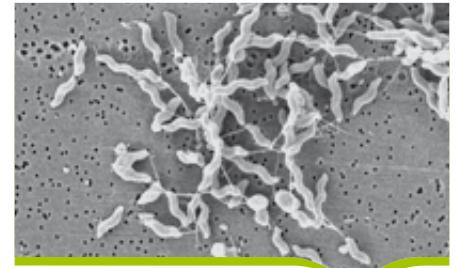




Focus sur un laboratoire

Le laboratoire de référence de l'Union européenne pour *Campylobacter* est hébergé par le National Veterinary Institute, SVA, à Uppsala

E. Olsson Engvall, Elina Lahti, G. Lindgren, A. Nyman, B. Harbom, N. Pudas, L. Svensson, I. Hansson. National Veterinary Institute, SVA, Uppsala, Suède



Le National Veterinary Institute, SVA, situé à Uppsala, est depuis 2006 le laboratoire de référence de l'Union européenne (LR-UE) pour *Campylobacter*.

Le SVA est également l'un des deux laboratoires nationaux de référence (LNR) pour *Campylobacter* en Suède, et possède une accréditation suivant la norme internationale homologuée NF EN ISO/IEC 17025:2005. Le LR-UE pour *Campylobacter* a pour tâches principales d'apporter un appui scientifique et technique aux LNR et à la Commission (DG Sanco), d'harmoniser les méthodes de détection et d'identification de *Campylobacter* et d'évaluer la performance des LNR en matière d'analyse de *Campylobacter*. Il poursuit ses objectifs en organisant des ateliers de travail, des essais d'aptitude, des stages de formation et des visites d'étude, et en confiant certaines missions aux LNR. Le LR-UE offre également une expertise scientifique à la DG Sanco, à l'EFSA, à l'ECDC, et aux LNR, participe aux travaux de normalisation de l'ISO, et conduit des activités de recherche.

Introduction

L'infection provoquée chez l'Homme par *Campylobacter*, la campylobactériose, est la zoonose bactérienne la plus souvent signalée dans les pays industrialisés du monde entier. En Europe, pour la période 2004-2008, entre 170 000 et 200 000 cas ont été déclarés chaque année (EFSA, 2010). *Campylobacter* peut être présent dans le tractus intestinal d'animaux sains, et les sources fréquentes d'infection humaine sont la viande, l'eau ou le lait non pasteurisé contaminés, ou encore un contact direct avec des animaux contaminés. La manipulation et la consommation de viande de volaille contaminée sont considérées comme des facteurs de risque majeurs d'infection humaine. La campylobactériose se manifeste généralement par une diarrhée aiguë, pouvant être hémorragique, de la fièvre, des douleurs abdominales et des vomissements. La maladie est spontanément résolutive en 1 à 2 semaines, mais des complications graves peuvent survenir, comme le syndrome de Guillain-Barré.

Les bactéries du genre *Campylobacter* sont des bactéries à Gram négatif très mobiles, exigeantes, dont la croissance est relativement lente et la culture difficile. Microaérophiles, elles ont donc besoin pour se développer d'une atmosphère à teneur réduite en oxygène, et préfèrent les milieux nutritifs de base additionnés de 5-10 % de sang. Les analyses des *Campylobacter* spp. se font habituellement par étalement direct sur un milieu sélectif ou par enrichissement suivi d'une culture sur un milieu sélectif solide. L'enrichissement peut être nécessaire lorsque les bactéries sont présentes en petit nombre ou ont été endommagées par des stress environnementaux. Les espèces *C. jejuni* et *C. coli* sont à l'origine de plus de 90 % des cas humains, mais il arrive que d'autres espèces, à savoir *C. lari*, *C. upsaliensis*, et *C. fetus* subsp *fetus* causent également des infections. Les *Campylobacter* spp ne fermentent pas les hydrates de carbone, et la confirmation et l'identification d'une espèce particulière à l'aide des méthodes phénotypiques classiques est incertaine. Les techniques fondées sur l'utilisation d'ADN, à savoir la réaction en chaîne de la polymérase (PCR), sont

de plus en plus utilisées, ainsi que d'autres techniques, par exemple la spectrométrie de masse, seule ou associée à des méthodes phénotypiques.

