moyenne) correspond à un rendement de récupération de 78 %, supérieur à ceux obtenus par Fosse et ses collaborateurs (2006) sur de la couenne (59 %) et de l'échine de porc (50 %), après une nuit à + 4 °C et stomacage dans de l'eau peptonée. La durée d'attente après l'inoculation est très probablement à l'origine de cette différence, mais cet effet n'est pas net pour les 2 durées considérées ici, probablement masqué par l'utilisation des 2 modes d'inoculation. Dans notre modèle, la fraction non récupérée regroupe à la fois les bactéries adhérentes de façon irréversible et les bactéries non adhérentes mais non détectables ici car non cultivables. Il n'est pas possible dans l'immédiat d'évaluer ces états de la fraction non récupérée du fait de problèmes techniques majeurs. Mais la température de l'eau de rinçage étant inférieure à 74 °C (AFSSA, 2007), les conditions expérimentales n'étant pas hautement défavorables à la

survie de *Campylobacter*, l'inactivation totale de ces bactéries semble peu probable.

## CONCLUSION

Globalement les résultats montrent que dans la phase d'adhérence (phase réversible) sur matrices carnées, les deux espèces de *Campylobacter* ne montrent pas de comportement différent. Le rinçage avec de l'eau claire de la surface contaminée réduit partiellement la population de *Campylobacter* et cette réduction est variable en fonction de la structure de la surface de la matrice (structure séreuse ou musculaire) et du mode de contamination (surface et temps de contact). Le rinçage conduit par ailleurs à une dispersion de plus de 15 % de la fraction « éliminée » des bactéries sur une surface plus large, conduisant ainsi au « déplacement » d'environ 10 % des campylobacters inoculés.

La caractérisation de la fraction non récupérée de la population bactérienne apportée (NR) doit être poursuivie (bactéries non cultivables, bactéries adhérentes de façon « irréversible ») et l'influence des facteurs de stress bactérien (stress oxydant, compétition avec la flore endogène) doit être envisagée pour expliquer les variations observées notamment vis-à-vis du temps et de la surface de contact.

**AFSSA, 2007.** Saisine n° 2006-SA-0261. 10 p.

**AFSSA, 2008.** Saisine n° 2007-SA-0174. 41 p.

**Bos, R., Van Der Mei, H.C., Busscher, H.J., 1999.** FEMS Microbiol. Rev. 23. 179-230.

**Castillo, A., Lucia, L.M., Goodson, K.J., Savell, J. W., Acuff G. R., 1998.** J. Food Prot. 61. 823 - 828.

**Cools, I., Uyttendaele, M., Cerpentier, J., D'haese, E., Nelis, H.J., Debevere, J. 2005.** Lett. Appl. Microb. 40. 418-423.

**Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G., Colin, P. 1999.** Lett. Applied Microb. 29. 406-410.

**Duffy, L.L., Dykes, G.A. 2009.** Foodborne Pathog. Dis. 6. 631-634.

**Fosse, J., Laroche, M., Rossero, A., Federighi, M., Seegers, H., Magras, C., 2006.** J. Food Prot. 69. 2100-06.

**Fosse, J., Oudot, N., Laroche, M., Rossero, A., Seegers, H., Magras, C. 2008.** Epidémiol. et santé anim. 53. 57-71.

**Fravalo, P., Laisney, M.-J., Gillard, M.-O., Salvat, G., Chemaly, M. 2009.** J. Food Prot. 72. 1836-1840.

**Grosspietsch, R., Einschütz, K., Jaeger, D., Fries, R. 2006.** J. Food Prot. 69. 2738-2741.

**Laroche, M., Kaiser, J., Federighi, M., Magras, C., 2004.** VPC, NS 10jsmtv. 185-186.

**Nguyen, V.T., Turner, M.S., Dykes, G.A. 2010.** J. Food Prot. 73. 832-838.

**Pezzotti, G., Serafin, A., Luzzi, I., Mioni, R., Milan, M., Perin, R., 2003.** Int. J. Food Microb. 82. 281-287.

**Saggers, E., Waspe, C., Parker, M., Waldron, K., Brocklehurst, T. 2008.** J. Appl. Microb. 105. 1239-1245.

**Solow, B.T., Cloak, O.M., Fratamico, P.M., 2003.** J. Food Prot. 66. 2023-2031.

**Sulaeman, S., Le Bihan, G., Rossero, A., Federighi, M., Dé, E., Tresse, O., 2010.** J. Appl. Microb. 108. 1303-1312.

**Waret, A., Fosse, J., Roger, F., Pfeiffer, D., Magras, C., 2008.** In Annual Scientific Conference ECVPH, 4th-5th December, 46, Thessaloniki, Grèce.

**Warriner, K., Eveleigh, K., Goodman, J., Betts, G., Gonzales, M., Waites, W.M. 2001.** J. Food Prot. 64. 493-497.

**Whyte, P., McGill, K., Collins, J.D., 2003.** Food Microb. 20. 111-117.