Dans l'Union européenne, différentes activités sont menées pour l'étude et le contrôle des zoonoses comme la campylobactériose. La directive sur les zoonoses (2003/99/CE) énonce les principes fondamentaux de la surveillance des zoonoses d'origine alimentaire. Un réseau de laboratoires de référence, les laboratoires de référence de l'UE (LR-UE), auparavant nommés laboratoires communautaires de référence (LCR), et les laboratoires nationaux de référence (LNR), a été mis en place pour garantir la qualité des méthodes analytiques appliquées aux échantillons prélevés sous contrôle officiel dans la chaîne alimentaire à tous les stades, c'est-à-dire du stade de la production primaire jusqu'au niveau de la vente au détail. Le National Veterinary Institute (SVA), à Uppsala en Suède, a été nommé laboratoire de référence de l'UE pour *Campylobacter* en 2006. Le SVA est accrédité suivant la norme internationale ISO/IEC 17025:2005 et possède un système de gestion intégré QSE (Qualité Sécurité Environnement) certifié suivant les trois référentiels ISO 9001, ISO 14001, et OHSAS 18001 (Occupational Health and Safety).

Le règlement (CE) 882/2004 décrit les fonctions des LR-UE et des LNR. Le LR-UE pour *Campylobacter* a pour tâches principales d'apporter un appui scientifique et technique à la Commission (DG-Sanco) et aux LNR, d'harmoniser les méthodes de détection et d'identification de *Campylobacter* et d'évaluer la performance des LNR en matière d'analyse de *Campylobacter*. Pour remplir ces tâches, le LR-UE pour *Campylobacter* organise des ateliers de travail, des essais d'aptitude (EA), des stages de formation et des visites d'étude, et confie certaines missions aux LNR. Le LR-UE offre également une expertise scientifique à la Commission (DG-Sanco), à l'EFSA, et aux LNR, collabore avec les laboratoires de santé publique et l'ECDC, participe aux travaux de normalisation de l'ISO, conduit des activités de recherche et participe aux rencontres scientifiques internationales et aux réseaux de recherche internationaux.



Focus sur un laboratoire

Ateliers de travail annuels

Le premier atelier organisé par le LR-UE pour *Campylobacter* a eu lieu en octobre 2006. L'objectif principal était d'établir un premier contact avec les LNR afin d'échanger des informations sur les activités *Campylobacter* en cours au niveau national et européen. À ce premier atelier participaient 38 personnes venant des LNR de 21 États membres de l'UE, de deux pays candidats et de deux pays tiers. Depuis lors, le nombre de participants n'a cessé d'augmenter pour dépasser les 50, et habituellement tous les États membres de l'UE y prennent part.

Les programmes de ces ateliers comportent des présentations réalisées par des experts de la Commission, de l'EFSA et de l'ECDC sur les activités programmées et en cours concernant la recherche sur *Campylobacter* et la surveillance des zoonoses. Les résultats des essais d'aptitude sont présentés et discutés, et les LNR détaillent les études réalisées dans leurs pays. Des experts sont invités à exposer leurs résultats d'études, par exemple sur le développement et la validation de nouveaux milieux, ou sur des techniques moléculaires de sous-typage. Les présentations faites lors des ateliers sont publiées sur le site internet du LR-UE pour *Campylobacter* (<http://www.sva.se/en/EU-RL---Campylobacter/>).

Essais d'aptitude (EA)

Depuis 2007, le LR-UE a organisé sept essais d'aptitude (Tableau 1). Tous les LNR des États membres de l'UE ainsi que les laboratoires ayant un statut équivalent dans des pays tiers en Europe ont été invités à y prendre part. Ces essais avaient pour objectif d'évaluer la capacité des LNR à détecter, identifier l'espèce et (dans trois cas) dénombrer *Campylobacter*, et d'évaluer les différents protocoles d'analyse de *Campylobacter*. Pour les EA incluant la détection et le dénombrement de *Campylobacter*, les modes opératoires (SOP) suivaient globalement l'ISO 10272 Partie 1 et Partie 2: 2006 « Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Campylobacter* spp ».

Dans certains EA a été incluse, sur la base du volontariat, l'identification des espèces de *Campylobacter* par des tests utilisant la PCR (Linton *et al.* 1997; Denis *et al.* 1999; Wang *et al.* 2002) et par des méthodes au choix.

Préparation des matériaux de référence

Pour quatre EA, des cultures bactériennes vivantes d'isolats cliniques et de souches provenant de la CCUG (Culture Collection of University of Goteborg) ont été utilisées. Des flacons contenant des cultures lyophilisées de *Campylobacter* à différentes concentrations, produites par la National Food Administration à Uppsala, ont été utilisés dans deux EA. Avant d'être distribués aux LNR pour les essais d'aptitude, les cultures vivantes ou les flacons contenant les bactéries lyophilisées ont fait l'objet de tests approfondis de stabilité et d'homogénéité, avec et sans la matrice de l'EA même. Tous les types de matrice utilisés dans les EA, à savoir caeca ou contenu caecal de poulet, peau de poulet et viande de poulet, ont été collectés dans des troupeaux de poulets négatifs pour *Campylobacter*.

Résultats

Le nombre de LNR présents aux essais inter-laboratoires d'aptitude n'a fait que croître au fil des ans. Les résultats des essais concernant la recherche et l'identification d'espèce sont présentés à la Figure 1. Les résultats des EA ont été présentés lors des ateliers du LR-UE et également lors de rencontres internationales (Hansson *et al.* 2009; Hansson *et al.* 2010). Les résultats de l'EA n° 6 qui impliquait diverses espèces de *Campylobacter* et des organismes apparentés appartenant à d'autres genres ne sont pas inclus dans la Figure 1, mais 29 LNR sur les 33 ayant participé à l'EA ont correctement identifié cinq échantillons contenant les souches *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari* en tant que *Campylobacter* spp.

La capacité des laboratoires à effectuer le dénombrement dans les EA n°s 3, 5 et 7 s'est progressivement améliorée. Dans l'EA n° 7, 28 LNR sur 31 ont présenté des résultats qui ont été jugés excellents (20), bons (7) ou acceptables (1).

Tableau 1. Essais d'aptitude (EA) organisés par le LR-UE pour *Campylobacter*

EA	Année	Nombre d'échantillons	Description de l'essai d'aptitude	Nombre de LNR ayant participé
1	2007	5	Recherche et identification des espèces de <i>Campylobacter</i> dans des prélèvements par écouvillonnage du contenu caecal de poulet (cultures vivantes). EA volontaire.	24
2	2007	12	Recherche et identification des espèces de <i>Campylobacter</i> dans des caeca de poulet (cultures vivantes)	24
3	2008	14	Recherche, identification des espèces et dénombrement des <i>Campylobacter</i> spp. dans la peau de poulet (cultures vivantes)	31
4	2008	11	Identification des espèces de <i>Campylobacter</i> par 3 tests PCR. (PCR 1- Linton <i>et al.</i> 1997; PCR 2- Denis <i>et al.</i> 1999; PCR 3- Wang <i>et al.</i> 2002) (ADN bactérien). EA volontaire.	25
5	2009	11	Recherche, identification des espèces et dénombrement des <i>Campylobacter</i> dans la viande de poulet (cultures lyophilisées)	35
6	2010	10	Recherche et identification des espèces de <i>Campylobacter</i> dans des échantillons écouvillonnés (cultures vivantes). EA volontaire.	33
7	2010	10	Recherche, identification des espèces et dénombrement des <i>Campylobacter</i> dans la viande de poulet (cultures lyophilisées)	34

Focus sur un laboratoire

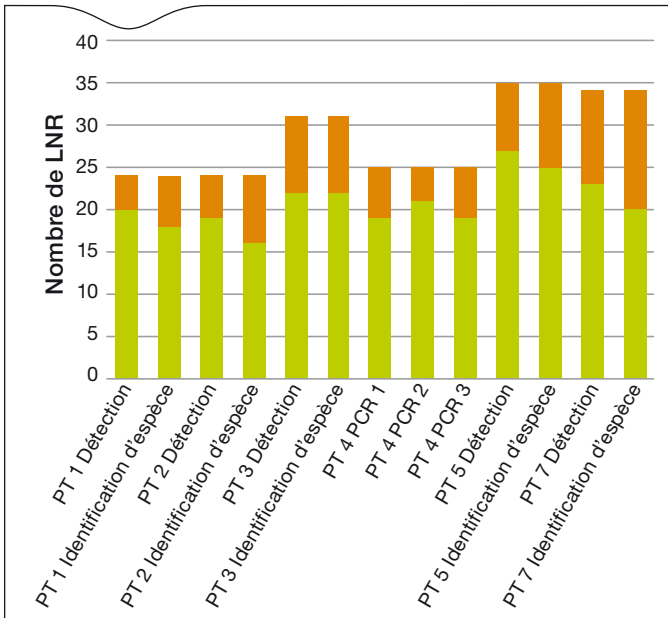


Figure 1. Résultats de la recherche et de l'identification d'espèce dans les essais d'aptitude.

Les barres vertes représentent le nombre de LNR qui ont correctement détecté ou identifié les espèces de *Campylobacter* dans tous les échantillons inclus dans l'EA. Les barres oranges indiquent les LNR qui ont obtenu des résultats incorrects.

PCR 1 – Linton et al. 1997
PCR 2 – Denis et al. 1999
PCR 3 – Wang et al. 2002

Stages de formation et visites d'étude

En 2008, une étude de référence a été conduite à l'échelle de l'UE sur la prévalence de *Campylobacter* et de *Salmonella* dans des lots de poulets de chair (Décision 2007/516/CE de la Commission). Le LR-UE a organisé une session de formation pour tous les LNR afin d'harmoniser les méthodes de détection et de dénombrement avant le démarrage de l'étude de référence. Un autre stage de formation sur l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) a été organisé en 2011. Des visites d'étude ont été organisées chaque année pour 1 à 3 personnes, qui souhaitent en savoir plus sur les techniques d'analyse de *Campylobacter* et sur la surveillance de *Campylobacter* dans les troupeaux de poulets de chair.

Confirmation et spéciation d'isolats de *Campylobacter* provenant de l'étude de référence

Dans la décision 2007/516/CE de la Commission, il est indiqué que pour le contrôle de la qualité, une certaine proportion d'isolats de *Campylobacter* issus de l'étude de référence doit être envoyée par les LNR au LR-UE pour *Campylobacter* à des fins de confirmation et de spéciation. En tout, 456 isolats ont été transmis : 423 en provenance de 26 États membres de l'UE et 33 isolats en provenance de deux pays tiers. Vingt-deux isolats n'étaient pas cultivables ou étaient fortement contaminés et n'ont pas pu être analysés par le LR-UE. L'identification des isolats a été effectuée par le LR-UE à l'aide de tests de phénotypage conformes à la norme ISO 10272 Partie 1 : 2006, et de tests PCR (Denis et al. 1999, Fermér & Engvall 1999, Wang et al. 2002, Marshall et al. 1999).

Pour la majorité des isolats, à savoir 92 %, les identifications effectuées par les LNR et le LR-UE correspondaient (tableau 2). Pour 36 isolats, les identifications effectuées par les LNR et le LR-UE ne correspondaient pas, ou les LNR avaient transmis les isolats en les désignant par « *Campylobacter* spp » ou « inconnu ». La majorité de ces isolats avaient été identifiés dans les LNR avec seulement des tests de phénotypage pour l'identification d'espèce. Le test d'hydrolyse de l'hippurate, qui doit permettre de faire la distinction entre *C. jejuni* (résultat positif) et *C. coli* (résultat négatif), donne parfois des réactions intermédiaires. Il existe également des souches de *C. jejuni* négatives au test de l'hippurate, et le test de phénotypage n'est par conséquent pas toujours fiable pour différencier ces deux espèces.

Tableau 2. Résultats obtenus respectivement par le LR-UE et les LNR concernant l'identification de 434 isolats provenant de l'étude de référence

Identification LR-UE	Identification LNR	Nombre d'isolats
<i>C. jejuni</i> (n=278)	<i>C. jejuni</i>	264
	<i>C. coli</i>	7
	<i>Campylobacter</i> spp	6
	Mélange de <i>C. jejuni</i> et de <i>C. coli</i>	1
<i>C. coli</i> (n=146)	<i>C. coli</i>	131
	<i>C. jejuni</i>	10
	<i>Campylobacter</i> spp	2
	<i>C. upsaliensis</i>	1
	Mélange de <i>C. jejuni</i> et de <i>C. coli</i>	2
Mélange de <i>C. jejuni</i> et de <i>C. coli</i> (n=5)	<i>C. coli</i>	4
	<i>C. jejuni</i>	1
<i>C. lari</i> (n=2)	<i>C. lari</i>	2
<i>Arcobacter</i> sp (n=1)	<i>Arcobacter</i> sp	1
<i>Helicobacter</i> sp (n=2)	<i>C. coli</i>	1
	Inconnu	1

Méthodes de détection, de dénombrement et de caractérisation de *Campylobacter*

Méthodes de culture pour la recherche et le dénombrement de *Campylobacter*

Pour la recherche et le dénombrement de *Campylobacter* dans les aliments, la norme ISO 10272 Partie 1 et Partie 2 : 2006, et la norme NMKL 119, 2^e éd. 1990, sont deux des normes internationales les plus fréquemment utilisées. Ces deux normes contiennent des modes opératoires de culture traditionnels permettant d'isoler *Campylobacter* de la matrice. En s'appuyant sur ces protocoles normalisés, le LR-UE a testé plusieurs bouillons d'enrichissement, géloses sélectives, températures et temps d'incubation différents. Dans une étude portant sur 231 échantillons d'eaux de rinçage de carcasses de poulets, trois protocoles de dénombrement de *Campylobacter* ont été comparés (Harbom et al. 2007) ; l'un était le protocole original de l'ISO 10272 Partie 2, l'autre était une variante modifiée de ce protocole ISO, et le troisième était le protocole NMKL (projet de



Focus sur un laboratoire

révision 2005). Dans l'étude, les protocoles basés sur l'ISO ont donné des niveaux de *Campylobacter* significativement plus élevés que ceux obtenus avec le protocole NMKL.

Utilisation des essais d'aptitude pour tester les modifications apportées aux protocoles de la norme ISO 10272

Une révision de l'ISO 10272 Partie 1 et Partie 2 : 2006 est en cours. Une méthode optimisée d'enrichissement de *Campylobacter* est en discussion. Afin de recueillir des informations utiles pour la révision, un test facultatif de deux milieux d'enrichissement, les bouillons Bolton et Preston, a été inclus dans l'EA n° 7. Dans cet EA, le bouillon Preston s'est révélé supérieur au bouillon Bolton pour les échantillons contenant une flore initiale abondante de souches d'*E. coli* multirésistantes, mais pour les échantillons à faible nombre de *Campylobacter* ou contenant *C. lari*, le bouillon Bolton semblait être une meilleure alternative.

Méthodes moléculaires et autres techniques

Pour la confirmation de *Campylobacter* et l'identification d'espèce, tous les essais d'aptitude et les résultats de l'étude de référence montrent que les tests basés sur l'utilisation de la PCR sont plus fiables que les méthodes phénotypiques. Le LR-UE a évalué les essais relatifs à l'identification de *Campylobacter* au niveau du genre et de l'espèce, et trois tests PCR classiques ont été choisis pour l'EA n° 4 volontaire. Le nombre de LNR utilisant les tests PCR est en augmentation, il est en effet passé de 13 sur 26 en 2006 à 24 sur 33 en 2010.

Ces dernières années, des tests PCR en temps réel ont été développés, et des systèmes permettant la détection de *Campylobacter* dans des échantillons de denrées alimentaires sont également disponibles dans le commerce. Les avantages de la PCR en temps réel résident dans le temps d'analyse plus court et le risque diminué de contamination des échantillons. Les inconvénients sont le coût élevé de l'équipement et parfois des problèmes lors de l'ajustement des protocoles aux appareils disponibles et au type d'échantillons à tester. Le LR-UE a testé quelques PCR en temps réel avec des résultats acceptables, mais les méthodes de culture traditionnelles semblent montrer une sensibilité égale voire supérieure pour la détection de *Campylobacter* dans les échantillons complexes.

Le LR-UE a également testé la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification de *Campylobacter* et d'organismes apparentés, à savoir *Arcobacter* et *Helicobacter* (Olsson Engvall *et al.* 2008). Cette technique s'est avérée utile et est employée par un petit nombre de LNR.

Caractérisation des souches, sous-typage de *Campylobacter*

L'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PGFE) est systématiquement employée par le LR-UE pour le sous-typage de *Campylobacter*. Les protocoles normalisés Campynet (<http://campynet.vetinst.dk/PFGE.html>) et PulseNet/USA (<http://www.pulsenetinternational.org/protocols/Pages/default.aspx>) sont appliqués. Le typage par séquençage multilocus (MLST) est une autre méthode de sous-typage qui a été établie au sein du LR-UE. Des isolats provenant de l'étude de référence sont actuellement en cours de sous-typage par PFGE et MLST pour étudier la diversité des *Campylobacter*, essentiellement *C. jejuni*, au sein des isolats de poulets de chair européens.



Photos prises lors du stage de formation sur l'électrophorèse PFGE en janvier 2011

Conclusions

L'incidence de *Campylobacter* chez l'Homme n'a montré aucune tendance à la baisse ces cinq dernières années en dépit de la sensibilisation croissante et des actions menées pour contrôler sa prévalence dans les troupeaux de poulets de chair. Bien que la viande de volaille soit considérée comme la plus importante source particulière d'infections humaines, d'autres sources doivent être explorées. L'harmonisation des méthodes analytiques de détection, d'identification et de sous-typage des isolats issus de sources différentes est une condition préalable indispensable à la réalisation d'études sur *Campylobacter* et à la compréhension de l'épidémiologie de ces bactéries. Parvenir à coordonner cette harmonisation et l'application des méthodes pertinentes afin de faciliter le développement de mesures efficaces pour le contrôle de *Campylobacter* dans toute la chaîne alimentaire constitue un défi majeur pour le LR-UE.

Références bibliographiques

- Denis *et al.* 1999. Lett. Appl. Microbiol. 29, 406-410.
- Autorité européenne de sécurité des aliments 2010. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union 2008, The EFSA Journal (2010), 1496.
- Fermér & Engvall 1999. J. Clin. Microbiol. 37, 3370- 3373.
- Hansson *et al.* 2009. 15th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms (CHRO). Niigata, Japan, 2-5 Sept 2009.
- Hansson *et al.* 2010. FoodMicro 2010. Copenhagen, Danemark 30 août-3 sept. 2010.
- Harbom *et al.* 2007. 14th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms (CHRO). Rotterdam, Pays-Bas, 2-5 septembre 2007.
- Linton *et al.* 1997. J. Clin. Microbiol. 35, 2568- 2572.
- Marshall *et al.* 1999. J. Clin. Microbiol. 37, 4158-4160.
- Olsson Engvall *et al.* 2008. FoodMicro 2008. Aberdeen, Écosse, RU, 1-4 septembre 2008.
- Wang *et al.* 2002. J. Clin. Microbiol. 40, 4744- 4747.